

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«__» лютого 2022 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНИКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«__» лютого 2022 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: Біотехнологічні аспекти одержання мікробних полілактатів

Виконав: здобувач II курсу, групи 02

ЧЕРЕПАНСЬКИЙ Вячеслав Валерійович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник ГРЕГІРЧАК Наталія Миколаївна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент Оксана ЖИГАДЛО

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач

(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь магістр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ
«03» листопада 2021 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ЧЕРЕПАНСЬКОГО Вячеслава Валерійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологічні аспекти одержання мікробних полілактатів

керівник роботи ГРЕГІРЧАК Наталія Миколаївна, к.т.н., доцент

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від «02» листопада 2021 року № 865-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2022 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Escherichia coli*, цільовий

продукт: пластикова плівка виготовлена з полілактату

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

Літературний огляд: РОЗДІЛ 1. Упаковка на біологічній основі, як шлях до вирішення екологічної

проблеми; РОЗДІЛ 2. Генно-інженерні підходи до створення продуцентів полілактатів; РОЗДІЛ 3.

Особливості процесу біодеградації полілактату мікроорганізмами. Технологічна частина: РОЗДІЛ 4.

Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для первинного пакування ЛЗ; РОЗДІЛ 5.

Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми

виробництва пластикової плівки; РОЗДІЛ 6. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу;

РОЗДІЛ 7. Опис технологічного процесу виділення та очищення субстанції полілактату; РОЗДІЛ 8.

Опис технологічного процесу виробництва пластикової плівки з полілактату.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема: ділянки виробничого біосинтезу – 2 аркуші формату А1; ділянки виділення та

очищення полілактату – 1 аркуш формату А3; ділянки виробництва плівки з полілактату – 1 аркуш

формату А3. Апаратурна схема: ділянки виробничого біосинтезу – 1 аркуш формату А1; ділянки

виділення та очищення полілактату – 1 аркуш формату А2; ділянки виробництва плівки з полілактату

– 1 аркуш формату А2.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 03 листопада 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційного роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Літературний огляд	03.11.21- 18.11.21	
2.	Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для первинного пакування лз	19.11.21- 04.12.21	
3.	Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва пластикової плівки	05.12.21- 16.12.21	
4.	Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу	17.12.21- 27.12.21	
5.	Опис технологічного процесу виділення та очищення субстанції полілактату	28.12.21- 08.01.22	
6.	Опис технологічного процесу виробництва пластикової плівки з полілактату	09.01.22- 20.01.22	
7.	Оформлення пояснювальної записки.	21.01.22- 31.01.22	
8.	Виконання графічної частини роботи.	15.01.22- 25.01.22	

Здобувач _____ Вячеслав ЧЕРЕПАНСЬКИЙ
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____ Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	5
ВСТУП	6
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	
РОЗДІЛ 1. УПАКОВКА НА БІОЛОГІЧНІЙ ОСНОВІ, ЯК ШЛЯХ ДО ВИРІШЕННЯ ЕКОЛОГІЧНОЇ ПРОБЛЕМИ	9
РОЗДІЛ 2. ГЕННО-ІНЖЕНЕРНІ ПІДХОДИ ДО СТВОРЕННЯ ПРОДУЦЕНТІВ ПОЛІЛАКТАТІВ	20
РОЗДІЛ 3. ОСОБЛИВОСТІ ПРОЦЕСУ БІОДЕГРАДАЦІЇ ПОЛІЛАКТАТУ МІКРООРГАНІЗМАМИ	30
ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ПЕРВИННОГО ПАКУВАННЯ ЛЗ	39
4.1. Передумови виробництва полілактату.....	39
4.1.1. Аналіз галузей застосування полілактату та властивостей цільової плівки виготовленої з полілактату.....	43
4.1.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку.....	49
4.1.3. Вибір форми випуску лікарського засобу.....	51
4.1.4. Опис готової пластикової плівки (специфікація).....	52
4.1.5. Розрахунок річної потужності виробництва плівки та кількості серій на рік.....	58
4.2. Розрахунок потреби у субстанції для випуску плівки для блістерної упаковки.....	59
4.2.1. Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції.....	62
4.2.2. Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	63
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ПЛАСТИКОВОЇ ПЛІВКИ	69

5.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування.....	69
5.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера.....	79
5.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва пластикової плівки.....	84
5.4. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря)...	103
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.....	111
6.1. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу.....	111
6.2. Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу.....	118
6.3. Контроль ділянки біосинтезу.....	132
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ПОЛІЛАКТАТУ.....	137
7.1. Специфікація обладнання ділянки виділення та очищення субстанції.....	137
7.2. Опис технологічної схеми виділення та очищення субстанції.....	140
7.3. Контроль ділянки виділення та очищення субстанції.....	144
РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ПЛАСТИКОВОЇ ПЛІВКИ З ПОЛІЛАКТАТУ.....	149
8.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва пластикової плівки.....	149
8.2. Опис технологічного процесу виробництва пластикової плівки.....	150
ВИСНОВКИ.....	155
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ ЛІТЕРАТУРА.....	156
ДОДАТКИ.....	175

РЕФЕРАТ

Представлено кваліфікаційну роботу з виробництва полілактату за культивування штаму *Escherichia coli* JW0885, який синтезує на середовищі LB з додаванням 20 г/л ксилози 7,3 г/л полімеру, з метою виготовлення з нього безкольорової прозорої плівки товщиною 0,25 мм для використання її у первинному пакуванні (блістера) лікарського засобу «Корвалмент» №10, №30 та №80 виробництва АТ «Київський вітамінний завод». Розрахована потужність виробництва полімеру становить 33017 кг на рік.

Технологія виробництва субстанції та власне пластикової плівки складається з допоміжних робіт (підготовка вентиляційного повітря, підготовка аераційного повітря, приготування допоміжних розчинів (концентрованого розчину пантотенату кальцію, 5%-вого розчину додецилсульфату натрію, а також приготування та стерилізація поживного середовища)) та основних процесів (отримання інокуляту в колбах на качалці, інокуляторі та посівному апараті, виробничого біосинтезу, відокремлення біомаси від культуральної рідини, обробка отриманої біомаси детергентом та наступна екстракція, відокремлення полімеру від залишків бактеріальної маси, промивка отриманого полімеру, сушіння полімеру, етап фасування, пакування та маркування гранул полімеру, розплавлення гранул полілактату в екструдері, видавлювання розплавлених гранул через листкову матрицю, гартування сформованої плівки, розтягування плівки, намотування плівки на бобіну, герметичне пакування та маркування бобін з плівкою), що зображені в технологічній та апаратурній схемах.

Кваліфікаційна робота викладена на 184 стор. друкованого тексту, містить 26 таблиць, 25 рисунків і складається з вступу, восьми розділів, списку використаної літератури (160 джерел) та графічної частини (3 креслень формату А1, 2 креслення А2, 2 креслення А3).

Ключові слова: мікробні полілактати, *Escherichia coli* JW0885, біосинтез, біодеградабельна плівка.

ВСТУП

Розробка і освоєння нових, екологічно чистих матеріалів, що включаються в біосферні кругообіги речовин, відповідає концепції екологічно безпечного сталого промислового розвитку. Пов'язано це з тим, що охорона навколишнього середовища є невід'ємним компонентом сталого розвитку. В результаті активної господарської діяльності на тлі зростання населення планети в даний час під загрозою знаходяться біотичні і абіотичні компоненти навколишнього середовища, так як все у більш широкому масштабі зростає виробництво і споживання хімічних речовин. Це призводить до надмірного росту кількості неутилізованих відходів, що вступає в протиріччя із заходами, спрямованими на захист навколишнього середовища. Тому неухильно збільшується кількість проблем, пов'язаних з охороною навколишнього середовища [1].

Глобальною екологічною проблемою стало зростаюче використання людиною синтетичних пластмас. Обсяги випуску недеградуємого в природному середовищі синтетичних пластмас, головним чином поліолефінів (поліетиленів і поліпропіленів), одержуваних в процесах нафтоогрсинтезу, величезні, до сьогоднішнього моменту досягли 300 млн т на рік і щорічно зростають приблизно на 25 млн т. Основна їх частина складається на смітниках, так як повторній переробці в розвинених країнах піддається не більше 16-20%. Під полігони і звалища відходів відводяться родючі землі; поліетиленове сміття виводить з ладу каналізаційні та дренажні системи міст, забруднює водойми, представляючи серйозну загрозу для якості води та біоти Світового океану [2].

Одним із шляхів зниження антропогенного впливу на екосистеми є заміна синтетичних полімерів новими матеріалами, які схильні до біологічної деградації і розкладаються в природному середовищі до нешкідливих для

					НУХТ БТЕК 02.02.15 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		<i>Черепанський В.В.</i>			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		<i>Грегірчак Н.М.</i>					6	3
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>						

навколишнього середовища продуктів, які залучаються до глобальних кругообігів речовин [3]. Одним із таких біодеградабельних полімерів являються мікробні полілактати, які є найбільш перспективною заміною синтетичних полімерів.

Реалізація будь-якої нової мікробної технології в умовах виробництва є необхідним етапом для масштабування процесу та подальшої реалізації промислового виробництва. Випробування технології дозволяє уточнити фізико-хімічні параметри процесу ферментації, скласти матеріально-енергетичний баланс, розробити технологічний регламент і отримати партії продукту, необхідні для проведення комплексу необхідних випробувань [4].

Значну роль в загальній вартості виробництва полілактату (ПЛ) грає спосіб екстракції полімеру з клітин бактерій. Обираючи метод необхідно враховувати дороговизну реагентів, об'єми відходів, що утворюються, ефективність вилучення полімеру, ступінь його чистоти. В даний час використовують такі підходи для виділення полімеру: екстракцію органічними розчинниками; обробку біомаси розчинами лугів, кислот, детергентів, ферментами, а також їх різні поєднання. Більшість процесів виділення ПЛ з клітин базуються на екстракції полімеру органічними галовмісними розчинниками (хлороформ, дихлорметан, дихлоретан). Даний метод вимагає великої кількості летючого розчинника, а це збільшує загальну вартість виробництва і до того ж веде до забруднення навколишнього середовища. Клітинна біомаса може піддаватися обробці лужним розчином або розчином гіпохлориду натрію. Але при даній обробці можлива деструкція ефірних зв'язків і, як наслідок, зменшення значення молекулярної маси полімеру. Обробка бактеріальної суспензії гіпохлоридом в поєднанні з поверхнево-активними речовинами показала більш високу ефективність процесу екстракції з меншим пошкодженням полімеру. Ефективність і економічність процесу екстракції буде в першу чергу залежати від кількості полімеру в клітинах і вартості застосовуваних розчинників [5].

Новизною даної роботи є використання високопродуктивного штаму *Escherichia coli* JW0885. Для отримання даного штаму був використаний вектор експресії pTV118NpctphaC1Ps(ST/QK)AB, який містить гени pct, phaC1Ps(ST/QK), phaA та phaB. Рекомбінантні клітини *E. coli* JW0885, що містять pTV118NpctphaC1Ps(ST/FS/QK)AB з мутованим геном полігідроксиалканоатсинтази Ser325Thr/Phe392Ser/Gln481Lys із *Pseudomonas sp. 61-3* дають змогу отримати полімерів з високим вмістом молочної кислоти, що свою чергу позитивно впливає на характеристики готової продукції (в даній роботі - пластикової плівки) [6].

Також новизною даної роботи є застосування безреагентного методу виділення полімеру з біомаси бактерій. Безреагентний метод із застосуванням в якості детергенту додецилсульфату натрію (ДДС-Na) дозволяє більш економічним способом отримувати високі виходи полімеру, що не забруднений домішками жирних кислот, і придатного для технічних цілей (тара, пакувальна продукція). Метод виділення полімеру за допомогою детергенту відрізняється від екстракції органічним розчинником, так як при обробці детергентом руйнуються і видаляються більшість клітинних компонентів, а полімер залишається у вигляді залишку, як окрема фракція [5].

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. УПАКОВКА НА БІОЛОГІЧНІЙ ОСНОВІ, ЯК ШЛЯХ ДО ВИРІШЕННЯ ЕКОЛОГІЧНОЇ ПРОБЛЕМИ

Розвиток науки і техніки, особливо за останні 2 десятиліття, призвів до виробництва низки синтетичних полімерів у всьому світі. Полімери - це ланцюги мономерів, пов'язані між собою хімічними зв'язками. Такі полімери, як лігнін, крохмаль, хітин тощо, присутні в навколишньому середовищі природним шляхом.

На сьогоднішній день синтетичні полімери використовуються в декількох галузях промисловості, із яких упаковка покриває 30% використання пластмас у всьому світі [7].

За останні роки засмічення пластиком та проблеми, пов'язані з його стрімким накопиченням в навколишньому середовищі, стали головними напрямками як у дослідженнях, так і в новинах. Виробництво пакувальних матеріалів з пластику зросло більш ніж у 20 разів з тих пір, як вони вперше почали широко використовуватися в 1960-ті (як показано на рис. 1.1). За підрахунками, за цей час було вироблено більш ніж вісім мільярдів тонн пластику [8, 9].

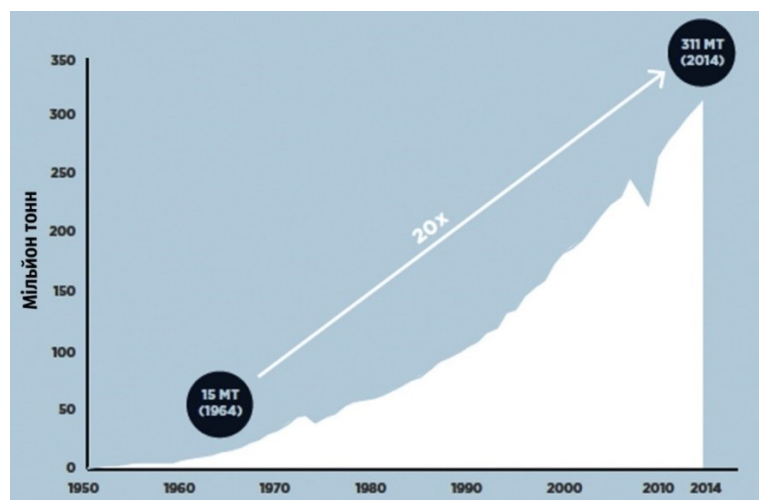


Рис.1.1. Зростання світового виробництва пластмас на рік [9].

					НУХТ БТЕК 02.02.15 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		<i>Черепанський В.В.</i>			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		<i>Грегірчак Н.М.</i>				9	10
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>					

Синтетичні полімери широко використовуються через їх довговічність та низьку вартість, але утилізація пакувального матеріалу, який виготовлений з даних речовин, стала проблемою сучасного світу. Зараз такі типи синтетичних сполук стали досить шкідливими для навколишнього середовища, впливаючи на такі природні ресурси як якість води та родючість ґрунту, з кожним роком все більше забруднюючи їх [10]. Ще більш шкідливим є так званий мікропластик, який утворюється внаслідок розщеплення пластикових відходів на дрібні фрагменти та частинки під дією атмосферних умов та мікробів, а також унаслідок дії ультрафіолету та процесів гідролізу [11].

Природа ґрунту може бути основним показником для розуміння ризиків, які мікропластик представляє для наземних екосистем, оскільки мікропластик може взаємодіяти з різними складовими ґрунту (рис. 1.2) [12].

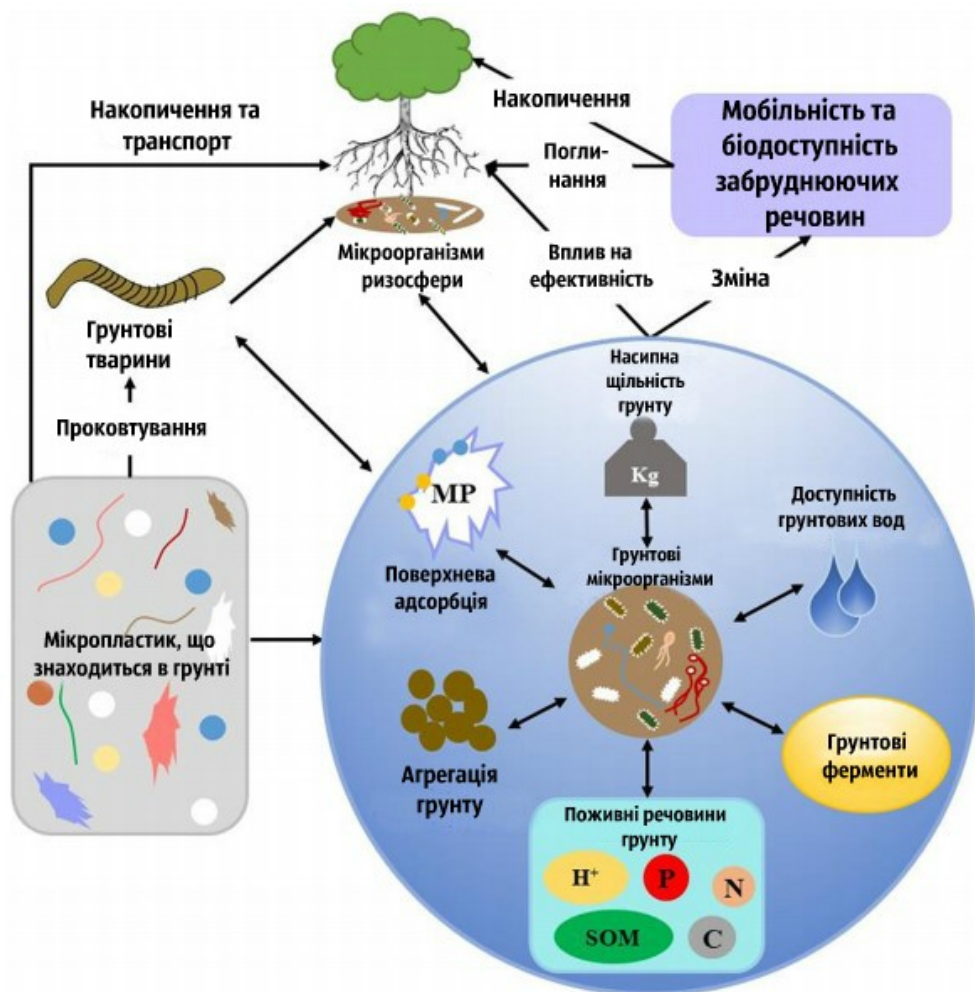


Рис. 1.2. Вплив мікропластику на функціонування екосистеми ґрунту.

Так, дослідження групою вчених на чолі з de Souza Machado A. A. [13] показало, що наявність у ґрунті мікропластику спричиняє негативні зміни у проникності та затримці води в ґрунті, що в свою чергу впливає на випаровування води, а також зниженні доступності води для рослин. На основі результатів досліджень Rillig M. C. та ін. [14] можна сказати, що мікропластик може змінити кругообіг води в ґрунтах, посилити дефіцит води в ньому та вплинути на міграцію забруднюючих речовин у глибокі шари ґрунту вздовж утворених тріщин.

Ферменти ґрунту з високою здатністю до каталізу тісно пов'язані з безліччю біохімічних процесів ґрунту; ці ферменти виступають як показник для оцінки родючості ґрунту і відіграють важливу роль у регулюванні кругообігу поживних речовин у ґрунті для таких органогенних елементів, як С, N та Н. У роботі Huang Y. та співавторів [15] продемонстровано, що мікропластик виявляє значний вплив на активність уреаз, каталазну активність, флуоресцеїндіацетат гідролазу (FDAse) та фенолоксидазу, яка може спричинити короточасні негативні зміни якості ґрунту.

Результати досліджень [16-18] показали, що особливості ґрунту та концентрація поживних речовин, які в ньому містяться, тісно корелюють з мікробною активністю ґрунту. Будь-які зміни, що відбуваються в ґрунті внаслідок накопичення в ньому мікропластику впливатимуть на розвиток мікроорганізмів, що в свою чергу порушить рівновагу природньої екосистеми ґрунту. Виходячи з результатів дослідження, яке висвітлене у дослідженні Rubol S. та співавторів [19] можна сказати, що зміни в пористості ґрунту та вологості ґрунту, спричинені мікропластиком, можуть змінити потік кисню в ґрунті, що змінить відносний розподіл анаеробних та аеробних мікроорганізмів. Також наслідком зміни в пористості ґрунту, спричинені мікропластиком, можуть призвести до втрати мікросередовища існування та вимирання мікроорганізмів [20].

Пластикові відходи у вигляді сміття потрапляють у водне середовище різними способами залежно від природи і в кінцевому рахунку забруднюють

морське середовище. Швидкість розповсюдження пластикових відходів дуже швидка, і на морське середовище такі відходи впливають у всьому світі. Дані відходи викликають ряд складних проблем у морському середовищі [21]:

1. Забруднення пластиком сміттям;
2. Пластик ускладнює морське життя;
3. Відбувається проковтування пластикових предметів морськими жителями;
4. Біологічне розкладання пластикових полімерів на нафтовій основі займає багато часу;
5. Мікропластик порушує харчовий ланцюг;
6. Порушення нормального стану середовища існування мешканців придонної області.

Вирішенням проблеми забруднення навколишнього середовища пластиком є активне впровадження упаковки виготовленої з біопластику. Термін «біопластик» охоплює ряд підгруп, включаючи (рис. 1.3) [22]:

- ✓ пластик на біологічній основі, але який не розкладається біологічно;
- ✓ пластик, який біологічно розкладається, але виготовлений не на біологічній основі;
- ✓ пластик на біологічній основі та який біологічно розкладається.

Біопластик виготовлений на основі полілактату відноситься до 3 групи з вище перелічених (пластик на біологічній основі та який біологічно розкладається).

	Нафтохімічні	Частково на біологічній основі	На біологічній основі
Небіодеградабельний	PE, PP, PET, PS, PVC	Біо-PET, PTT	Біо-PE
Біодеградабельний	PBAT, PBS(A), PCL	Крохмальні суміші	PLA, PHA, Целофан

Рис. 1.3. Типи пластику за здатністю до біодеградації та сировини, з якої вони виготовлені.

Зі збільшенням усвідомлення проблеми забруднення пластиком потреба в упаковці, яка виготовлена на основі полілактатів, яка потрапляючи в навколишнє середовище біологічно розкладаються до води та вуглекислого газу за достатньо короткий період часу, зростає. Завдяки тому, що період розпаду даної упаковки є коротким, і те, що вона виготовлена з біосумісної сировини, активне її використання не призведе до накопичення в навколишньому середовищі, а також буде відсутнє виділення токсичних та шкідливих речовин в ґрунт та водні ресурси. За останні 20 років ціни на упаковку з полілактатів впали з ≈ 1000 доларів США за кг до кількох доларів США за кг, і зараз вони на рівні цін, подібному до рівня цін на полістирол. Крім пластику, який виготовлений на основі полілактатів (PLA), на який припадає 24% глобальних виробничих потужностей серед біодеградабельних полімерів, переважають також крохмальні суміші. Також активно виробляються в промислових масштабах інші біодеградабельні полімери, такі як полі (бутиленсукцинат) (PBS), полі (бутилен-адіпаттерефталат) (PBAT) та полігідроксиалконати (PHA) (рис. 1.4) [8].

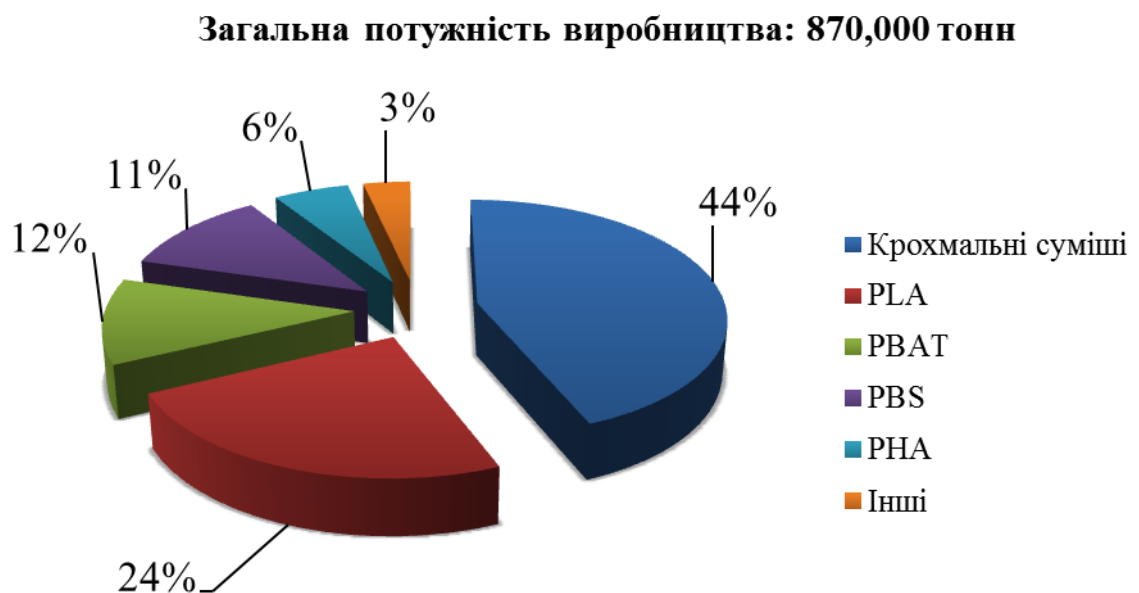


Рис.1.4. Світові виробничі потужності біодеградабельних пластмас у 2017 році [8].

Не дивно, що пошук біорозкладаних полімерів також став надзвичайно популярним у наукових дослідженнях: пошук терміну „біологічно розкладаний полімер” в Інтернеті дає понад 25 000 публікацій (станом на 2018 рік), включаючи велику кількість оглядів. Деякі з цих оглядів просто перелічують полімери, що біологічно розкладаються; інші пояснюють механізми деградації або методи випробування на деградацію; інші детально зосереджуються на конкретному класі біодеградуючих полімерів [8].

Багато зусиль було спрямовано на комерціалізацію нових біополімерів з поліпшеними властивостями та новими функціональними можливостями для упаковки та покриттів, а також текстильного застосування. Біополімери можуть бути отримані різними методами: або безпосередньо з природних речовин, що включають полісахариди та білки, або шляхом полімеризації мономерів, отриманих з біомаси, таких як PLA з молочної кислоти [23].

Далі в табл. 1.1 описано найбільш перспективні біополімери для пакування та крім цього, узагальнено ключові параметри матеріалів на біологічній основі для пакування.

У своєму дослідженні Piemonte V. [24] провів порівняння між виробництвом пластмас, які біологічно розкладаються та звичайних пластмас, та розглянув процес виготовлення від початкової до заключної стадії, щоб визначити первинні енергетичні потреби для виробництва упаковки PLA та упаковки, яка виготовлена на основі крохмальних сумішей, порівняно з упаковкою PET чи PP. Результатом стало зменшення енергетичних потреб на 27% - 40% для упаковки на біологічній основі. Упаковка на біологічній основі, як правило, має нижчий попит на невідновлювану енергію у виробництві через біогенну природу, на відміну від викопної природи вуглецю, що використовується для отримання синтетичної пластмаси.

Якщо товарну пластмасу потрібно замінити полімерами, що біологічно розкладаються, то вирішальне значення має оцінка варіантів кінцевих етапів їх використання. Поводження з відходами біорозкладаних полімерів

Таблиця 1.1

**Узагальнена характеристика матеріалів на біологічній основі, які
використовуються для пакування**

Назва матеріалу	Синтетичний/ Несинтетичний полімер	Класифікація	Мономер/ субодиниця	Загальна технологія виготовлення	Очікувана виробнича потужність до 2023 року (млн тонн)	Після закінчення використання
Полілактат (PLA)	Синтетичний/ несинтетичний	Аліфатичний поліестер	Молочна кислота (L- або D-ізомери)	Технологія полімеризації з відкриттям кільця; Поліконденсація; Метод бродіння	0.83	Промислове та домашнє компостування, механічна та хімічна переробка
Поліетилен фураноат (PEF)	Синтетичний	Ароматичний поліестер	2,5-фурандикарбоксилова кислота, моноетиленгліколь	Поліконденсація	Дані відсутні	Цільова переробка зі зростанням ринку
Полібутілен-суццинат (PBS)	Синтетичний	Аліфатичний поліестер	Бурштинова кислота та 1,4-бутандіол	Поліконденсація	0.54	Хімічна / каталітична переробка, ферментативна деполімеризація
Полігідрокси-алканоат (PHA)	Несинтетичний	Аліфатичний поліестер	Залежно від підтипу	Метод бродіння	0.17	Промислове та домашнє компостування
Целюлоза	Несинтетичний	Полісахарид	β -D-Глюкоза	Зустрічається в природі	0.03	Промислове та домашнє компостування

Закінчення табл. 1.1

<i>Крохмаль</i>	Несинтетичний	Полісахарид	D-Глюкоза	Зустрічається в природі	0.22	Повністю біологічно розкладається; Промисловий або домашній компост
------------------------	---------------	-------------	-----------	-------------------------	------	---

здійснюється в основному шляхом промислового компостування (рис. 1.5), тоді як товарна пластмаса зазвичай спалюється, переробляється або здається на звалище (це заборонено в ряді західних країн) [8]. У дослідженні групи вчених на чолі з Rossi V. [25] здійснено порівняння впливу на довкілля репрезентативного набору варіантів закінчення терміну експлуатації сухої упаковки, що використовується, припускаючи, що є можливості збору, сортування та переробки даних матеріалів. Ці автори не змогли перевірити гіпотезу про те, що компостування є більш екологічним, ніж енергетичне або матеріальне відновлення.

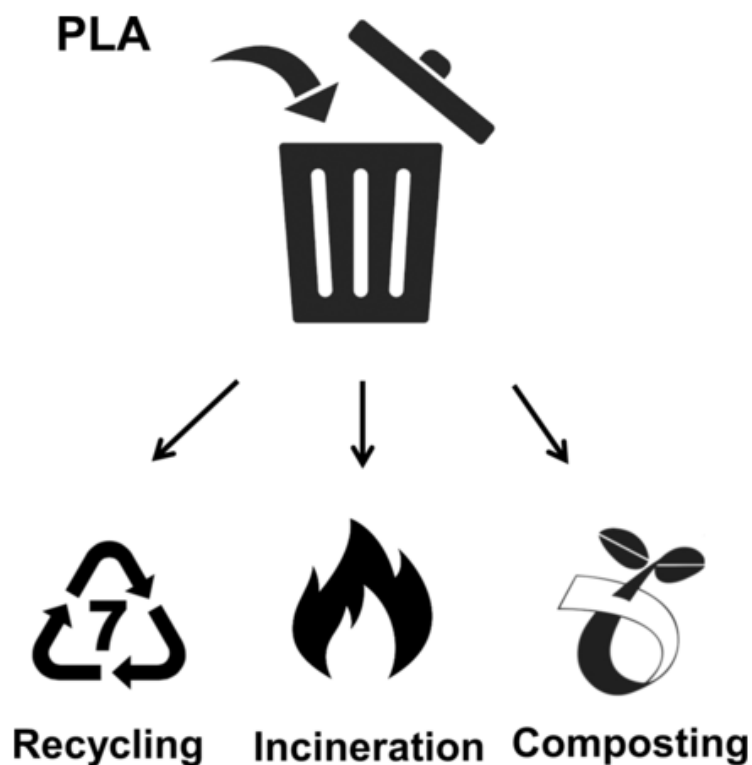


Рис. 1.5. Основні варіанти закінчення терміну експлуатації предметів з полілактату.

У 2012 році Detzel A. та співатори [26] прийшли до подібного висновку у звіті для Німецького агентства з охорони навколишнього середовища щодо біорозкладаної пластикової упаковки. Вони встановили, що компостування упаковки з пластмас, що біологічно розкладаються, не приносить жодних переваг ні живленню ґрунту, ні структурі ґрунту. Біорозкладані полімери не містять відповідного живлення для рослин; крім того, вони розкладаються

занадто швидко, щоб виступати в ролі структуруючого компонента для ґрунту.

Отже, накопичення пластику як на суші, так і в океанах є важливим питанням нашого часу, і сучасні тенденції прогнозують, що масштаб цього питання буде експоненціально зростати. Таким чином, вкрай важливо впроваджувати рішення щодо зменшення швидкості накопичення пластику, а також працювали над зменшенням впливу, який матиме неминуче зростання. Одним із рішень даної проблеми є активне впровадження упаковки із біопластику, а саме упаковки виготовленої на основі полілактату, що дасть змогу попередити виникнення проблем накопичення у навколишньому середовищі та шкоди для неї.

Не слід недооцінювати ефективність пластмас, що біологічно розкладаються у вирішенні питань накопичення твердих відходів, але в кінцевому рахунку це буде залежати від таких факторів, як:

- Розвиток морської біорозкладаної пластмаси (та стандарти);
- Законодавство, яке підтримує появу доступної технології сортування відходів та обладнання для переробки органічних відходів;
- Координовані зусилля щодо націлювання уваги на пластмасові матеріали, які, швидше за все, не підлягають вторинній переробці або можуть спричинити шкідливий вплив на навколишнє середовище.

РОЗДІЛ 2. ГЕННО-ІНЖЕНЕРНІ ПІДХОДИ ДО СТВОРЕННЯ ПРОДУЦЕНТІВ ПОЛІЛАКТАТІВ

2.1. Ключові ферменти для полімеризації лактату.

Як було описано вище, мономером полілактату є молочна кислота, яка у промисловості отримується шляхом мікробного бродіння цукрів, отриманих з відновлюваної сировини. Молочна кислота - одна з найпоширеніших гідроксикарбонових кислот в організмах і в основному синтезується з пірувату за допомогою лактатдегідрогенази (LdhA). Однак були відсутні дані про мікроорганізми, що продукують полілактат через відсутність метаболічних шляхів для полімеризації молочної кислоти в природі. Таким чином, генна-інженерія була зосереджена на розробці ферментативних шляхів, що полімеризують молочну кислоту на основі полігідроксиалканоат (РНА) біосинтетичного шляху: лактат перетворюється в лактил-КоА (оскільки полігідроксиалканоатсинтаза використовує тіоефірну форму КоА в якості субстрату), а потім лактил-КоА полімеризується за допомогою РНА-синтази в PLA [27].

2.1.1. Синтез лактил-КоА.

Для перетворення лактату у лактил-КоА обирають пропіоніл-КоА-трансферазу (Pct) на основі попередніх даних, що демонструючи як Pcts від декількох мікроорганізмів можуть переносити КоА з пропіоніл-КоА або ацетил-КоА до лактату. У дослідженні Yang T. H. та співавторів [28] дві Pct від *Clostridium propionicum* та *Megasphaera elsdenii* могли перетворити лактат у лактил-КоА, використовуючи ацетил-КоА як донора КоА. Однак, коли вони експресувались в клітинах бактерій *E. coli*, ріст клітин пригнічувався, що в кінцевому результаті може призвести до неефективного синтезу лактил-КоА *in vivo*. Таким чином, *C. propionicum* Pct еволюціонувала шляхом випадкового мутагенезу методом схильних до помилок ПЛР та процесів

					НУХТ БТЕК 02.02.15 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Черепанський В.В.			РОЗДІЛ 2. Генно-інженерні підходи до створення продуцентів полілактатів	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					19	10
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

скринінгу. Побудовано два варіанти Pct - Pct532 (Ala243Thr та одна мутація нуклеотидів A1200G) та Pct540 (Val193Ala та чотири тихі мутації нуклеотидів T78C, T669C, A1125G та T1158C).

Для експресії дикого типу Pct_{Ср} (WT), Pct532_{Ср} (532) та Pct540_{Ср} (540) у *E. coli* XL1-Blue використовували плазміди рТНСРРСТ, рТНСРРСТ532 та рТНСРРСТ540 відповідно. Рівну кількість цільноклітинних лізатів рекомбінантних клітин *E. coli* XL1-Blue, що відповідають 10 мл суспензії з OD₆₀₀ 3,0, розділяли електрофорезом додецилсульфат натрію – поліакриламідний гель і згодом проводили Вестерн-блот аналіз з анти-Pct_{Ср} антисироваткою (рис. 2.1).

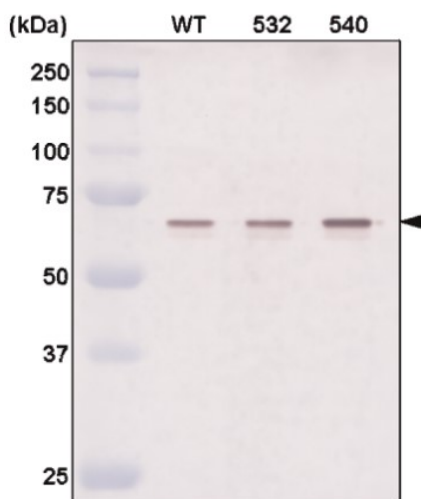


Рис. 2.1. Вестерн-блот аналіз цільноклітинних лізатів рекомбінантної *E. coli* XL1-Blue, що експресують Pct_{Ср} дикого типу та його мутантів [28].

Стрілка вказує смугу, що відповідає Pct_{Ср}.

Хоча обидва варіанти продемонстрували подібну або дещо нижчу специфічну активність до лактату порівняно з Pct дикого типу (рис.2.2), було доведено, що вони корисні для процесу синтезу PLA *in vivo* з кращим ростом клітин.

У дослідженні David Y. та співавторів [29] для синтезу лактил-КоА *in vivo* застосовуються інші трансферази КоА. Результати досліджень показали, що трансферази бутирил-КоА (Bcts) з *Roseburia* sp., *Eubacterium hallii*, *Faecalibacterium prausnitzii* та *Anaerostipes cacaе* демонструють активність

щодо лактату на додаток до 2-гідроксибутирату (2НВ) та 3НВ. За результатами досліджень Mizuno S. та співавторів [30] виявлено, що

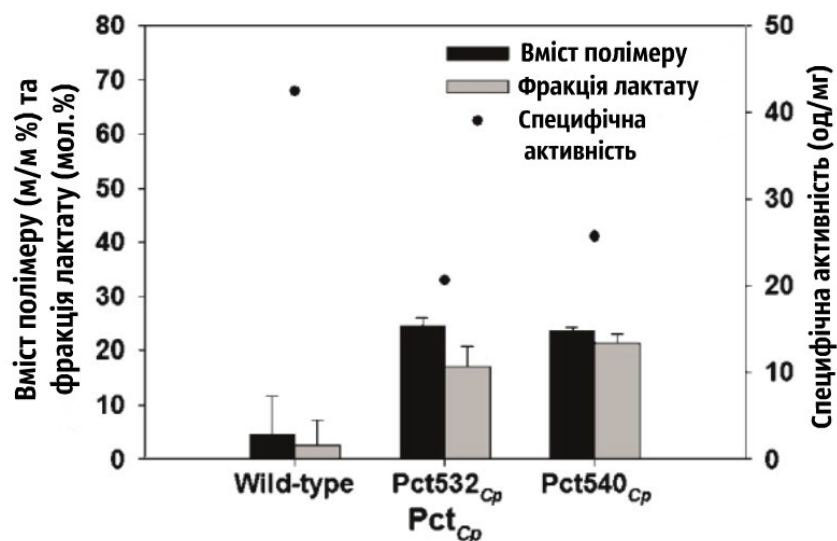


Рис.2.2. Активність *in vivo* та *in vitro* дикого типу Pct_{Cp} та його варіантів. ізокапреноїл-КоА: 2-гідроксиізокапроат (2НІС) КоА-трансфераза (HadA) з *Clostridium difficile* також здатна активувати лактат в лактил-КоА на додаток до його вихідного субстрату, 2НІС. Ці КоА-трансферази можуть активувати не тільки лактат, але й інші гідроксикарбонові кислоти (табл. 2.1). Таким чином, якщо застосовувати РНА-синтазу, що має активність як до LA, так і для другого мономеру гідроксикарбонової кислоти (НА), можна синтезувати кополімер. *C. propionicum* Pct може активувати 3НВ, 2НВ, 3-гідроксипропіонат (3НР), гліколат (GA), 4-гідроксибутират (4НВ), 5-гідроксивалерат (5НВ), 6-гідроксигексаноат (6ННх) та 2-гідроксиізовалерат (2НІВ), і в той же час також LA [31, 32].

Інші КоА трансферази, не згадані вище, також можуть застосовуватися для виробництва мікробного PLA. Наприклад, Pct від *Cupriavidus necator* H16 може бути використаний, оскільки він продемонстрував активність *in vitro* по відношенню до LA з 3НВ, 3НР і 4НВ і досі не застосовувався для синтезу полімерів (табл. 2.1).

Ферменти для активації лактату в лактил-КоА [33]

Тип ферменту	Джерело генів для здатності до синтезу ферменту	Мікроорганізми, які використовувались для експерсії генів	Примітка
Пропіоніл-КоА трансфераза (Pct)	<i>Clostridium propionicum</i>	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Cupriavidus necator</i> ; <i>Sinorhizobium meliloti</i> ; Мутанти Pct532, Pct540.	Фермент також виявляє активність щодо 3НВ, 3НР, 2НВ, GA, 4НВ, 5НВ, 6ННх та 2НІV.
	<i>Megasphaera elsdenii</i>	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Corynebacterium glutamicum</i> ;	Фермент також виявляє активність щодо 3НВ, 2НВ та GA
	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Escherichia coli</i>	Фермент також виявляє активність щодо 3НВ.
	<i>Cupriavidus necator</i> H16	<i>Escherichia coli</i>	Фермент також виявляє активність щодо 3НВ, 4НВ та 3НР
Бутирил-КоА трансфераза (Bct)	<i>Roseburia sp.</i>	<i>Escherichia coli</i>	Фермент також виявляє активність щодо 3НВ та 2НВ
	<i>Eubacterium hallii</i>	<i>Escherichia coli</i>	Фермент також виявляє активність щодо 3НВ та 2НВ
	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<i>Escherichia coli</i>	Фермент також виявляє активність щодо 3НВ та 2НВ
	<i>Anaerostipes caccae</i>	<i>Escherichia coli</i>	Фермент також виявляє активність щодо 3НВ та 2НВ
Ізокапреноїл-КоА: 2НІС КоА-трансфераза (HadA)	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Escherichia coli</i>	Фермент також виявляє активність щодо 2НІV, 2Н3MV, 2НІС, GA, 2НВ, 3НВ, 4НВ, 5НВ, 6ННх, МА, 4НМА, PhLA, 4НPhLA, 2Н4PhVA, 3Н3PhPA, 4НBeA

2.1.2. Полімеризація лактил-КоА в полілактат.

Для здійснення полімеризації лактату *in vivo* розглядаються різні РНА-синтази з різних мікробних штамів (табл. 2.2), які можуть включати лактил-КоА в РНА. Аналіз на РНА-синтазу може бути проведений як *in vivo*, так і *in vitro*, коли Pct (або інша відповідна трансфераза КоА) використовується для подачі лактил-КоА до РНА-синтази.

Оскільки природні РНА-синтази не виявляли жодної або лише мінімальної активності щодо лактил-КоА, застосовано генну інженерію для розробки варіантів РНА-синтази із підвищеною активністю та специфічністю до лактил-КоА.

Синтези РНА від *Pseudomonas MBEL sp. 6-19* та *Pseudomonas sp. 61-3* були відібрані та мутовані за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу амінокислотних залишків, які, як повідомляється, впливають на специфічність та активність ферментних субстратів. Було виявлено, що чотири амінокислотні залишки (Glu130, Ser325, Ser477 та Gln481) мають значний вплив на активність ферментів до лактил-КоА. Зокрема, заміни Glu130Asp, Ser325Thr, Ser477Arg / His / Phe / Gly та Gln481Lys / Met були ефективні для отримання *in vivo* сополімерів PLA та LA. Всі варіанти РНА-синтази, що використовуються для полімеризації лактил-КоА, наведені в табл. 2.2 [33].

Таблиця 2.2

Ферменти, які можуть бути використані для полімеризації лактил-КоА [33]

Назва ферменту	Джерело генів для здатності до синтезу ферменту	Мутації	Мікроорганізми, які використовувались для експерсії генів	Примітка
РНА-синтаза II класу	<i>Pseudomonas sp. MBEL 6-19</i>	E130D/Q481K E130D/Q481M E130D/S325T/Q481K E130D/S325T/Q481M E130D/S325T/S477R/Q481K E130D/S325T/S477F/Q481K	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Cupriavidus necator</i> ; <i>Sinorhizobium meliloti</i> .	Активний на КоА тіоестрах 3НВ, 2НВ, GA, 4НВ, 5НІV

РНА-синтаза II класу	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	E130D/Q481K E130D/S477F/Q481K E130D/S325T/Q481K E130D/S325T/S477F/Q481K E130D/S325T/S477G/Q481K	<i>Escherichia coli</i>	Активний на КоА тіоестрах ЗНВ
	<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3	E130D/Q481K E130D/S477F/Q481K E130D/S325T/Q481K E130D/S325T/S477F/Q481K E130D/S325T/S477G/Q481K	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	Активний на КоА тіоестрах ЗНВ, 2НВ та GA
	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	E130D/Q481K E130D/S477F/Q481K E130D/S325T/Q481K E130D/S325T/S477F/Q481K E130D/S325T/S477G/Q481K	<i>Escherichia coli</i>	Активний на КоА тіоестрах ЗНВ
	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	E130D/Q481K E130D/S477F/Q481K E130D/S325T/Q481K E130D/S325T/S477F/Q481K E130D/S325T/S477G/Q481K	<i>Escherichia coli</i>	Активний на КоА тіоестрах ЗНВ
	<i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i>	E130D/Q481K E130D/S477F/Q481K E130D/S325T/Q481K E130D/S325T/S477F/Q481K E130D/S325T/S477G/Q481K	<i>Escherichia coli</i>	Активний на КоА тіоестрах ЗНВ
	<i>Pseudomonas</i> sp. SG4502	S324T/Q480K	<i>Escherichia coli</i>	Активний на КоА тіоестрах ЗНВ
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 1317	S325T/Q481K E130D/S325T/F392S/S477G/Q481K E130D/S325T/S477G/Q481K	<i>Escherichia coli</i>	Активний на КоА тіоестрах ЗНВ та ЗНР

У дослідженнях [34, 35] подібним чином, інші РНА-синтази з різних штамів *Pseudomonas* також були удосконалені шляхом сайт-спрямованого мутагенезу на чотирьох залишках амінокислот, і отримані варіанти показали підвищену специфічність субстрату до лактил-КоА. Множинне вирівнювання послідовностей РНА-синтаз показано на рис. 2.3.

Штами
мікроорганізмів

Амінокислотна послідовність

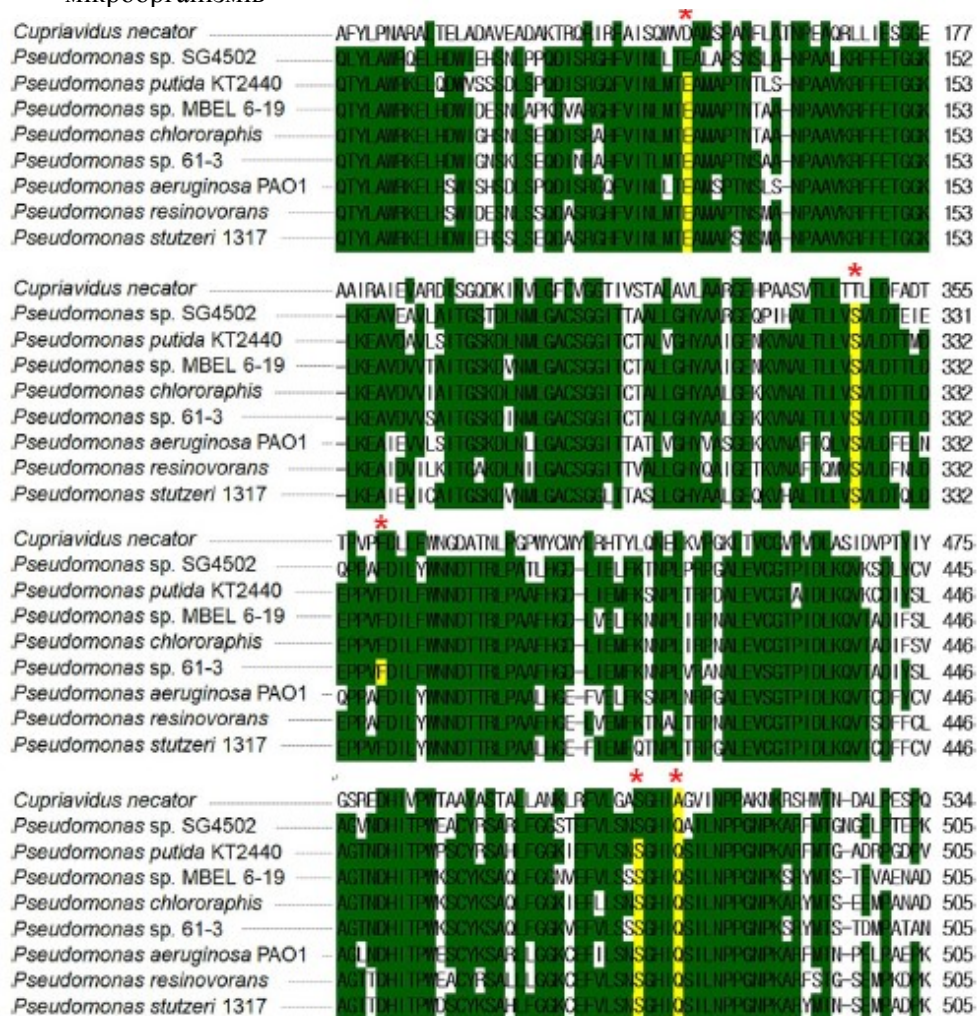


Рис. 2.3. Множинне вирівнювання послідовностей РНА-синтаз використовуваних для полімеризації лактату.

Важливі залишки амінокислот для полімеризуючої активності щодо лактату позначені - *.

Крім того, варіанти РНА-синтази *Cupriavidus necator*, що містять амінокислотні заміни на Ser506 та Ala510, що відповідають Ser477 та Gln481 *Pseudomonas* РНА-синтази, можуть синтезувати лактатвмісні полімери [31].

2.2. Штами мікроорганізмів, які здатні в один етап синтезувати лактатвмісні полімери.

Ферментативна полімеризація LA була забезпечена завдяки використанню Pct (або Vct, NadA) та розробленій РНА-синтазі. Це може спростити поточний біохімічний гібридний процес виробництва PLA до одностадійного ферментативного виробництва. Створені мікроорганізми, оснащені як біосинтетичними, так і полімеризуючими синтетичними

шляхами LA, можуть бути використані як фабрики клітин, які перетворюють недорогі джерела вуглецю, такі як глюкоза та ксилоза, в PLA у результаті їх метаболізму [33].

Дослідження Dudley Q. M., Karim A. S. та Jewett, M. C. [36] показали, що порівняно із синтезом *in vitro* PLA за допомогою КоА трансферази та інженерної РНА-синтази, синтез *in vivo* PLA за допомогою мікробного штаму має ряд переваг. Система синтезу *in vivo*, як правило, є більш надійною в порівнянні з системою *in vitro*, оскільки зберігається стабільність ферментів та проміжних продуктів (метаболітів) попри зміну параметрів процесу у певному діапазоні, таких як рН та температура. Крім того, мікробна система не вимагає очищення ферментів та регенерації кофакторів, що є одними з найдорожчих процесів. Особливо, оскільки широкомасштабний процес ферментації LA добре налагоджений, лабораторну систему синтезу PLA *in vivo* можна легко перенести на промислове виробництво [33].

Підходи для оптимізації метаболічних шляхів з метою синтезу PLA можуть бути раціонально підібрані на основі наявної інформації про метаболічні шляхи та залучені ферменти. Наприклад, ген *ldhA*, що кодує лактатдегідрогеназу, що перетворює піруват у лактат, може бути обраний цілком ампліфікації для сприяння біосинтезу LA. Ампліфікація була здійснена будь-яким способом: заміною нативного промотору *ldhA* на промотор *trc*, який може сильніше експресувати ген *ldhA* в порівнянні з нативним промотором, шляхом видалення природних регуляцій нативного промотору або надмірного експресії гена *ldhA* на основі плазмідної системи [31, 37]. У дослідженні Jung, Y. K. та Lee, S. [38] розглядається інший підхід, що передбачає інактивацію метаболічних шляхів, які можуть зменшити метаболічні потоки у напрямку до лактату. У цьому контексті ген *pflB*, що кодує піруватформіатліазу, видалали з хромосоми для підвищення рівня пірувату, блокуючи перетворення пірувату у форміат, очікуючи, що збільшення кількості пірувату буде спрямований на синтез лактату.

Інший підхід передбачає відтворення в системі *in silico* метаболічної моделі в масштабі геному. Він може ідентифікувати хромосомні гени, які слід видалити або надмірно експресувати для збільшення темпів продукування PLA, враховуючи швидкість росту клітин. В дослідженні Jung Y. K. та співавторів [39] з результатів моделювання було обрано два цільові гени - ген *adhE*, що кодує ацетальдегід / алкогольдегідрогеназу, та ген *acs*, що кодує ацетил-КоА-синтетазу. Дійсно, вибивання *adhE* та надмірна експресія *acs* шляхом заміни природного промотору на більш сильний промотор були ефективними для виробництва PLA та полі (LA-со-3НВ). Проведені маніпуляції узагальнені на рис. 2.4. Продуктивність мікробного штаму може бути ефективно підвищена шляхом одночасного здійснення декількох маніпуляцій.

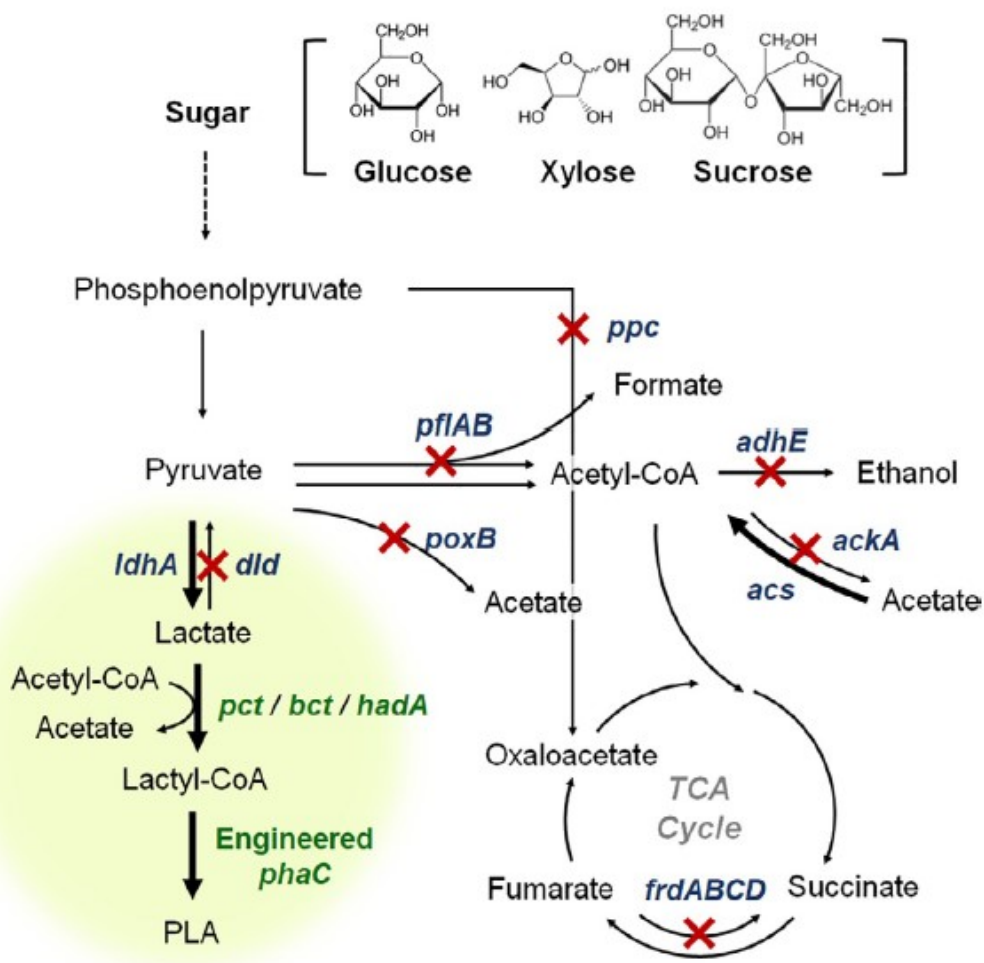


Рис. 2.4. Метаболічна інженерія для виробництва PLA із цукрів.

Отже, для синтезу PLA шляхом одностадійного ферментативного виробництва з відновлюваної сировини був розроблений та побудований неприродний метаболічний шлях для полімеризації LA на основі добре відомого мікробного полієфіру, біосинтетичного шляху PHA. У цьому новому біосинтетичному шляху PLA LA може бути перетворений в лактил-КоА за допомогою Pct, Vct або HadA, а потім лактил-КоА може бути полімеризований в PLA за допомогою сконструйованої PHA-синтази. Ключовим проривом у побудові цього шляху було те, що природні PHA-синтези, які мають лише незначну активність щодо лактил-КоА, були успішно удосконалені для сприйняття лактил-КоА з підвищеною специфічністю субстрату та активності. Ця мікробна система має ряд переваг перед сучасними процесами, що полягають у ферментації з подальшим хімічним процесом полімеризації. По-перше, це спрощує нинішній багатоступеневий процес виробництва PLA в одноступеневе бродіння з використанням відновлюваної сировини. По-друге, мікробна система відкриває можливість отримання різних сополімерів, що надають більш різноманітні властивості матеріалу. По-третє, коли застосовується одноступеневий процес бродіння очищення полімерів є простим та економічно вигідним. Проста екстракція розчинником або навіть помірно лужне дигерування можуть бути використані для очищення полімеру, продукованого мікроорганізмами.

Застосовуючи два ключові ферменти КоА-трансферази та сконструйовану PHA-синтазу, отримано можливість подальшого розвитку для платформи штамів, які ефективно перетворюють дешеві вуглеводи, такі як глюкоза, у PLA *in vivo*. Було логічно вибрано та видалено кілька хромосомних генних мішеней, щоб інактивувати утворення побічних продуктів. Крім того, за допомогою моделювання *in silico*, що аналізує метаболічні потоки в масштабі генома, вдалось отримати PLA більш ефективно.

РОЗДІЛ 3. ОСОБЛИВОСТІ ПРОЦЕСУ БІОДЕГРАДАЦІЇ ПОЛІЛАКТАТУ МІКРООРГАНІЗМАМИ

Вплив на матеріали, що виготовлені на основі PLA, різних умов навколишнього середовища призводять до їхньої деградації. Незворотні зміни, що відбуваються в полімері, спричинені деградацією, призводять до втрати його властивостей. PLA може природним чином руйнуватися навіть простим гідролізом складних ефірних зв'язків [40]. Після впливу відповідних умов, що складаються з комбінації вологи, кисню та мікроорганізмів, PLA розкладається на воду, діоксид вуглецю та незначну кількість нетоксичного надлишку матеріалу, що є головною перевагою використання PLA. На швидкість деградації PLA впливають різні фактори, серед яких співвідношення ізомерів, температура гідролізу, рН, час захоронення, вологість, кисень, форма та розмір матеріалу. На рисунку 3.1 показано кількість опублікованих статей, які досліджували чотири механізми деградації PLA. Механізми ферментативної та мікробної деградації представляють особливий інтерес, оскільки ці процеси дуже важливі для відновлення PLA до CO₂ та води [41].

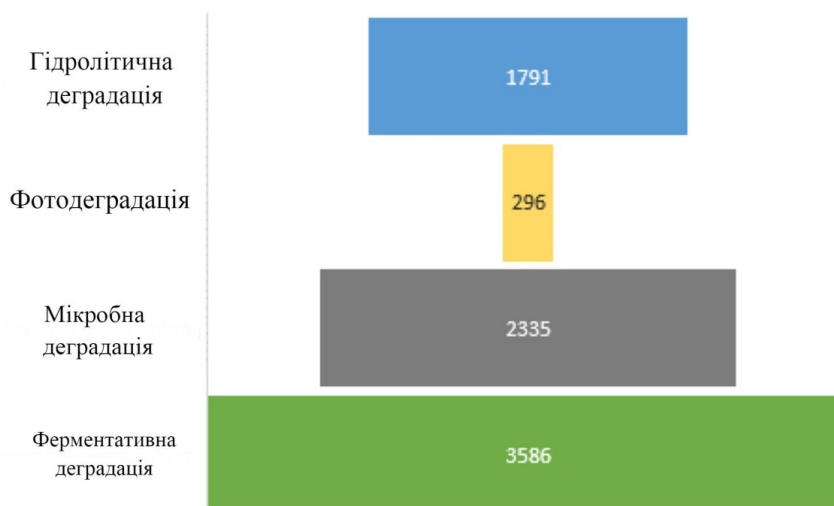


Рис. 3.1. Кількість статей, опублікованих про різний тип деградації PLA [40]

НУХТ БТЕК 02.02.15 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		<i>Черепанський В.В.</i>		
Перевір.		<i>Грегірчак Н.М.</i>		
Консультант				
Н. Контр.				
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>		
РОЗДІЛ 3. Особливості процесу біодеградації полілактату мікроорганізмами				
			Літ.	Арк.
			29	10
Кафедра БТМ				

Мікробна деградація описується як мікробне перетворення органічних сполук у менш токсичні або більш корисні форми або в лабораторії, або в природному середовищі. Мікробні механізми деградації вступають в дію після гідролізу високомолекулярного PLA [41]. На рис. 3.2 представлена принципова схема мікробної деградації PLA [42]. Згідно з рис. 3.2, мікроорганізми, що здійснюють процес деградації PLA, спочатку синтезують позаклітинні деполімерази для розщеплення PLA. Як правило, для стимулювання процесу необхідні такі індуктори, як желатин, еластин, фіброїн шовку, а також деякі амінокислоти та пептиди. В результаті ланки внутрішньомолекулярних реакцій PLA націлених на деполімеразію, утворюються олігомери, димери та мономери, які вже можуть проникати через мікробні мембрани. У кінцевому підсумку внутрішньоклітинні ферменти розкладають PLA до вуглекислого газу, води або метану [41].

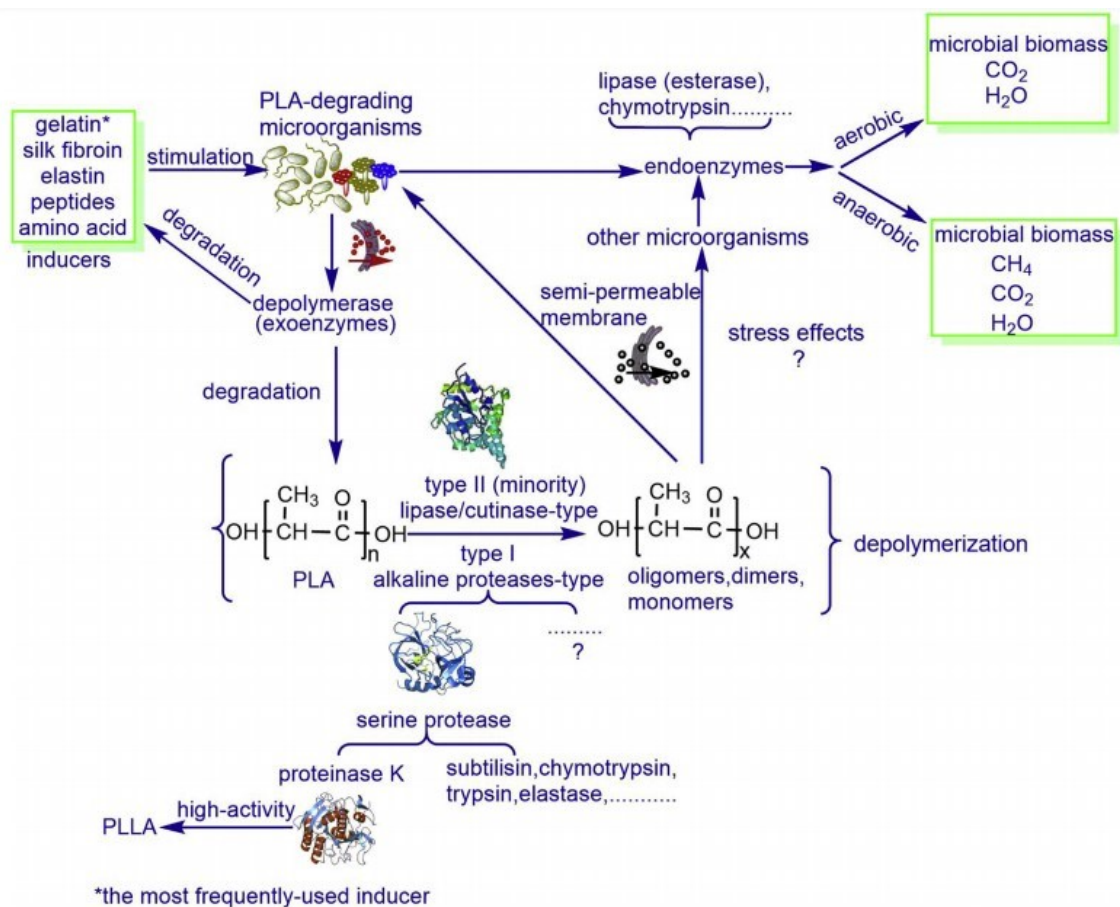


Рис. 3.2. Принципова схема біохімічних процесів при деградації PLA.

Порівняно з іншими матеріалами, що піддаються біодеградації, PLA вимагає тривалого розкладання в ґрунті, оскільки PLA стійкий до мікробної атаки. Кілька досліджень повідомляють про збільшення швидкості біологічного розкладання PLA шляхом включення мікробного консорціуму, що містить мезофільні бактерії, актиноміцети, *Actinomadura keratinilytica*, *Laceyella sacchari*, *Nonomuraea* spp, *Thermoactinomyces vulgaris* та *Bordetella petrii* та ін. [41].

3.1. Актиноміцети. Актиноміцети - це ниткоподібні бактерії, які переважно виявляються в ґрунті, які добре відомі як виробники антибіотиків. Деякі актиноміцети ефективно розкладають полієфіри, включаючи PLA, PCL, PHB та полі (етиленсукцинат). Першим повідомленням про мікроорганізм, який здатний до деградації PLA, був *Amycolatopsis* HT-32, який був успішно виділений із ґрунту за допомогою диско-дифузійного методу. Було встановлено, що при додаванні 100 мг плівки до рідкого середовища з даним штамом, після 14 діб культивування деградували близько 60 мг плівки. Після цього було проаналізовано 25 штамів *Amycolatopsis*, з яких 15 штамів виявили здатність до деградації гранул PLA. Дане дослідження показало, що біодеградацію PLA можуть здійснювати в цілому представники даного роду.

За даними досліджень Jarerat та співавторів, які наведені у літературному джерелі [42], аналізуючи 41 рід (105 штамів) актиноміцетів на основі послідовностей 16SpPHK, виявляється, що мікроорганізми, які здатні до деградації PLA обмежені представниками сімейства *Pseudonocardiaceae* та суміжних родів. Вони включають *Amycolatopsis*, *Saccharothrix*, *Lentzea*, *Kibdelosporangium* та *Streptoalloteichus*, які відіграють ключову роль у мікробній деградації PLA. Після цього, з розвитком суміжних молекулярно-біологічних методів, деякі дослідники виявили велику кількість актиноміцетів, що руйнують PLA [42].

3.2. Бактерії. Порівняно з актиноміцетами, бактеріальна деградація PLA рідко зустрічається в літературних джерелах. Узагальнюючи інформацію, яка

наведена у роботах вчених Jeon та співавторів [43] і Penkhrue та співавторів [44], до PLA-деградуючих бактерій належать *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* та ін (рис. 3.3). Деякі дослідження показують, що бактерії, що руйнують PLA, достатньо мало поширені в природному середовищі. Перші повідомлення про бактерій, що руйнують PLA, були про *Bacillus brevis*, які виділили із 144 зразків ґрунту із використанням середовища збагачення. Дослідження, засноване на бактеріальному розкладі PLA, надасть величезну корисну інформацію для досліджень ферментів, що розкладають PLA. Бактерії, що деградують PLA, в основному походять від фірмікутів.

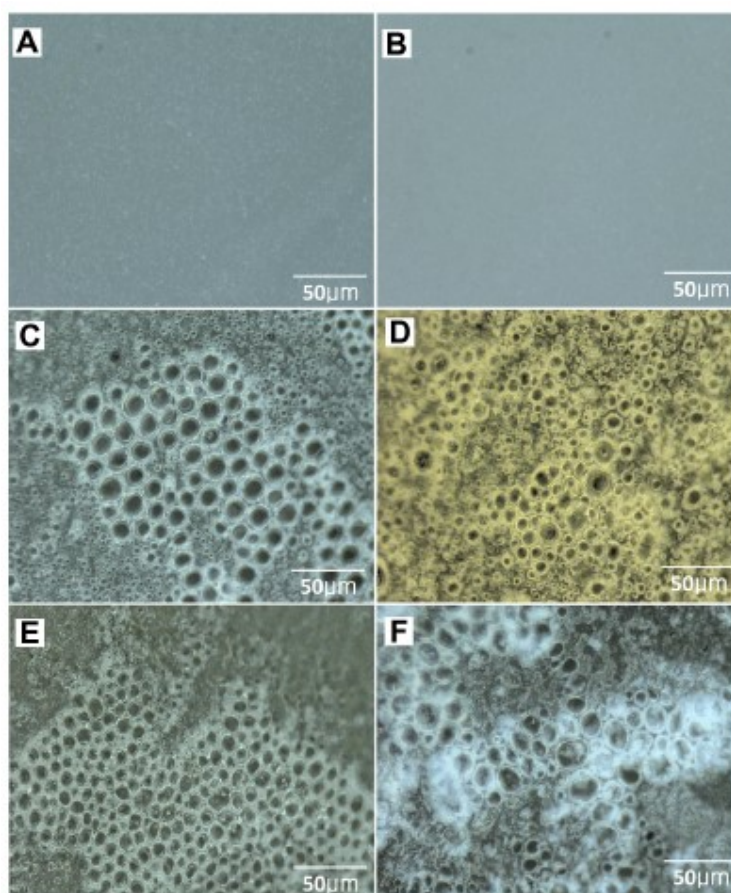


Рис. 3.3. Зображення оптичної мікроскопії плівки PLA. (А) Абіотична плівка PLA на пластині (неінокульований контроль). (В) Інокульована плівка PLA через 0 днів. (С) Плівка PLA з *Bacillus* sp. MYK2 після 2 днів інокуляції. (D) Плівка PLA з *Pseudomonas* sp. MYK1 через 2 дні інкубації. (E) Плівка PLA з *Bacillus* sp. MYK2 після 2 тижнів інокуляції. (F) Плівка PLA з *Pseudomonas* sp. MYK1 після 2 тижнів інкубації [45].

Більше того, більшість з них належать до термофільних бактерій.

3.3. Гриби. Інформація щодо деградації PLA за участі грибів міститься в обмеженій кількості досліджень у літературі. Перші дослідження щодо здійснення деградації PLA були зроблені у 1996 році. В даних дослідженнях було виявлено, що лише два з 14 ниткоподібних штамів грибів (*Fusarium moniliforme* та *Penicillium roqueforti*) змогли асимілювати DL-молочну кислоту в рідкій культурі. У дослідженні Jagerat та Tokiwa, яке згадується у літературному джерелі [40], деградація PLLA грибами також була вивчена за допомогою *Tritirachium album* (ATCC 22563) у рідкій культурі. У даному дослідженні вивлено, що більша частина PLA-плівки розкладається через 14 днів культивування даного штаму за додавання желатину. Однак багато досліджень головним чином зосереджувались на деградації PLA чистими культурами грибів [42]. Деякі дослідники досліджували деградацію PLA грибами в ґрунті та компості. Так, у матеріалах досліджень Karamanlioglu M. та співавторів [46], встановлено, що температура є ключовим параметром, що впливає на деградацію PLA грибами.

Узагальнена інформація щодо основних мікроорганізмів, які здатні до деградації PLA наведена в *табл. 3.1*.

Більшість досліджень з біодеградації PLA були проведені з метою виявлення деяких нових мікроорганізмів протягом останніх десятиліть і в основному зосереджені на лабораторних умовах. Тим не менше, біодеградація PLA є досить складним питанням у реальному середовищі. З розвитком сучасних молекулярно-біологічних методів, таких як ПЛР, високопродуктивна технологія секвенування та FISH, деякі склади мікробних спільнот були вивчені при рекультивациі ґрунту. Однак декілька досліджень зосереджувались на складі мікробної спільноти, що бере участь у біодеградації PLA. Адже знання поведінки бактеріальних спільнот також має вирішальне значення для розуміння організації мікробної спільноти, яка бере участь у руйнуванні матеріалів [42].

3.4. Різні середовища - різний рівень біологічного розкладання.

Найважливішим аспектом, що стосується швидкості біодеградації, є, мабуть, безпосереднє середовище, в яке потрапив полімер: біодеградація полієфіру *in vivo* у присутності багатьох ферментів та постійно мінливих середовищ, очевидно, буде сильно відрізнятися в порівнянні з тим самим зразком полімеру в морському середовищі. Швидкість біологічного розкладання залежить від концентрації ферментів, мікроорганізмів, температури, значення рН, вологості, надходження кисню та світла [51]. Всі ці фактори різняться в різних середовищах. Наприклад, температура може варіюватися від 65 °С у місцях промислового компостування до точки замерзання в Арктичному морі. Що стосується значень рН, ґрунти можуть виявляти нейтральні значення рН (наприклад, суглинистий ґрунт), а також кислі (наприклад, твердолистяний ґрунт) та нейтральні значення (суглинисті ґрунти з високим вмістом карбонату кальцію) [8].

Також значення суттєво різняться, враховуючи загальну концентрацію мікроорганізмів у різних середовищах. Наприклад, для компосту значення варіюється 10^7 – 10^8 колонієутворюючих одиниць на грам матеріалу та лише 10^6 у ґрунті. Для морської води це значення приблизно 10^6 КУО/мл. Проте важливим є не лише загальна кількість мікроорганізмів, а й їх здатність руйнувати кожен полімерний субстрат [8].

Важливо порівняти швидкість біологічного розкладання одного і того ж полімеру в різних середовищах, щоб оцінити наслідки постійного використання та гарантувати обґрунтований профіль деградації для передбачуваного застосування або використати ці дані в прогнозуванні раціональних рішень щодо відходів. Це розглянуто на прикладі PLA. На рис. 3.4 узагальнено біорозкладаність PLA у компості, ґрунті та воді. PLA - це гідрофобний напівкристалічний полімер з температурою склування (T_g) близько 60 °С. Вище значення T_g ланцюги в аморфних областях полімеру стають гнучкими, посилюючи процес деградації, що гарантує промислове компостування (місця мають температуру до 65 °С). Більше того, вологість у

Мікроорганізми та ферменти, які здатні до деградації PLA [40, 47-50]

Штам	Субстрат	Джерело виділення штаму	Тип ферментів	pH	T, °C
1	2	3	4	5	6
<i>Актиномицети</i>					
<i>Amycolatopsis strain</i> HT-32, No.3118, KT-s-9	PLLA	Грунт	Протеаза	-	-
<i>Amycolatopsis</i> K104-1	PLLA	Грунт	Протеаза	9.5	55-60
<i>Amycolatopsis</i> 41	PLLA	Грунт	Протеаза	6.0	37-45
<i>Amycolatopsis thailandensis</i> PLA07	PLLA	Грунт	Протеаза	-	-
<i>Amycolatopsis</i> SCM MK2-4	PLLA	Грунт	Протеаза	-	-
<i>Actinomadura</i> T16-1	PLLA	Грунт	Протеаза	10.0	70
<i>Laceyella sacchari</i> LP175	PLLA	Грунт	Протеаза	9.0	60
<i>Pseudonocardia alni</i> AS4.1531(T)	PLLA	Грунт	Протеаза	-	-
<i>Бактерії</i>					
<i>Bacillus brevis</i>	PLLA	Грунт	-	-	-
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	PDLA	Грунт	-	-	-
<i>Bacillus smithii</i> PL21	PLLA	Сміття	Естераза	5.5	60
<i>Bacillus licheniformis</i>	PLLA	Компост	-	-	-
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> 13	PDLLA	Грунт	Ліпаза	10.0	50
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	PLLA	Грунт	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. DS04-T	PLLA	Активний мул	Ліпаза	8.0	50
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> LB 2-3	PLLA	Грунт	-	-	-

<i>Pseudomonas tamsuii</i> TKU015	PLA	Ґрунт	Ліпаза	10	60
<i>Alcanivorax borkumensis</i> ABO2449	PDLLA	-	Естераза	9.5-10	30-37
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> RPA1511	PDLLA	-	Естераза	9.5-10	55-60
<i>Гриби</i>					
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	PDLA	Стічні води	Кутиназа	7.0	37
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	PDLLA	Бродіння	Кутиназа	-	-

компості є відносно високою, що також сприяє деградації PLA. Як приклад, повний розпад зразка PLA розміром $33,0 \times 12,5 \times 3,0 \text{ мм}^3$ був здійснений через 60 днів при $55 \text{ }^\circ\text{C}$, тоді як молекулярна маса зменшилася з 130 000 до 5500 г/ моль [8].



Рис. 3.4. Вплив вологості, температури та концентрації (придатних) мікроорганізмів на біодеградацію PLA в різних середовищах

На відміну від них, у побутових умовах температури компостування, як правило, нижчі, ніж у промислових місцях проведення даного процесу. У польових випробуваннях у Греції, використовуючи плівки PLA товщиною до 440 мкм, була досягнута максимальна температура $42 \text{ }^\circ\text{C}$. Однак протягом цього 7-тижневого періоду випробувань температури здебільшого залишалися нижче $25 \text{ }^\circ\text{C}$, що призвело до зниження швидкості деградації. Через 7 тижнів полімерний матеріал став крихким, тоді як повний розпад спостерігався через 11 місяців. Цей результат схожий на показники біодеградації PLA у ґрунті, де температури зазвичай не перевищують $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Повний розпад зазвичай займає близько 1 року [52]. На відміну від цього, після закопування мотузок PLA на бананових полях в Коста-Ріці повідомлялося про швидке погіршення механічних властивостей лише через кілька тижнів. При середній температурі ґрунту $27 \text{ }^\circ\text{C}$ та вологості 80% міцність полімерного матеріалу на розрив та стиск зникає через 9 або 12

тижнів залежно від товщини зразка PLA. За цей час полімер втрачав приблизно 5700 г/моль на тиждень своєї молекулярної маси [8].

Хоча існує кілька досліджень, що стосуються деградації PLA в ґрунті, лише декілька робіт вивчають деградацію PLA у водних середовищах. У дослідженні Martin R. T. та співавторів [53] не спостерігали втрати ваги зразка PLA після 45 днів перебування в морській воді. Крім того, під час одночасного тесту на деградацію пляшки PLA та PHBV, проведеного Каліфорнійським департаментом переробки та відновлення ресурсів, пляшка PLA не виявила розпаду в морській воді через рік при 25 ° C, тоді як пляшка PHBV частково розпалася [54]. У дослідженні Bagheri A. R. та співавторів [55] порівнювалась біодеградація плівки PLA у штучній морській та прісній воді з плівками, виготовленими з PLGA, PCL, PHB, PET та полі (бутилен-адипаттерефталату) (PBAT, Ecoflex®). PLGA повністю розкладався через 280 днів, тоді як фольга PHB втратила близько 10% від своєї початкової ваги через 380 днів. Всі інші полімери (включаючи PLA) не демонстрували або лише мінімальну втрату ваги протягом цього часу.

Отже, ярлик «компостується» на PLA, який був визнаний та відзначений європейськими та американськими чиновниками, повинен бути переглянутий щодо часу та умов деградації. Однак PLA часто висувається як приклад біологічно розкладаного полімеру, що може заплутати як науковців, так і громадськість, оскільки деградація після засмічення землі або морської води насправді достатньо низька. Тому термін «біологічно розкладається» повинен включати детальну інформацію про випробовуване середовище та відповідні дані [56].

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ПЕРВИННОГО ПАКУВАННЯ ЛЗ

4.1. Передумови виробництва полілактату

Оскільки світовий фармацевтичний ринок продовжує демонструвати значне зростання, а його вартість, як очікується, досягла минулого року 1,3 трлн. дол. США, зусилля галузі щодо скорочення використання пластмас відіграватимуть значну роль у зменшенні глобального забруднення пластиком та викидів вуглекислого газу, пов'язаних із виробництвом пластмас [57].

Поліетилен (ПЕ), поліпропілен (ПП), полівінілхлорид (ПВХ), полістирол (ПС), поліуретан (ПУ) та фенольна смола - основні пластмаси, а ПП та ПЕ як полімери, що найчастіше використовуються у повсякденних виробках із пластмас, особливо одноразові вироби, такі як блістерна упаковка, пластикова упаковка для харчових продуктів, одноразові пляшки з водою, тощо. Такі види пластмас призначені для використання лише один раз і відомі як одноразові пластмаси (SUPs - single-use plastics). Щорічно виробляється близько 360 мільйонів тонн пластику, і приблизно половина з них призначена для використання в предметах одноразового використання [58]. З урахуванням таких обсягів пластику, які щороку викидаються, забруднення пластиком залишається важливою екологічною проблемою, оскільки у навколишнє середовище щороку потрапляє до 10 мільйонів тонн пластику [57].

Пластмаси виготовляються з нафти, і передбачається, що виробництво 380 мільярдів виробів з поліетилену щороку в світі використовує 1,6 мільярда літрів нафти. Однак після одноразового використання більшість SUP утилізуються на звалищах або спалюються, що спричиняє втрату цінних

					НУХТ БТЕК 02.02.15 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		<i>Черепанський В.В.</i>			РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для первинного пакування ЛЗ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		<i>Грегірчак Н.М.</i>					39	30
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>						

ресурсів, і більше того, відходи SUP накопичуються в океанах, річках та ґрунтах, що спричиняє несприятливий вплив на навколишнє середовище [59].

Також виявилось, що SUP повільно розкладаються та фрагментуються на невеликі шматочки діаметром менше 5 мм, відомі як вторинний мікропластик, утворені у результаті впливу УФ-опромінення, тепла або механічного навантаження. Оскільки мікропластик легко розпадається на маленькі частинки його важче захопити, ніж пластик більшого розміру, і тому забруднення ним постійно зростає. Останнім часом велика частина досліджень припускає існування мікропластику у прісноводних озерах та річках, також його виявляють навіть у питній воді [60].

Починаючи з 1950-х років, глобальне виробництво пластмас зростало в середньому на 9% на рік. Якщо базуватись на 1,7 млн. тонн у 1950 році, виробництво у всьому світі досягло ~ 360 мільйонів тонн у 2018 році (див. рис. 4.1). Полімери SUP - це найбільший сегмент загальної пластмаси, що виробляється в багатьох частинах світу. Повідомляється, що обсяги виробництва складають половину від загальної кількості пластику [58].

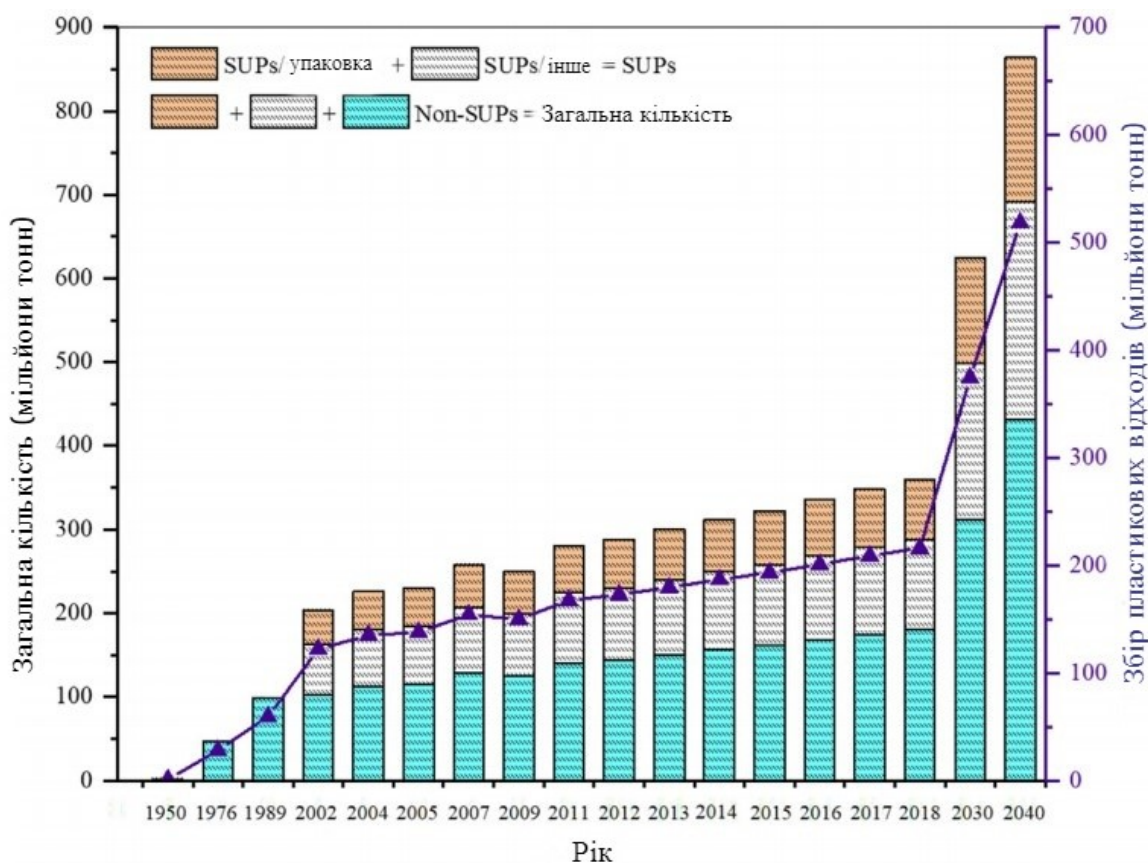


Рис. 4.1. Світові тенденції зростання виробництва пластмас та SUP [58].

До 2050 р. земна поверхня може стати забрудненою 12 млрд. т сміття з пластику, якщо відношення до відходів не зміниться. Значна частина полімерних відходів (6,3 млрд. або 79%) виявилася на звалищах і водоймах. За даними "WorldWatch Institute", щорічно від 9 до 18 млн. т пластика потрапляють у Світовий Океан. На кожного жителя планети припадає близько 1 тонни відходів. Переважна більшість виробів з пластмас не відноситься до категорії біорозпадаючих матеріалів. Через сміття, що накопичується в річках і озерах, морях і океанах, на земній поверхні, страждає і флора, і фауна [61].

Серед 120 країн світу Україна займає 105 місце по ступеню забруднення навколишнього середовища. Суттєвою екологічною проблемою України є шар сміттєвих, звалищ що покриває понад 6,5 тис гектарів її території. Майже половина цього шару складається з пакувальних полімерних матеріалів. На відміну від залишків паперової та картонової тари, полімерне сміття сотню і більше років буде отруювати природу [61].

Щороку в Україні утворюється понад 11,5 млн тон твердих побутових відходів (з них 50 % складають використані упаковки, здебільшого полімерної та комбінованої, більшість різновидів якої не піддається процесам біологічного розкладання і може багато років знаходитися у ґрунті), з яких спрямовується на переробку не більше, ніж 4%. До тепер урядом країни: не розроблено ефективного способу стимулювання населення сортувати сміття; не створено належних умов поводження з відходами ПЕТ-тари, упаковки, пакувальних матеріалів тощо; не визначено сценарій розвитку підприємств з переробки пластикових відходів на перспективу тощо.

Наявна структура галузі поводження з відходами пластику не дозволяє реалізувати економічний потенціал його вторинного використання та зменшити навантаження на навколишнє середовище. Більшість діючих полігонів морально та фізично застаріли і вже сьогодні неспроможні приймати їх зростаючий обсяг [62].

Кожна галузь у всьому світі стикається з посиленням тиску на рішення, щодо впровадження, так званих «eco-friendly» процесів для захисту планети та майбутніх поколінь. Скорочення відходів та перехід на використання біодеградабельних матеріалів є ключовими стратегіями зменшення впливу компанії на навколишнє середовище.

Фармацевтична промисловість робить помітні кроки до зменшення впливу на навколишнє середовище. Останніми роками було розроблено нові біодеградабельні пакувальні матеріали та альтернативи пластмасам, які широко використовуються у фармацевтичній упаковці. Все частіше використовується цілий ряд екологічно чистих матеріалів, таких як перероблений папір, біопластик та картон.

Розробка нових матеріалів трудомістка. Вчені повинні оцінити, як потенційний новий матеріал впливатиме на навколишнє середовище, прямо та опосередковано, а також оцінити, чи буде він відповідати суворим хімічним та фізичним вимогам, щоб зробити його придатним для упаковки фармацевтичних препаратів. Цим вимогам легше задовольнити вторинну та третинну упаковку, яка не контактує з лікарським засобом безпосередньо. Однак розробка первинної упаковки для фармацевтичної промисловості може бути проблемою, враховуючи складний характер її продукції та потенційну взаємодію фармацевтичних препаратів з упаковкою [57].

Отже, передумовою виробництва полілактату є стрімке забруднення навколишнього середовища пластиковими відходами, зокрема пластиком одноразового використання, що веде до всесвітньої екологічної катастрофи. Одним із видів пластику, що відноситься до «single-use plastics», є блістерна упаковка, яка займає вагомий відсоток у відходах даного типу. На фармацевтичних підприємствах у ролі первинної упаковки найчастіше виступає саме блістерна упаковка, яка використовується для пакування більшості лікарських препаратів. Зазвичай дана упаковка включає в себе плівку ПВХ (полівінілхлориду), яка дуже важко деградує (сотні років) в наколишньому середовищі та згубно впливає на екосистеми в ньому. При

цьому виділяються частинки мікропластику, які множать цей негативний вплив у сотні разів. Тому з метою зменшення навантаження на навколишнє середовище прийнято рішення щодо розробки блістерної упаковки для лікарських препаратів, яка б включала в себе плівку з полілактату на заміну екологічно небезпечної плівки виготовленої з ПВХ.

4.1.1. Аналіз галузей застосування полілактату та властивостей цільової плівки виготовленої з полілактату

Полімолочна кислота або полілактид (PLA) є найбільш широко досліджуваним та використовуваним біорозкладаним та відновлюваним аліфатичним полієфіром. PLA має доведений потенціал або для заміни звичайних полімерів на нафтохімічній основі для промислового застосування, або як провідний біоматеріал для численних застосувань у медицині [63].

Проблеми навколишнього середовища, економіки та безпеки спровокували вчених та виробників упаковки частково замінити полімери на основі нафтохімічної промисловості на полімери, що здатні біологічно розкладатися. Як головний кандидат, PLA - це термопластичний, високоміцний полімер, який може бути виготовлений із відновлюваних ресурсів для отримання різних компонентів для використання як у галузі промислової упаковки, так і на ринку біосумісних/біоабсорбуючих медичних виробів. Його легко можна використовувати у роботі на стандартному обладнанні, щоб отримати формовані деталі, плівку або волокна [64].

Медичне застосування. PLA пропонує унікальні особливості біологічного розкладання, біосумісності, термопластичності та екологічності, які збільшують його потенціал, і який є біорозсмоктувальним полімером, що відіграє все більшу роль у біомедичних застосуваннях завдяки своїй унікальній здатності повністю розсмоктуватися в заздалегідь розроблені часові рамки, що варіюються від місяців до кількох років. Крім того, можливість адаптувати їх механічні, мікроструктурні, хімічні та деградаційні властивості для конкретних застосувань спричинила широкий і все більший

обсяг досліджень, спрямованих на використання цих матеріалів інноваційними способами.

PLA використовується в широкому діапазоні біомедичних програм, таких як стенти, хірургічні шви, пластини та гвинти для фіксації кістки, інтерференційні гвинти в гомілковостопному суглобі, коліні та кисті; кріплення та шпильки для кріплення зв'язок, анкери, хребетні клітини, імплантати м'яких тканин, пристрої для доставки ліків та черепно-лицьові імплантати в пластичній хірургії [65].

Також PLA використовуються для безперервного вивільнення ліків протягом різних періодів часу, включаючи тривале введення широкого спектру лікарських засобів, таких як контрацептиви, наркотичні антагоністи, місцеві анестетики, вакцини, пептиди та білки. Вивільнення полімерних препаратів може відбуватися одним із трьох способів: ерозією, дифузією та набуханням. Для PLA розрив ефірних зв'язків відбувається випадковим чином через гідролітичне розщеплення складного ефіру, що призводить до подальшої ерозії матеріалу. Потім гідролітичні продукти такого процесу деградації перетворюються на нетоксичні напівпродукти, які виводяться за допомогою нормальної клітинної активності та сечі. Було встановлено, що проблема контрольованого вивільнення лікарського засобу може регулюватися механічною стабільністю та ступенем кристалічності PLA у рецептурі [66].

Проблеми, пов'язані з використанням PLA для ортопедії, сильно залежать від місця розташування та типу виробу, який планується використовувати. Хоча типові вироби складаються зі сталі або титану, щоб забезпечити їх здатність витримувати навантаження *in vivo* протягом тривалого періоду часу, полімери мають переваги перед металевими імплантатами, оскільки вони з часом передають напругу на пошкоджену ділянку, дозволяючи загоєнню тканин. Ще однією важливою перевагою є уникнення повторної хірургічної процедури для видалення непотрібних частин, що зменшує медичні витрати і дозволяє поступово відновлювати

функцію тканин, оскільки виріб розкладається просто гідролізом без використання ферментів або каталізаторів. Історично склалось так, що полімер PLA використовувався для виготовлення біодеградуючих гвинтів та фіксуючих штифтів, пластин та шовних анкерів. Ці типи гвинтів та штифтів набувають широкого клінічного застосування, особливо у випадках, коли не потрібна висока механічна жорсткість або міцність [64, 65].

Також у літературних джерелах повідомляється про інші застосування PLA та його сополімерів. Дослідження вперше повідомляють про використання полімерів на основі молочної кислоти для виготовлення імплантованих біорозкладаних надувних балонів. Ці повітряні кулі були розроблені для зменшення радіаційних побічних ефектів при раку передміхурової залози шляхом відокремлення простати від прямої кишки (до 9 мм) або як суб-акроміальний розпірний елемент. Нещодавно клінічні дослідження оцінювали безпеку та ефективність цих пристроїв для довготривалої роботи (до 3 років після імплантації), і результати були визнані багатообіцяючими, жодних питань безпеки порушено не було. Цей приклад представляє хорошу модель для оптимізації властивостей PLA та виготовлення пристроїв для задоволення медичних потреб, починаючи з належного складу полімеру, розкладаності імплантату - збалансування механічної стабільності та розробки належної техніки стерилізації [64].

Немедичне застосування. У всьому світі частка біопластику на ринку пластику становить майже 300 000 тонн. Незважаючи на те, що це звучить багато, на даний тип пластику припадає менше 1% з 181 мільйона тонн синтетичних пластмас, які в світі виробляються щороку. Тим не менше, ринок біопластику щороку зростає на 20–30%.

В даний час компанія Nature Works є лідером у галузі виробництва PLA-технологій та ринків. За останні 10 років ця компанія провела велику роботу з розробки продуктів на основі полілактату, які мають два типи - смоли на основі PLA (Nature-Works PLA), що використовуються для пластмас або упаковки, та Ingeo TM волокна на основі поліділактиду, які використовуються

у спеціальному текстильному та волоконному виробництві. Виробництво волокна є однією з найбільших областей потенційного застосування PLA. PLA легко розплавляється, кристалізується при нанесенні і може бути використаний для багатьох волокон. Деякі з сучасних способів використання волокон включають порожнисті волокна для подушок та ковдр, нитки для килимів, тощо. У вигляді нетканого текстилю PLA також має багато можливих застосувань, наприклад, оббивку, одноразовий одяг, тенти, жіночі засоби гігієни та підгузники. Для виготовлення більшості волокон потрібен полімер з високою оптичною чистотою (OP), щоб забезпечити високий рівень кристалічності та мати належну термостійкість у застосуванні. PLA можна обробляти на стандартному термопластичному прядильному обладнанні з відповідними температурними профілями щодо температури плавлення кристалів. Зазвичай застосовуються температури розплаву 200–240°C. PLA замінює PET у цих видах використання завдяки його чудовим характеристикам та тому, що одноразові вироби можуть бути виготовлені з волокон, що отримуються зі 100% відновлюваних ресурсів та повністю біологічно розкладаються. До корисних характеристик виробів з волокна PLA відносять природні м'які відчуття, простоту обробки та унікальну стійкість до плям та ґрунту.

Другою за величиною областю застосування PLA є виготовлення плівок. Виробляються різні типи смол PLA з різним діапазоном застосування, і кожен замовник повинен вказати вимоги до упаковки та узгодити їх. Наприклад, PLA в упаковках харчових продуктів ідеально підходить для свіжих продуктів та тих, які не погіршуються за проникності кисню. PLA - це зростаюча альтернатива "зеленому" полімеру для упаковки харчових продуктів. Ця галузь полімеру у виробі, що контактує з продуктами харчування, включає також одноразові столові прилади, чашки для пиття, чашки для салатів, тарілки, плівку для обгортання та ламінування, соломку, мішалки, кришки та чашки, тарілки та контейнери для їжі. Тому оптичні, фізичні та механічні властивості полімеру на основі PLA повинні

бути адаптовані під конкретний тип застосування. На сьогодні основне застосування PLA в упаковці (майже 70%), тоді як прогноз на 2020 рік свідчить про збільшення частки інших галузей застосування, особливо у виготовленні волокон та тканин (до 50%). Хоча повна заміна синтетичних пакувальних плівок на «eco-friendly» пакувальні плівки ще далека від повного заміщення, принаймні для таких конкретних застосувань, як упаковка харчових продуктів, використання біопластику є перспективним [64].

Також одним із перспективних напрямків використання PLA у ролі пакувального матеріалу є блістерна упаковка для лікарських препаратів. На додаток до своїх ізолюючих властивостей, PLA не виділяє токсичних випарів. Дані властивості роблять полілактат досить популярним матеріалом для виготовлення упаковки для фармацевтичних та хімічних продуктів. Це також гарантує, що високочутливі товари не забруднюються токсичними речовинами під час транспортування, захищаючи як виробника, так і кінцевого споживача [67].

Властивості цільової плівки виготовленої з полілактату. Для виготовлення безкольорової прозорої плівки товщиною 0,25 мм, яку буде застосовано для виготовлення блістерної упаковки для лікарського препарату, необхідний полілактат серії 4000 [68] (серія полілактату обрана згідно класифікації лідера з виробництва PLA компанії «Nature Works», і саме дана серія використовується для виготовлення плівок [69]). У зв'язку з тим, що властивості плівки, яка виготовлена з використанням полілактату синтезовано *Escherichia coli JW0885*, на практиці дослідити немає можливості, вирішено навести в даній роботі усереднені оптичні, фізичні, механічні та бар'єрні властивості плівки PLA, про які повідомляється в ряді досліджень з використанням різних серій PLA (табл. 4.1) [68].

Властивості цільової плівки PLA (товщина 0,25 мм) [68]

Властивості плівки	Показник	Значення
1	2	3
Оптичні	Показник заломлення	1.35–1.45
Теплофізичні	Щільність аморфної форми	1250 кг/м ³
	Щільність 100% кристалічної форми	1490 кг/м ³
	Об'єм Ван дер Ваальса (V_w)	34.45 см ³ /моль
	Молярний об'єм склоподібної аморфної форми (V_g)	55.12 см ³ /моль
	Молярний об'єм напівкристалічного полімеру (V_c)	49.44 см ³ /моль
	Параметр розчинності (δ_p), 25°C	19–20.5 МПа ^{0.5}
	Температура склування (T_g)	50–80 °C
	Температура плавлення (T_m)	130–180 °C
	Початкова температура розкладання ($T_{d,0}$)	335 °C
	Половина температури розкладання ($T_{d,1/2}$)	395 °C
	Середня енергія активації (E_{act})	205–297 кДж/моль
	Ентальпія (ΔH_m), 100%	93 Дж/г
	Кристалічність	0-40 %
	Температура відхилення тепла	55–65 °C
	Температура проникнення Віката	59 °C
	Теплопровідність $\times 10^{-4}$	2,9 кал см ⁻¹ s ⁻¹ °C ⁻¹
	Теплоємність	0,39 кал г ⁻¹ °C ⁻¹
	Коефіцієнт теплового розширення $\times 10^{-6}$	70 °C ⁻¹
	Поверхневий натяг	42 дин/см
	Коефіцієнт тертя	0,37
Індекс потоку розплаву	0,85 г/хв	
Механічні	Міцність на розрив при виході	0,88 МПа
	Модуль пружності	8,6 ГПа
	Подовження при розриві	3-30 %

Механічні	Сила гнучкості	70 МПа
	Модуль згинання	3,8 ГПа
	Твердість по Роквеллу	88
	Ударна міцність	незначна
Бар'єрні	Проникність кисню $\times 10^{-18}$ при 25 °С	$1.21 \pm 0.07 \text{ кг м м}^{-2} \text{ с}^{-1} \text{ Па}^{-1}$
	Енергія активації кисню (25-45°С)	$41.43 \pm 3.5 \text{ кДж/моль}$
	Проникність вуглекислого газу $\times 10^{-17}$ при 25 °С	$2.77 \pm 0.05 \text{ кг м м}^{-2} \text{ с}^{-1} \text{ Па}^{-1}$
	Енергія активації вуглекислого газу	$15.65 \pm 0.63 \text{ кДж/моль}$
	Азотопроникність $\times 10^{-19}$	$468 \text{ кг м м}^{-2} \text{ с}^{-1} \text{ Па}^{-1}$
	Енергія активації азоту	11.2 кДж/моль
	Водопроникність $\times 10^{-14}$	$1.75 \pm 0.05 \text{ кг м м}^{-2} \text{ с}^{-1} \text{ Па}^{-1}$
	Енергія активації води	$-9.73 \pm 0.27 \text{ кДж/моль}$

4.1.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку

Світовий ринковий попит на PLA у 2019 році, за оцінками автора [68], становить близько $\sim 400\,000$ тонн, порівняно з оціненим ринком в $120\,000$ тонн 2014 року. Це різке зростання ринкового попиту було прогнозовано за законом Джема в 2013 році, заснованим на спостереженні автора за ринком з 2004 року (працюючи в Cargill-Dow, NatureWorks, Corbion Purac та Total Corbion PLA JV) [68, 69].

Закон Джема стверджує, що світовий попит на ринку PLA подвоюється кожні 3-4 роки. На рис. 4.2 зображено тенденцію зростання із щорічним темпом збільшення на рівні 26% потужностей глобальних заводів, що виробляють PLA, та наявних виробництв PLA у світі.

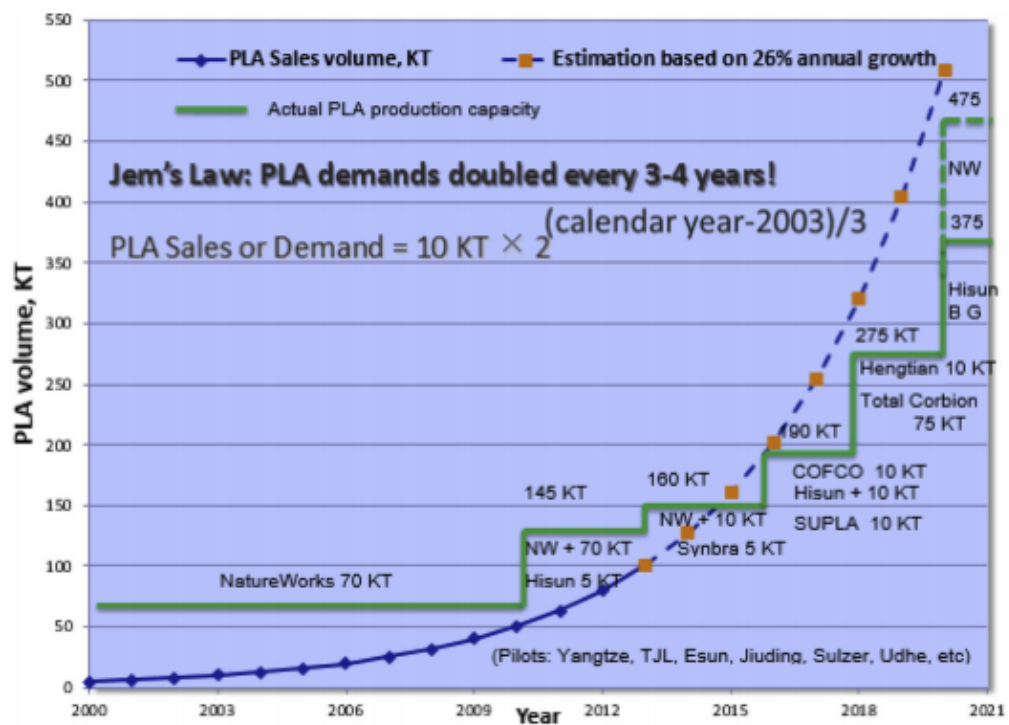


Рис. 4.2. Глобальна потужність заводів PLA проти попиту на ринку, що передбачений законом Джема.

Починаючи з 2018 року, ринковий попит явно перевищує глобальну потужність заводів PLA, особливо коли деякі з цих нових заводів (наприклад, SuPLA, COFCO, Total-Corbion) не працюють повністю для задоволення ринкового попиту з різних причин. Така ситуація спричиняє значний дефіцит постачань PLA та різке зростання цін на PLA на 20-50% з початку 2019 року. Це значно впливає на виробництво PLA в цілому та пов'язаного з ним ринку біопластику, а також майбутнє зростання ринку буде і буде обмежувати або принаймні різко сповільнювати його. В іншому випадку світовий ринок полілактату міг вирости щонайменше до 250 000 тонн у 2019 році, як оцінюється законом Джема при 4-річному режимі подвоєння. Вищезгаданий дефіцит PLA з 2018-2019 рр. головним чином спричинений тим, що NatureWorks не розширив свій завод на 150 000 тонн, а інші заводи PLA не працюють повністю через свою внутрішню проблему експлуатації та / або проблему зовнішнього постачання мономерів (наприклад, дефіцит лактиду до COFCO). Отже, нові заводи з PLA будуються, щоб задовольнити ринковий попит. Наприклад, збудований завод BVCAGalactic на 80 000 тонн LA і його

завод на ~ 40000 тонн PLA та новий завод з виробництва PLA на 30000-50 000 тонн. Jindan також будує завод потужністю 10 000 тонн лактиду (раніше це власний завод з виробництва PLA) для постачання лактиду іншим заводам з виробництва PLA, які можуть використовувати лише лактид замість молочної кислоти як сировину для полімеризації PLA. Якщо ці проекти працюватимуть добре, глобальна потужність постачання PLA зросте з 275 000 тонн до 375 000 тонн до 2020 року. Але до 2020 року дефіцит поставок PLA все ще буде близько 100 000 тонн. Швидше за все, NatureWorks побудує ще один повнорозмірний завод на 70 000-150 000 тонн PLA, щоб задовольнити ринкові потреби близько 500 000 тонн PLA до 2021-2022 [68].

Наразі у зв'язку з тим, що в Україні відсутні потужності виробництва полілактату, на її ринку присутня імпортована сировина та вироби з PLA. З цінової точки зору, PLA є сьогодні найбільш конкурентоспроможним біополімером, тому виробництво полімерів з полілактиду, і його власне виробництво, буде вигідне й на території України. Для того, щоб прогнозувати темпи розвитку ринку полілактату в Україні, на інтернет просторах недостатньо інформації та статистичних даних про розміри його імпорту та використання.

4.1.3. Вибір форми випуску плівки

У відповідності до вимог ГОСТ 25250-88 готову плівку, що виготовлена з полілактату, планується намотувати на бобіни, пластмасові втулки та картонно-паперові стрижні, дерев'яні, пластмасові, металеві шпулі внутрішнім діаметром 76-83 мм.

Допускається наявність у рулоні не більше двох відрізків плівки довжиною не менше 10 м. Місця обривів плівки склеюють встик липкою стрічкою та позначають сигнальними знаками.

Змотування плівки в рулон має бути щільним, зміщення по торцевій поверхні рулону назовні і всередину має бути трохи більше допуску на ширину полотна плівки.

Маса нетто рулону – не більше 350 кг, маса бобін розрізаної плівки– не більше 30 кг, діаметр рулону плівки – 200-800 мм. На вимогу замовника допускаються інші діаметри та маси рулонів.

Рулони плівки обгортають поліетиленовою плівкою за ГОСТ 10354 або полівінілхлоридною плівкою за ГОСТ 16272 або ГОСТ 25250 і скріплюють шпагатом по ГОСТ 17308 або ГОСТ 16266, джгутами або смужками з міцних синтетичних матеріалів. Рулони плівки перед пакуванням повинні бути закріплені липкою стрічкою згідно з ГОСТ 16214.

Рулони плівки, упаковані в ящики або без них, поміщають в універсальні контейнери або формують у транспортні пакети [70].

4.1.4. Опис готової пластикової плівки (специфікація)

СПЕЦИФІКАЦІЯ

на плівку полілактатну [70, 71] (безкольорова прозора)

Таблиця 4.2

Показники якості	Допустимі межі	Методи контролю
1	2	3
Опис	Плівка виготовлена з полілактату безкольорова прозора має бути намотана у бобіни щільно, без виступів і впадин. Обріз кромки має бути рівним. По всій довжині плівки бобіна має легко розмотуватись. Кінці плівки у місцях обривів (не більше двох з довжиною відрізків не менше 10 м) мають бути склеєні клеєвою стрічкою, при цьому не допускається склеювання суміжних шарів. Місця склейок мають бути відмічені кольоровими сигналами, видимими з торця бобіни. Поверхня плівки повинна бути гладкою, без розривів, тріщин і складок. Внутрішній діаметр втулки для намотування плівки – від 73,5 мм до 77,5 мм. Не має містити барвники, допускається жовтуватий або сіруватий відтінок.	За п. 1 СП (візуально)
Колір, ширина та товщина плівки	Має витримувати вимоги наведені в таблиці 2	За п. 2 СП
Міцність при розтягуванні	Не менше 37,3 МПа (380 кгс/см ²)	За п. 3 СП
Усадка при прогріві	Не більше 5 %	За п. 4 СП

Водопоглинання	Не більше 0,8 %	За п. 5 СП
Температура крихкості	Не вище -30 °С	За п. 6 СП
Запах і присмак водної витяжки	Не більше 1 балу	За п. 7 СП
Мікробіологічна чистота	Критерії прийнятності: - загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) – 10^3 КУО/100 см ² ; - загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – 10^2 КУО/100 см ²	За п. 8 СП, ДФУ, 5.1.4, 2.6.12
Упаковка	Бобіни, запаковані у плівку поліетиленову, яка забезпечує зберігання якості плівки виготовленої з полілактату безкольорової прозорості.	Упаковка фірми-виробника
Маркування	Відповідно до маркування виробника	
Термін придатності	1 рік з дати виготовлення	
Зберігання	В оригінальній упаковці, у сухому, захищеному від світла місці, при температурі не вище 25 °С	

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

Для випробувань за показниками від рулонів відбирають проби плівки загальною площею не менше 1 м², виключаючи при цьому краї рулонів плівки довжиною 100 мм по ширині рулону.

1. Опис. Плівка виготовлена з полілактату безкольорова прозора має бути намотана у бобіни щільно, без виступів і впадин. Обріз кромки має бути рівним.

Внутрішній діаметр втулки для намотування плівки – від 73,5 мм до 77,5 мм.

По всій довжині плівки бобіна має легко розмотуватись.

Кінці плівки у місцях обривів (не більше двох з довжиною відрізків не менше 10 м) мають бути склеєні клеєвою стрічкою, при цьому не допускається склеювання суміжних шарів. Місця склейок мають бути відмічені кольоровими сигналами, видимими з торця бобіни.

Поверхня плівки повинна бути гладкою, без розривів, тріщин і складок.

Не має містити барвники, допускається жовтуватий або сіруватий відтінок.

2. Колір, ширина та товщина плівки. Має витримувати вимоги таблиці 2.

Таблиця 4.3

Колір та прозорість плівки	Ширина плівки	Товщина плівки
Безкольорова прозора	Від 201 мм до 203 мм	Від 0,21 мм до 0,26 мм
	Від 285 мм до 287 мм	

Зовнішній вигляд плівки визначають візуально без застосування збільшувальних приладів порівнянням з контрольним зразком.

Товщину плівки визначають у трьох точках на рівних відстанях один від одного і не менше ніж 10 мм від краю.

Ширину плівки в рулоні визначають будь-яким вимірювальним інструментом із похибкою в межах допуску на ширину плівки даного типу.

3. Міцність при розтягуванні. Міцність при розтягуванні визначають на зразках, що мають форму прямокутної смужки шириною (10,0±0,2) мм, довжиною не менше 150 мм, товщиною, що дорівнює товщині випробуваної плівки. Швидкість розсування захватів випробувальної машини - (25±2) мм/хв. Випробування проводять на п'яти зразках, вирізаних у поздовжньому напрямку.

4. Усадка при прогріві. Усадку при прогріві визначають на трьох зразках, відібраних по всій ширині проби, що мають форму квадрата зі стороною (100±1) мм. Зразки вимірюють посередині сторони квадрата в напрямку витяжки плівки з похибкою не більше 0,5 мм і поміщають на 15 хв в термошафу, нагріту до (100±2)°С, на плоску підкладку, що не перешкоджає зміні розмірів. Після охолодження до кімнатної температури зразки вимірюють у тих самих точках, що й до прогріву.

Усадку при прогріві (ΔS) у відсотках обчислюють за формулою:

$$\Delta S = \frac{(l - l_1)}{l} \cdot 100,$$

де l - довжина зразка до прогріву, мм; l_1 - довжина зразка після прогріву, мм.

За результат випробування приймають середнє арифметичне значеннь, отриманих при випробуванні трьох зразків.

5. Водопоглинання. Водопоглинання визначають за ГОСТ 4650 на трьох зразках у формі квадрата зі стороною (50 ± 1) мм.

Досліджувані зразки занурюють у дистильовану воду при температурі $(23\pm 2)^\circ\text{C}$ або киплячу дистильовану воду або витримують в атмосфері відносною вологістю 50% при заданій температурі протягом встановленого періоду часу. Маса води, поглинену кожним випробуваним зразком, визначають або обчислюють по різниці між масою зразка до і після випробування, вираженої у відсотках по відношенню до початкової маси. При необхідності можна визначити масу води, втраченої випробуваним зразком після просушування.

Для кожного випробуваного зразка розраховують масову частку води, поглиненої зразком, c , % за формулою:

$$c = \frac{m_2 - m_1}{m_1} 100$$

або

$$c = \frac{m_2 - m_3}{m_1} 100,$$

де m_2 - маса випробуваного зразка після витримки у воді, мг; m_1 - маса випробуваного зразка після початкового просушування і перед зануренням у воду, мг; m_3 - маса випробуваного зразка після витримки та остаточного просушування, мг.

За результат випробування приймають середньоарифметичне значення трьох показників, отриманих за однакової тривалості витримки у воді.

6. Температура крихкості. Температуру крихкості експерес-методом визначають за ГОСТ 5960 на п'яти зразках товщиною, що дорівнює товщині плівки.

Прилад для випробування складається з чотирикутної металевої ванни розміром 220x170x70 мм, ізолюваної зовні теплоізоляційним матеріалом, та спеціального пристосування для затиску випробуваних зразків.

У ванну заливають спирт етиловий до 40 мм її висоти, який охолоджують додаванням твердої вуглекислоти до заданої температури. Зразки, затиснуті між затискачами 1 і 2 спеціального пристосування, поміщають у ванну в натягнутому стані (рис.1, положення 1) і витримують при заданій температурі 5 хв, після цього поворотом рукоятки затискач 2 прикладають до затискача 1 (рис.1, положення 2). Місце перегину притискають товкачем і проглажують, у результаті досягають перегину зразків на 180° (рис.1, положення 3).

Випробовані таким чином зразки не повинні мати тріщин у місці перегину.

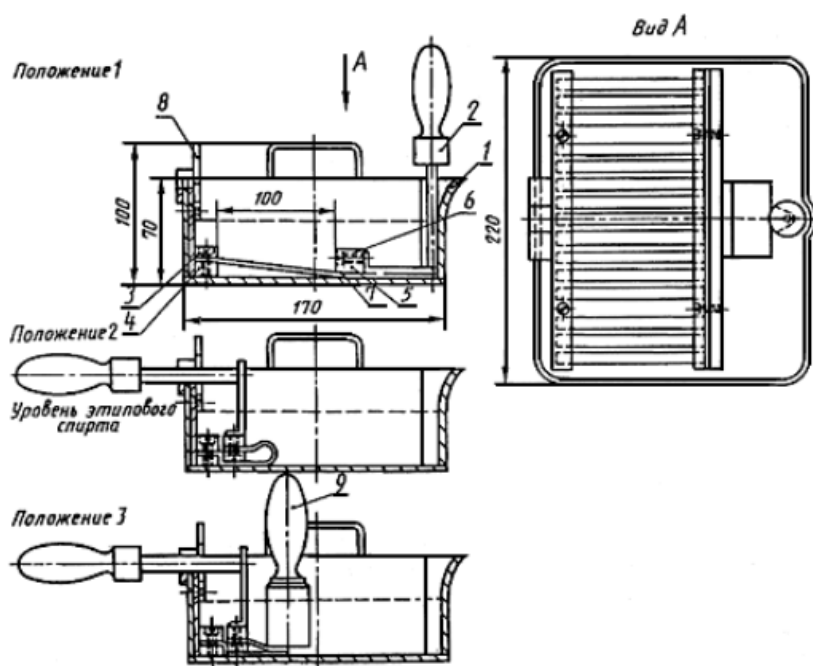


Рис. 1. Схема приладу для випробування: 1 – ванна; 2 – ручка; 3 - затискач 1; 4 – брусок; 5 - затискач 2; 6 – брусок; 7 – зразки; 8 – клямка.

7. Запах і присмак водної витяжки. Запах та присмак водної витяжки визначають органолептично. Кількість зразків для випробувань обчислюють, виходячи із відношення площі поверхні матеріалу до обсягу рідини, яке має

бути 2:1 з урахуванням обох поверхонь плівки. Зразки перед випробуванням кондиціонують повітря при $(23\pm 2)^{\circ}\text{C}$ щонайменше 3 год.

Для органолептичного методу використовують кип'ячену водопровідну або дистильовану воду, санітарно-хімічного — дистильовану воду.

Для випробувань витяжки з матеріалів готують так. Зразки плівок, призначених для холодного пакування харчових продуктів та лікарських засобів, заливають кип'яченою водопровідною або дистильованою водою при $(20\pm 5)^{\circ}\text{C}$ витримують протягом 24 год.

Інтенсивність стороннього запаху та присмаку не повинна перевищувати 1 бал.

8. Мікробіологічна чистота. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ (розділ 2.6.12).

Підготовка зразка. Зволожують стерильний тампон стерильним буферним розчином з натрію хлоридом та пептоном рН 7,0 і ретельно протирають ним ділянку площею 100 см^2 . Тампон поміщають у пробірку, що містить 10 мл стерильного буферного розчину з натрію хлоридом та пептоном рН 7,0 і ретельно перемішують.

Проведення випробування на визначення загального числа аеробних мікроорганізмів (ТАМС). Відбирають по 1 мл з пробірки зі змивами та вносять у дві чашки Петрі і заливають 15-20 мл соєво-казеїного агару (СКА), розплавленого та охолодженого до температури від 42°C до 45°C .

Інкубацію посівів та облік результатів проводять відаповідно до вимог розділу 2.6.12.

Проведення випробування на визначення загального числа дріжджових та плісневих грибів (ТУМС). Відбирають по 1 мл з пробірки зі змивами та вносять у дві чашки Петрі і заливають 15-20 мл сабуру-декстрозного агару (СДА), розплавленого та охолодженого до температури від 42°C до 45°C .

Інкубацію посівів та облік результатів проводять відаповідно до вимог розділу 2.6.12.

Для контролю умов випробування паралельно проводять негативний контрольний дослід (НКД) (відтворюють схеми посіву, використовуючи розчинник замість випробуваного зразка). Результат НКД – ріст мікроорганізмів має бути відсутнім.

4.1.5. Розрахунок річної потужності виробництва плівки та кількості серій на рік

Для виробництва препарату «Корвалмент®» №10, №30 та №80 протягом року необхідно 33691 кг плівки. PLA-плівка, яка планується виготовлятися буде містити не менше 98% полілактату. Виходячи з цього, необхідна річна потреба у полілактаті буде становити:

$$33691 \text{ кг} \cdot 0,98 = \mathbf{33017 \text{ кг або } 33,017 \text{ тонн.}}$$

Планується виготовляти пластикову плівку з полілактату шириною 202 ± 1 мм (для блістерної упаковки «Корвалмент®» №10, №30) та 286 ± 1 мм (для блістерної упаковки «Корвалмент®» №80). Виходячи з кількості серій та упаковок даного препарату, виготовлених за 2020 рік на АТ «КВЗ», із загальної кількості гранул полілактату (33017 кг) на виготовлення плівки шириною 202 ± 1 мм необхідно використати

$$33017 \text{ кг} \times 0,4299 = \mathbf{14194 \text{ кг}},$$

а на виготовлення плівки шириною 286 ± 1 мм необхідно використати

$$33017 \text{ кг} \times 0,5701 = \mathbf{18823 \text{ кг.}}$$

✓ *Розрахунок річної потужності виробництва та кількості серій на рік для плівки шириною 202 ± 1 мм:*

Приймаємо, що вага однієї бобіни з плівкою (в бобіні довжина намотаної плівки приблизно 500 м) дорівнює **21,5 кг** [71].

Тоді вага плівки довжиною 1 м становить:

$$500 \text{ м} - 21,5 \text{ кг}$$

$$1 \text{ м} - \quad \times \text{ кг}$$

$$x = (1 \text{ м} \cdot 21,5 \text{ кг}) / 500 \text{ м} = 0,043 \text{ кг} = \mathbf{43 \text{ г.}}$$

Виходячи з цього, приймаємо, що на виготовлення 1 м плівки йде приблизно:

$$43 \text{ г} * 0,98 = \mathbf{42,14 \text{ г}}$$
 гранул полілактату.

Тоді довжина плівки виготовленої з полілактату на рік буде становити:

$$14194 \text{ кг} / 0,04214 \text{ кг} = \mathbf{336830 \text{ м}}$$

Кількість бобін на рік буде становити:

$$336830 \text{ м} / 500 \text{ м} = 673,66 = \approx \mathbf{674 \text{ шт}}$$

Приймаємо, що одна серія плівки виготовленої з полілактату шириною 202 ± 1 мм буде містити **50 бобін**, тоді кількість серій на рік буде становити:

$$674 \text{ шт} / 50 \text{ бобін} = 13,48 = \approx \mathbf{14 \text{ серій}}$$

✓ *Розрахунок річної потужності виробництва та кількості серій на рік для плівки шириною 286 ± 1 мм:*

Приймаємо, що вага однієї бобіни з плівкою (в бобіні довжина намотаної плівки приблизно 500 м) дорівнює **30,5 кг** [71].

Тоді вага плівки довжиною 1 м становить:

$$500 \text{ м} - 30,5 \text{ кг}$$

$$1 \text{ м} - \quad \text{х кг}$$

$$\text{х} = (1 \text{ м} * 30,5 \text{ кг}) / 500 \text{ м} = 0,061 \text{ кг} = \mathbf{61 \text{ г}}$$

Виходячи з цього, приймаємо, що на виготовлення 1 м плівки йде приблизно:

$$61 \text{ г} * 0,98 = \mathbf{59,78 \text{ г}}$$
 гранул полілактату.

Тоді довжина плівки виготовленої з полілактату на рік буде становити:

$$18823 \text{ кг} / 0,05978 \text{ кг} = \mathbf{314872 \text{ м}}$$

Кількість бобін на рік буде становити:

$$314872 \text{ м} / 500 \text{ м} = 629,74 \approx \mathbf{630 \text{ шт}}$$

Приймаємо, що одна серія плівки виготовленої з полілактату шириною 286 ± 1 мм буде містити **25 бобін**, тоді кількість серій на рік буде становити:

$$630 \text{ шт} / 25 \text{ бобін} = 25,2 \approx \mathbf{26 \text{ серії}}$$

4.2. Розрахунок потреби у субстанції для випуску плівки для блістерної упаковки

Виробництво полілактату для виготовляти безкольорової прозорої плівки товщиною 0,25 мм, з метою використання її у первинному пакуванні

(блістера), планується для лікарського засобу «Корвалмент» №10, №30 та №80 виробництва АТ «Київський вітамінний завод». Даний ЛЗ обраний для апробації у зв'язку з його достатньо високою популярністю на ринку, і відповідно найбільшими обсягами виробництва. На виробництві АТ «КВЗ» для первинного пакування даного ЛЗ використовують безкольорову прозору полівінілхлоридну плівку товщиною 0,25 мм виробництва «Thai Nam Plastic» (Таїланд). Всі необхідні дані для проведення розрахунку річної потреби полілактату наведені у табл. 4.4. (дані у таблиці усереднені для полегшення процесу обрахунків).

Для розрахунку річної потреби у полілактаті необхідно розрахувати кількість плівки (в кг) на кожну з типів упаковок, які будуть виготовлятися протягом року.

Тоді:

- для ЛЗ «Корвалмент[®]» №10 необхідно:

$$3 \text{ серії} \cdot 127274 \text{ упаковок} = \sim 382 \text{ тис. упаковок} \rightarrow 382 \text{ тис. уп.} \cdot 1,3 \text{ кг} = \\ = 496,6 \text{ кг плівки/рік};$$

- для ЛЗ «Корвалмент[®]» №30 необхідно:

$$74 \text{ серії} \cdot 49745 \text{ упаковок} = \sim 3681 \text{ тис. упаковок} \rightarrow 3681 \text{ тис. уп.} \cdot 3,8 \text{ кг} = \\ = 13987,8 \text{ кг плівки/рік};$$

- для ЛЗ «Корвалмент[®]» №80 необхідно:

$$101 \text{ серії} \cdot 18645 \text{ упаковок} = \sim 1883 \text{ тис. упаковок} \rightarrow 1883 \text{ тис. уп.} \cdot 10,2 \text{ кг} = \\ = 19206,6 \text{ кг плівки/рік}.$$

Отже, для виробництва препарату «Корвалмент[®]» №10, №30 та №80 протягом року необхідно 33691 кг плівки. PLA-плівка, яка планується виготовлятися буде містити не менше 98% полілактату. Виходячи з цього, необхідна річна потреба у полілактаті буде становити:

$$33691 \text{ кг} \cdot 0,98 = \mathbf{33017 \text{ кг або } 33,017 \text{ тонн.}}$$

Таблиця 4.4

Вихідні дані для розрахунку річної потреби полілактату

Назва препарату	Упаковка	Кількість серій за рік*	Кількість упаковок у серії*	Ширина використаної плівки, мм	Норма витрати плівки на 1 тис. упаковок, кг
1	2	3	4	5	6
Корвалмент®	№10 (По 10 капсул у блістерах)	3	127274	202±1	1,3
	№30 (По 10 капсул у блістері; по 3 блістери у пачці)	74	49745	202±1	3,8
	№80 (По 20 капсул у блістері; по 4 блістери у пачці)	101	18645	286±1	10,2

* - дані наведені за 2020 рік.

4.2.1. Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції.

У зв'язку з тим, що на території України відсутні виробники як полілактату для виготовлення з нього плівки для блістерної упаковки, так і кінцевого продукту (PLA плівки), у табл. 4.5 та табл. 4.6 наведені світові виробники PLA та плівки з нього.

Таблиця 4.5

Перелік виробників (постачальників) субстанції [73, 74]

Назва компанії	Місцезнаходження	Торгова назва
1	2	3
Total Corbion PLA	США	-
Nature Works	США	Ingeo
Futerro	Бельгія	Futerro
Tate & Lyle	Нідерланди	Hycail
Purac	Нідерланди	Purasorb
Hiusan Biosciences	Китай	Hisun
Jiangsu Jiulding	Китай	-
Teijin	Японія	Biofront
Toyobo	Японія	Vylocol
Synbra	Нідерланди	Biofoam
COFCO	Китай	-
Shanghai Tong-Jie-Liang Biomaterials	Китай	-

Таблиця 4.6

Перелік виробників кінцевого продукту (плівки з полілактату) [75]

Назва виробника	Країна	Посилання
1	2	3
Chintec	Китай	https://www.plasticfilmchina.com
PSI	США	https://www.plasticsuppliers.com

Hitachi	Японія	https://www.hitachi.com
NatureWorks	США	https://www.natureworkslc.com
Corbion	США	http://www.corbion.com/bioplastics

4.2.2. Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Оскільки, виробництво полілактату для виготовлення плівки планується для конкретного препарату, вирішено покривати 100% потреби у ньому. Тому виходячи з цього річна потужність виробництва полілактату складатиме 33017 кг.

Для того, щоб дізнатися кількість стадій приготування посівного матеріалу, необхідним є розрахунок кількості культуральної рідини, яку потрібно отримати за цикл ферментації.

З даних статті [76] відомо, що протягом $T_{\Phi} = 48$ год процесу культивування синтезується 7,3 г/л полілактату. Вміст сухих речовин в готовому продукті $CP_{ГП}$ складає частку 0,998.

З метою здійснення наступних розрахунків приймемо такі початкові дані: час циклу роботи ферментера

$$T_{\text{ЦФ}} = T_{\Phi} + T_{\text{ПО}} = 48 + 10 = 58 \text{ год,}$$

де T_{Φ} – час культивування (48 год); $T_{\text{ПО}}$ – час проведення підготовчих операцій (миття та огляд ферментера (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1,5 год), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год));

K_1 – коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) приймемо $K_1 = 1,1$. Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{\text{СВ}} = 0,2$.

Мінімально можлива кількість робочих днів, які можуть бути використані для виробництва продукції, становить 30 днів, максимальна – 330 днів. Приймаємо кількість робочих трудоднів 300 ($T_{рд}$).

При кількості трудоднів рівному 330, кількість продукту на добу ($G_{нтд}$) становитиме:

$$G_{нтд} = \frac{G_{нт}}{T_{рд}} = \frac{33017}{300} = 110 \text{ кг/добу}$$

Кількість продукту за цикл:

$$G_{ц} = \frac{G_1 \cdot T_{цф}}{24} = \frac{110 \cdot 58}{24} = 265,8 \text{ кг/цикл}$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл)

$$V_{кр} = \frac{K_1 \cdot G_{ц} \cdot CP_{гп}}{P_{кр} \cdot (1 - E_{св})} = \frac{1,1 \cdot 265,8 \cdot 0,998}{7,3 \cdot (1 - 0,2)} = 50 \text{ м}^3$$

Кількість циклів за рік:

$$K_{ц} = \frac{G_{нт}}{G_{ц}} = \frac{33017}{265,8} = 124,2 \text{ циклів}$$

Приймаємо 125 циклі.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які будуть становити 1%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\phi} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{\phi}} = \frac{50}{1 - 0,1} = 55,5 \text{ м}^3$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{зф} = 0,7$ його приблизний геометричний об'єм складе:

$$V_{гф} = \frac{V_{\phi}}{K_{зф}} = \frac{55,5}{0,7} = 79,3 \text{ м}^3$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{нф} = 80 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_{зф} = \frac{V_{ф}}{V_{нф}} = \frac{55,5}{80} = 0,69$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5-0,75), отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

4.2.2.1 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{ф} = 55,5 \text{ м}^3$. Найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{нф} = 80 \text{ м}^3$.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс} = \frac{V_{ф}}{1 + X_{ф}} = \frac{55,5}{1 + 0,1} = 50,45 \text{ м}^3$$

де $X_{ф}$ – доза посівного матеріалу для ферментера (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пмф} = V_{ф} - V_{пс} = 55,5 - 50,45 = 5 \text{ м}^3.$$

Для одержання 5 м^3 інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор які становлять від 1%.

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

$$V_{па} = \frac{V_{пмф}}{1 - E_{ф}} = \frac{5}{1 - 0,1} = 5,55 \text{ м}^3$$

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

$$V_{пспа} = \frac{V_{па}}{1 + X_{па}} = \frac{5,55}{1 + 0,1} = 5 \text{ м}^3$$

де $X_{па}$ – доза інокуляту для посівного апарату (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пмппа} = V_{па} - V_{пспа} = 5,55 - 5 = 550 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{па} = 5,55 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{гпа} = \frac{V_{па}}{K_{зпа}} = \frac{5,55}{0,7} = 7,9 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{ппа} = 8 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зпа} = \frac{V_{па}}{V_{гпа}} = \frac{5,55}{8} = 0,69$$

Для одержання 550 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор які становлять від 1%.

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

$$V_{па} = \frac{V_{пмф}}{1 - E_{ф}} = \frac{550}{1 - 0,1} = 611 \text{ л}$$

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

$$V_{пспа} = \frac{V_{па}}{1 + X_{па}} = \frac{611}{1 + 0,1} = 555 \text{ л}$$

де $X_{па}$ – доза інокуляту для посівного апарату (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пмппа} = V_{па} - V_{пспа} = 611 - 555 = 56 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{па} = 611 \text{ л}$ можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{гпа} = \frac{V_{па}}{K_{зпа}} = \frac{611}{0,7} = 872 \text{ л}$$

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

$$K_{зпа} = \frac{V_{па}}{V_{гпа}} = \frac{611}{1000} = 0,61$$

Для одержання 56 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор які становлять від 1%.

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

$$V_{\text{па}} = \frac{V_{\text{пмф}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{56}{1 - 0,1} = 62 \text{ л}$$

Кількість інокуляту для засіву посівного апарату $V_{\text{пм3}} = 62$ л можна одержати під час культивування у інокуляторі геометричним об'ємом 100 л та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,6$.

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{62}{100} = 0,62$$

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

$$V_{\text{пспа}} = \frac{V_{\text{па}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{62}{1 + 0,1} = 56 \text{ л}$$

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

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмпа}} = V_{\text{па}} - V_{\text{пспа}} = 62 - 56 = 6 \text{ л}$$

Кількість інокуляту для засіву посівного апарату $V_{\text{пм2}} = 6$ л можна одержати під час культивування у малому інокуляторі геометричним об'ємом 10 л та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,6$.

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{6}{10} = 0,6$$

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

$$V_{\text{пспа}} = \frac{V_{\text{па}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{6}{1 + 0,1} = 5,4 \text{ л}$$

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

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмпа}} = V_{\text{па}} - V_{\text{пспа}} = 6 - 5,4 = 0,6 \text{ л}$$

Кількість інокуляту для засіву посівного апарату $V_{\text{пмз}} = 0,6$ л можна одержати культивуванням у колбах. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить:

$$V_{\text{кол}} = \frac{V_{\text{пмі}}}{1 - E_{\text{кол}}} = \frac{0,6}{1 - 0,01} = 0,6 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища у колбах становитиме:

$$V_{\text{пск}} = \frac{V_{\text{кол}}}{1 + X_{\text{кол}}} = \frac{0,6}{1 + 0,1} = 0,54 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву колб:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{кол}} - V_{\text{пск}} = 0,6 - 0,54 = 0,06 \text{ л} = 60 \text{ мл}$$

Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому $K_{\text{колб}} = 0,7$:

$$V_{\text{гколб}} = \frac{V_{\text{колб}}}{K_{\text{зколб}}} = \frac{0,6}{0,7} = 0,86 \text{ л}$$

Об'єм 1 качалочної колби $V_{\text{нколб}} = 0,5$ л.

Кількість качалочних колб при заданому коефіцієнті заповнення $K_{\text{колб}} = 0,7$:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{гколб}}}{V_{\text{нколб}}} = \frac{0,86}{0,5} = 1,7 \text{ шт.}$$

Приймаємо 2 колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу полілактату у ферментері об'ємом 80 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,7 буде проходити у п'ять етапів.

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ПЛАСТИКОВОЇ ПЛІВКИ

5.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування

Полілактат – це здатний до біологічного розкладу біосумісний термопластичний аліфатичний полієфір, мономером якого є молочна кислота. Вироби з полілактату (ПЛ), а саме упаковка, характеризуються високою твердістю, прозорістю і блиском, а також більшою здатністю (на 50%) зберігати форму після стиснення і крутіння в порівнянні з поліпропіленом (ПП). У зв'язку з тим, що полілактат здатен до біодеградації за участі позаклітинних мікробних деполімераз до CO₂ і H₂O, він є доволі перспективним для використання у порівнянні з хімічно синтезованими полімерами, які не піддаються деградації і, як наслідок, стрімко накопичуються у навколишньому середовищі.

Створення саме таких матеріалів, здатних по закінченні періоду використання деградувати на фрагменти, що компостуються в ґрунті, дозволяє суттєво зменшити навантаження на природні екосистеми і зменшити загрозу виникнення техногенних катастроф [77].

Процес отримання полілактатів передбачає проведення полімеризації молочної кислоти. Даний процес на сьогодні може проводитись двом способами: хімічним та власне під час культивування мікроорганізмів (бродіння) [78]. Далі на рис. 5.1. схематично зображено отримання полілактатів різними методами.

Хімічним методом поліконденсації молочної кислоти можна отримати кристалічний ПЛ; шляхом полімеризації проміжної речовини – лактида – з

					НУХТ БТЕК 02.02.15 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		<i>Черепанський В.В.</i>			РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва пластикової плівки	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		<i>Грегірчак Н.М.</i>					69	41
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>						

розкриттям циклу можна одержувати як кристалічні, так і аморфні ПЛ. У промисловості використовується комбінація цих методів. Поліконденсацією молочної кислоти можна отримувати тільки низькомолекулярний полілактид, оскільки в процесі виділяється побічний продукт – вода, відвести яку з реакційної суміші складно, і тому високополімерний ланцюг руйнується. Одержаний низькомолекулярний полілактид деполімеризують до димера молочної кислоти, а потім до лактиду. Отриманий лактид полімеризують при високій температурі з додаванням каталізатора октаноата олова, отримуючи високомолекулярний полілактид [79].

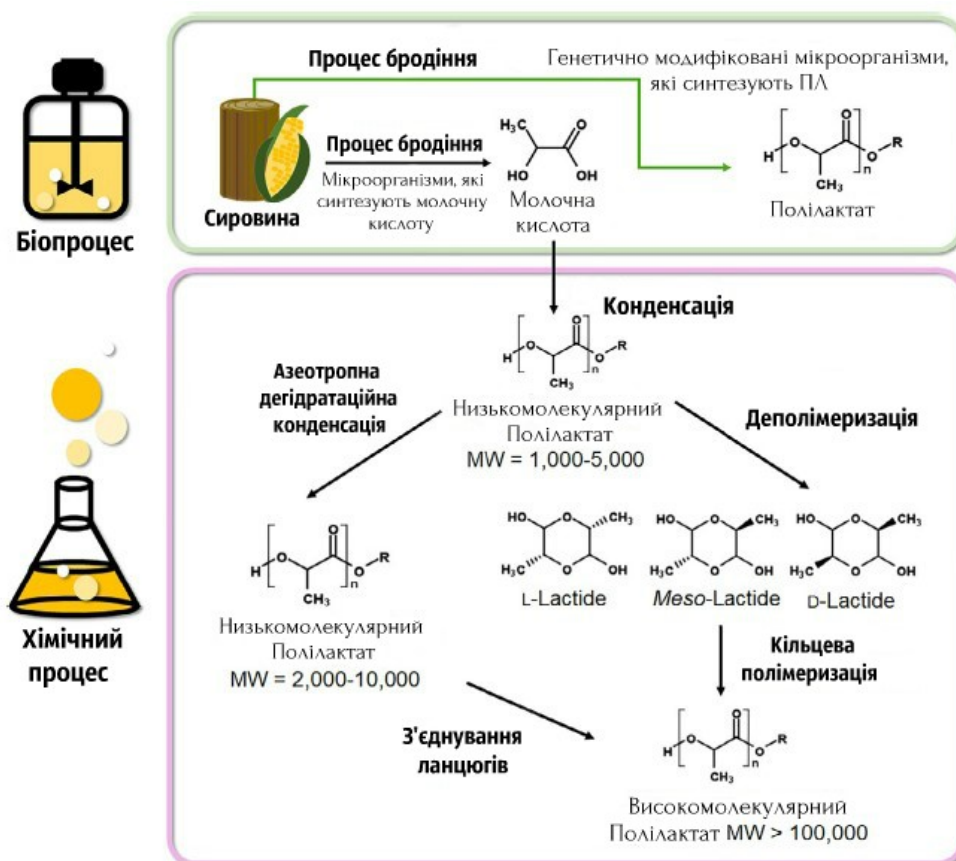


Рис. 5.1. Процес отримання полілактату [77, 80].

Інший метод передбачає проведення процесу бродіння за участі генетично модифікованих мікроорганізмів. Генетичні зміни проводять з метою появи здатності мікроорганізмів синтезувати ферменти, які необхідні для одноетапного синтезу полілактиду. Так, наприклад, у дослідженні Rawar R. P. та співавторів [81] було здійснено введення гена пропіонат СоА-трансферази (PctCp) із *Clostridium propionicum* та 19 полігидроксиалканоат

(PHA) синтази 1 (PhaC1Ps6-19) від *Pseudomonas sp.* в *Escherichia coli* для генерування лактил-КоА ендогенно та включення лактил-КоА. Після цих маніпуляцій даний штам *E.coli* набув здатності синтезувати полілактид у кількості 20–49 мол.%. Також групою вчених на чолі з Ochi A. [82] полігідроксиалканоат (PHA) синтетазу класу I з *Ralstonia eutropha* (PhaCRe) було сконструйовано таким чином, щоб набути лактатполімеризуючої активності. Лактатполімеризуючу активність мутантів PhaCReA510X оцінювали на основі включення одиниць LA у скелет полі [3-гідроксибутират (3НВ)] *in vivo*. Серед 19 мутантів PhaCRe (A510X) 15 синтезували полі (LA-со-3НВ), що вказує на те, що сайт 510 відіграє вирішальну роль у полімеризації LA. Аналізи ЯМР 13С та 1Н високомолекулярної фракції показали, що полімер являв собою сополімер полі (7 мол.% LA-со-3НВ) із середньою масою молекулярної маси $3,2 \times 10^5$ Да.

Узагальнююча порівняльна характеристика обох методів отримання полілактату наведена далі в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

Порівняння методів отримання полілактату

Характеристика	Хімічний метод	Метод бродіння
Сировина для синтезу	Використовуються нафтохімічні ресурси з подальшим додаванням HCN та специфічного каталізатора до синтезованої молочної кислоти	Використовуються відновлювані ресурси, такі як вуглеводи (моносахариди та дисахариди), що містяться у поживному середовищі, для отримання молочної кислоти та полілактату
Оптична чистота синтезованої молочної кислоти	Утворюється рацемічна суміш як D (-), так і L (+) молочної кислоти	Утворюється лише одна оптично чиста форму D (-) або L (+) молочної кислоти
Кількість етапів синтезу	2-3 етапи	Одноетапний процес
Ймовірність утворення токсичних побічних продуктів синтезу	Висока	Відсутня
Вартість проведення синтезу	Висока	Низька

Отже, виходячи з інформації наведеної в табл. 5.1 можна зробити висновок, що найбільш доцільно проводити синтез полілактату саме методом бродіння, адже він є ефективнішим, нетоксичним, має низьку вартість, та проводиться в один етап.

Узагальнюючу характеристику технологічних особливостей одержання полілактату за використання різних продуцентів наведено у табл. 5.2. При виборі біологічного агента враховувалось здатність синтезувати полімер в складі якого міститься не тільки лактат, але і сополімер, що дасть змогу покращити як термопластичні, так і бар'єрні властивості біопластику.

Проаналізувавши дані наведені в таблиці 5.2 можна сказати, що найвищий показник синтезу полімеру – $7,3 \pm 0,2$ г/л досягається при культивуванні *E. coli* JW0885. Найнижчий показник синтезу спостерігається у *R. eutropha* 437-540 (0.37 ± 0.01 г/л). Така кількість полімеру досягається при культивуванні *E. coli* JW0885 та *R. eutropha* 437-540 впродовж 48 год та 72 год відповідно.

Оскільки порівняння характеристик технологічного процесу культивування продуцентів (див. табл. 5.2) є малопереконливим, на наступному етапі обрання біологічного агента необхідним є зіставлення вартості поживних середовищ для культивування наведених біологічних агентів (табл. 5.3).

Таблиця 5.2

Особливості одержання полілактату за допомогою *E. coli* JW0885, *C. glutamicum* ATCC13803 та *R. eutropha* 437-540

Біологічний агент	Склад синтезованого полімер	Концентрація полімеру, г/л	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Особливість і процесу біосинтезу	Використана література
<i>E. coli</i> JW0885	P (60±3 мол.% LA-co-3HB*)	7,3±0,2	- ксилоза – 20.0; - триптон – 10.0; - дріжджовий екстракт – 5.0; - хлорид натрію – 5.0; - ампіцилін – 100 мкг/мл – 0,1 г/л; - пантотенат кальцію – 1 мг/л.	48	pH = 7, t = 30°C, аеробні умови, n = 120 об/хв	Nduko J.M., Matsumoto K., Ooi T., Taguchi S. Effectiveness of xylose utilization for high yield production of lactate-enriched P(lactate-co-3-hydroxybutyrate) using a lactate-overproducing strain of <i>Escherichia coli</i> and an evolved lactate-polymerizing enzyme. <i>Metab Eng.</i> 2013; 15:159-66. doi: 10.1016/j.ymben.2012.11.007
<i>C. glutamicum</i> ATCC13803	P (99.3±0.7 мол.% LA-co-3HB*)	1,83	<i>Середовище №1</i> (CM2G): - глюкоза – 5.0; - триптон – 10.0; - дріжджовий екстракт – 10.0; - хлорид натрію – 5.0; - DL-метіонін – 0.2; <i>Середовище №2</i> (MMTG): - глюкоза – 6.0; - Магній сульфат – 1.0; - Амоній сульфат – 30.0; - Дигідроортофосфат калію - 1.5; - Гептагідрат сульфату заліза - 0.01;	<i>Середовище №1:</i> 24 <i>Середовище №2:</i> 72	<i>Середовище №1:</i> pH = 7, t = 30°C, аеробні умови, n = 130 об/хв; <i>Середовище №2:</i> pH = 7.5, t = 30°C, аеробні умови,	Song Y., Matsumoto K., Yamada M., Gohda A., Brigham C.J., et al. Engineered <i>Corynebacterium glutamicum</i> as an endotoxin-free platform strain for lactate-based polyester production. <i>Appl Microbiol Biotechnol.</i> 2012; 93(5): 1917-25. doi: 10.1007/s00253-011-3718-0

			<ul style="list-style-type: none"> - Магнію сульфат тетрагідрат 0.01; - біотин - 450 мкг – 0.45 г/л; - DL-метіонін – 0.2; - CaCO₃ – 50.0; - канаміцин – 25 мкг/мл – 0.025 г/л. 		n = 130 об/хв;	
<i>R. eutropha</i> 437-540	P (21.5±2 мол.% LA-со- ЗНВ*)	0.37±0.01	<ul style="list-style-type: none"> - Сахароза – 20.0; - KH₂PO₄ - 6.67; - (NH₄)₂HPO₄ – 4.0; - MgSO₄·7H₂O - 0.8; - лимонна кислота - 0.8; - Розчин мікроелементів - 5 мл. Розчин мікроелементів містить (г/л): - FeSO₄·7H₂O – 10; - CaCl₂ – 2; - ZnSO₄·7H₂O - 2.2; - MnSO₄·4H₂O – 0.5; - CuSO₄·5H₂O – 1; - (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O - 0.1; - Na₂B₄O₇·10H₂O - 0.02; - 35% HCl – 10 мл. 	72	pH = 6.9, t = 30°C, аеробні умови, n = 250 об/хв	Park S.J., Jang Y.A., Noh W., Oh Y.H., Lee H., et al. Metabolic engineering of <i>Ralstonia eutropha</i> for the production of polyhydroxyalkanoates from sucrose. <i>Biotechnol Bioeng.</i> 2015; 112(3): 638-43. doi: 10.1002/bit.25469

Вартість компонентів поживного середовища для культивування

E. coli JW0885, *C. glutamicum* ATCC13803 та *R. eutropha* 437-540

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації
<i>E. coli</i> JW0885	ксилоза – 20.0	28,36	0,567	1
	триптон – 10.0	709	7,09	2
	дріжджовий екстракт – 5.0	483	2,415	3
	хлорид натрію – 5.0	14,2	0,07	4
	ампіцилін – 100 мкг/мл – 0,1	1559	0,156	5
	Пантотенат кальцію – 0,001	153	0,0002	5.1
Вартість 1 л середовища – 10,3 грн.				
<i>C. glutamicum</i> ATCC13803	Середовище №1			
	глюкоза – 5.0	34	0,17	6
	триптон – 10.0	709	7,09	2
	дріжджовий екстракт – 10.0	483	4,83	3
	хлорид натрію – 5.0	14,2	0,07	4
	DL-метіонін – 0.2	86	0,018	7
	Середовище №2			
	глюкоза – 6.0	34	0,20	6
	Магній сульфат – 1.0	93	0,093	8
	Амоній сульфат – 30.0	20	0,6	9
	Дигідроортофосфат калію - 1.5	120	0,18	10
	Гептагідрат сульфату заліза - 0.01	20	0,0002	11
	Магнію сульфат тетрагідрат - 0.01	22	0,0002	12
	біотин - 450 мкг – 0.45	1426	0.6417	13
	DL-метіонін – 0.2	86	0.018	7
	CaCO ₃ – 50.0	179	8.95	14
канаміцин – 25 мкг/мл – 0.025	2850	0.071	15	
Сумарна вартість – 22,93 грн.				
<i>R. eutropha</i> 437-540	Сахароза – 20.0	28,5	0,6	16
	KH ₂ PO ₄ - 6.67	120	0,8	10
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ – 4.0	28,36	0,113	17
	MgSO ₄ ·7H ₂ O - 0.8	10,2	0,01	18
	лимонна кислота - 0.8	26	0,02	19
	розчин мікроелементів - 5 мл	3,05	0,015	розраховано
	Розчин мікроелементів			
	FeSO ₄ ·7H ₂ O – 10	20	0,2	20

<i>R. eutropha</i> 437-540	CaCl ₂ – 2	35	0,07	21
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O - 2.2	264	0,58	22
	MnSO ₄ ·4H ₂ O – 0.5	40	0,02	23
	CuSO ₄ ·5H ₂ O – 1	65	0,065	24
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O - 0.1	1104	0,11	25
	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O - 0.02	30	0,006	26
	35% HCl – 10 мл	200	2	27
	Вартість 1 л розчину – 3,05			
Вартість 1л середовища – 1,56 грн.				

Примітка. * - Ціни наведено станом на січень 2022. 1- <https://russian.alibaba.com/product-detail/hot-sell-food-grade-99-min-d-xylose-price-62132025664.html?spm=a2700.8699010.normalList.34.16f31862715tMy> ; 2 - <https://russian.alibaba.com/product-detail/usp-grade-tryptone-price-in-high-purity-62069616264.html?spm=a2700.8699010.29.141.67806e4aYMUopT> ; 3 - <https://www.diam4.ru/news.php?newsid=5616689> ; 4- <https://prom.ua/p9421950766-natr-hloristij-farma.html> ; 5- <https://russian.alibaba.com/product-detail/best-selling-ampicillin-micronize-99-pure-bulk-powder-ampicillin-1600121369998.html?spm=a2700.8699010.normalList.7.5b695d0647jn8v&s=p> ; 5.1 - <https://russian.alibaba.com/product-detail/cas-137-08-6-calcium-d-pantothenate-formula-d-calcium-vitamin-b5-62406837607.html?spm=a2700.8699010.29.1.65f1c35aJg9oZT> ; 6- <https://prom.ua/p431752360-glyukoza-poroshok.html> ; 7 - <https://prom.ua/p1125824225-metionin.html?&primelead=MS41> ; 8 - <https://prom.ua/p783600334-sulfat-magniyamagnij-ternokislyj.html?&primelead=MC41Mg> ; 9 - <https://prom.ua/p740948265-sulfat-ammoniya-ammoniumsulfate.html> ; 10- <https://prom.ua/p15167820028-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html> ; 11 - <https://prom.ua/p610003424-zhelezo-ternokisloe-zheleznyj.html> ; 12 - <https://russian.alibaba.com/product-detail/huminrich-mgso4-7h2o-mgso4-h2o-mgso4-magnesium-sulphate-magnesium-sulphate-heptahydrate-60565030836.html?spm=a2700.8699010.29.136.753838d6VoDDvS> ; 13 - <https://russian.alibaba.com/product-detail/supply-vitamin-b7-biotin-china-manufacturer-1600072260346.html?spm=a2700.8699010.normalList.10.44b13739XqZ3u5&s=p> ; 14 - <https://prom.ua/p1017643914-karbonat-kaltsiya-chistyj.html?&primelead=Mi44NQ> ; 15 - <https://russian.alibaba.com/product-detail/manufacture-supply-kanamycin-cas-59-01-8-1600059863958.html?spm=a2700.8699010.normalList.40.cf06330diN3uGH> ; 16 - <https://russian.alibaba.com/product-detail/hot-sale-manufacturer-price-white-powder-refined->

sucrose-cane-sugar-57-50-1-60788709916.html?spm=a2700.8699010.normalList.22.14864d52QDVVXk ; 17 -
<https://russian.alibaba.com/product-detail/98-diammonium-phosphate-dap-used-for-printmaking-manufacture-60244039973.html?spm=a2700.8699010.normalList.52.2a234f89IIUsow> ; 18 -
<https://prom.ua/p509556726377-sulf-magnya-mgso47h2o;wholesale.html> ; 19 -
<https://prom.ua/p712547378-limonna-kislota-harchova.html?&primelead=M4wNg> ; 20 -
<https://prom.ua/p610003456724-zhelezo-sernokisloe-zheleznyj.html> ; 21 -
<https://prom.ua/p654787023-kaltsij-hloristyj-hlorid.html> ; 22 - <https://prom.ua/p574122890044-tsink-sernokislyj-znso47h2o.html> ; 23 - <https://ua.all.biz/marganec-sulfat-g16702518> ; 24 -
<https://mes-group.prom.ua/p614515790142-mednyj-kuporos-sulfat.html> ; 25 -
<https://himik2.ru/product/ammony-molibdenvokislyy-nh46mo44h2o-ch> ; 26 -
<https://cheboksary.flagma.ru/bura-10h2o-o391400689.html> ; 27 -
<https://prom.ua/p257889652169-solaya-kislota.html>

Дані наведені у табл. 5.3, свідчать, що середовища для культивування *L. C. glutamicum* ATCC13803 є найдорожчим за вартістю (22,9, грн за 1 л) у зіставленні з поживними середовищами для культивування *E. coli* JW0885 (10,3 грн за 1 л), та *R. eutropha* 437-540 (1,56 грн за 1 л). З метою остаточного обрання найефективнішого біологічного агента, необхідним є розрахунок умовної вартості 1 г цільового продукту (табл. 5.4).

Таблиця 5.4

**Умовна вартість 1 г цільового продукту при культивуванні
E. coli JW0885, *C. glutamicum* ATCC13803 та *R. eutropha* 437-540**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Вихід синтезованого полімеру, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного полімеру за годину, г/год
<i>E. coli</i> JW0885	10,3	7,3±0,2	1,41	48	0,15
<i>C. glutamicum</i> ATCC13803	22,93	1,83	12,53	96	0,019
<i>R. eutropha</i> 437-540	1,56	0.37±0.01	4,22	72	0,005

Отже, умовна вартість 1 г полімеру при культивуванні *E. coli* JW0885 є найнижчою (1,41 грн/г) у порівнянні з умовною вартістю полімеру, одержаного культивуванням *C. glutamicum* ATCC13803 (12,53 грн/г) та *R. eutropha* 437-540 (4,22 грн/г).

Продуктивність біосинтезу полілактату у *E. coli* JW0885 є більшою майже у 8 разів порівняно з *C. glutamicum* ATCC13803 (0,15 та 0,019 г/л за год відповідно), та у 30 разів більша порівняно з *R. eutropha* 437-540 (0,005 г/л за год).

Зважаючи на найнижчу вартість 1 г цільового продукту (1,41 грн/г) та високу продуктивність (0,15 г/год при тривалості культивування 48 год), штам *E. coli* JW0885 є найкращим продуцентом полілактату з проаналізованих вище штамів.

Обґрунтування вибору компонентів поживного середовища. Ксилоза - це моносахарид із п'ятьма атомами вуглецю, основне джерело вуглецю, необхідного для росту бактерій *E. coli* JW0885. За використання ксилози, у порівнянні з глюкозою, синтезується полімер з вищим вмістом молочної кислоти (глюкоза – 26 мол.%, ксилоза - 60 мол.%, а також отримуємо вищу концентрацію самого полімеру (глюкоза – 6.5 г/л, ксилоза – 7.3 г/л).

Дріжджовий екстракт - переважно включає в себе вільні пептиди. Він природнім чином збагачений амінокислотами, додається як джерело азоту (вміст речовин, що мають у своєму складі азот становить близько 70%).

Триптон - набір пептидів, одержуваний гідролізом казеїну протеазою трипсином. Триптон широко використовують в мікробіології для приготування середовища LB і вирощування *E. coli*, а також інших мікроорганізмів. Триптон містить набір амінокислот, необхідних для росту бактерій.

Хлорид натрію – являється джерелом іонів натрію, необхідних для транспорту і осмотичного балансу.

Пантотенат кальцію – виступає у ролі фактора росту.

Ампіцилін - напівсинтетичний антибіотик пеніцилінового ряду, який додається до середовища для забезпечення розвитку та розмноження у середовищі лише рекомбінантного штаму *E. coli* стійкого до ампіциліну.

5.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера.

Культивування бактерій *E. coli* JW0885 планується проводити глибинним методом у ферментерах. Глибинне культивування – це основний метод, який використовують у біотехнологічних виробництвах. Даний метод має низку переваг у зрівнянні з поверхневим культивуванням:

- ✓ менш складний у організації;
- ✓ для здійснення процесу необхідні менші виробничі площі;
- ✓ рівень ймовірності інфікування знаходиться на порівняно низькому рівні;
- ✓ легкість у автоматизації та контролі;
- ✓ можливість отримання більшого виходу продукції [83].

Глибинне культивування продуцента передбачається здійснювати періодичним способом, адже немає необхідності культуру мікроорганізмів тривалий час підтримувати в стані експоненціального росту. При періодичному процесі весь обсяг поживного середовища засівають посівним матеріалом і процес культивування проводять в певних умовах необхідний проміжок часу, до того часу коли відбудеться накопичення потрібної кількості біомаси або цільового продукту.

З метою забезпечення росту аеробної культури у глибинних шарах поживного середовища необхідним є надходження кисню. У зв'язку з тим, що клітини бактерій здатні використати лише розчинений кисень, а розчинність його невелика (4-7 мг/л), є необхідність у його постійному поповненні. Для процесу аерації культур, які культивуються за використання рідкого середовища, використовують стерильне аераційне повітря або суміш азоту, діоксиду вуглецю та кисню. Також примусова

аерація комбiнується iз механiчним перемiшуванням, з метою збiльшення поверхнi контакту фаз мiж газом i рiдиною [84].

Оптимальна температура для культивування *E. coli* JW0885 - 30°C, а оптимальне значення рН нейтральне, тож можливий ризик контамінацiї стороннiми мiкроорганiзмами. Необхiдно провести стерилiзацiєю обладнання i комунакацiй, поживного середовища. Для запобiгання контамінацiї в ферментерi створюється надлишковий тиск.

Отже, культивування даного продуцент проходить за перiодичного глибинного культивування в стерильних та аеробних умовах.

Для культивування *E. coli* JW0885 обираємо ферментер в якому вiдбувається аерація, тобто оснащений барботером, оскiльки продуцент є аеробом i потребує кисню.

В данiй роботi передбачено використання ферментеру з механiчним перемiшуванням для iнтенсификацiї масообмiну. Оскiльки процес культивування *E. coli* JW0885 не супроводжується утворенням мiцелiю, утворенням речовин, якi призводили б до значного збiльшення в'язкостi середовища, та передбачає забезпечення не дуже iнтенсивного перемiшування середовища доцiльним є використання лопатевої мiшалки (з шiстьма лопатями). Також ферментер оснащений чотирма вiдбивними перегородками для запобiгання утворенню воронки при перемiшуванні.

Ферментер повинен бути забезпечений обладнанням для достатнього перемiшування культури, пiдтримки необхiдної температури, а також контрольно-вимiрювальним приладами.

Пiдтримання температури, оптимальної для росту клiтин бактерiй i прояву ними пiдвищеної фiзiолого-бiохiмiчної активностi, забезпечується сорочкою ферментера або системою змiйовикiв, якi забезпечують подачу води для охолодження або пари в процесi стерилiзацiї.

Спостереження за основними процесами життєдiяльностi органiзму здiйснюється контрольно-вимiрювальною апаратурою, що дозволяє пiдтримувати на заданому рiвнi температуру всерединi ферментера, рН

середовища, тиск в середині ферментера та інші параметри. Ферментер забезпечений пристосуваннями для перенесення інокуляту, внесення додаткових поживних речовин, необхідних для покращення розвитку продуцента та пристроєм для взяття проб.

Для забезпечення стерильності процесу ферментації в ферментері повинні бути використані торцеві ущільнення валу перемішуючого пристрою з паровим захистом. За допомогою застосування такої конструкції вдається практично повністю запобігти потраплянню атмосферного повітря в апарат, що є дуже важливим для збереження асептичних умов культивування [58].

Ферментер BIORUS об'ємом 80 м³, який виготовляється під замовлення, задовольняє всі вище зазначені вимоги (рис. 5.2). Далі наведена його технічна характеристика (табл. 5.5).

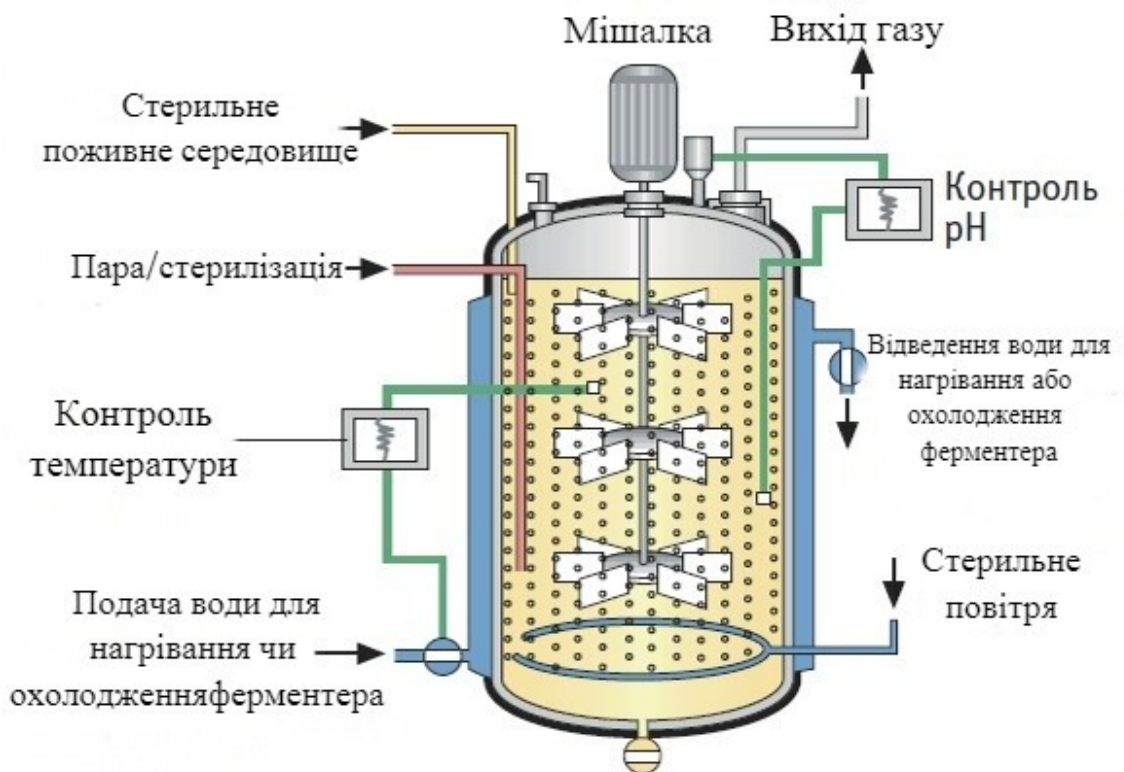


Рис. 5.2. Загальний вигляд ферментера.

Технічна характеристика ферментера BIORUS [85]

№	Елемент	Опис
1.	Резервуар	<p>Виконаний з нержавіючої сталі - марки AISI 316L для всіх поверхонь, що контактують з продуктом, AISI 304 - для тих поверхонь, що не контактують з продуктом (сорочка, зовнішня оболонка та інше). Ферментер обладнаний необхідним набором портів і роз'ємів для підключення датчиків і обв'язки біореактора.</p> <p>Відношення діаметра до висоти: 1:2,5. Коефіцієнт заповнення: 70%. Розрахунковий тиск: 0,3 МПа, розрахунковий тиск сорочки: 0,3 МПа. Ефективність теплообміну і розподілу температури усередині підвищена за рахунок поліпшеної системи поділу каналів.</p> <p>Донна частина ферментера - торосферична, без застійних зон. Контроль і підтримка заданої температури під час ферментації здійснюється за рахунок подачі води в сорочку, для охолодження, або активацією нагрівального елемента, для нагріву, для обсягів не більше 300 л. Якщо обсяг ферментера більше 300 літрів, то нагрів здійснюється шляхом циркуляції води через теплообмінник і подачею пари в нього. Використовується непрямий нагрів. Контроль температури в циркуляційному контурі здійснюється за допомогою вбудованого терморегулятора (робочий температурний діапазон - кімнатна температура + 8 ° С, до +60 ° С).</p> <p>Для контролю за рівнем рідини використовується оглядове вікно з великим кутом огляду, є підсвічування.</p> <p>Контроль і управління параметрами в стандартній комплектації - швидкість мішалки (20 - 1000 об / хв), температура, рН, рО₂, датчик піни, подача повітря на вентиляцію - через ротаметр, опційно - автоматичний контроль, через витратомір.</p>

Продовження табл. 5.5

2.	Система аерації	<p>Подача повітря в ферментер здійснюється через стерилізуючий фільтр, через ротаметр (Опція-MassFlowControl). Також система оснащена кільцевим барботером. На виході газу з біореактора встановлений конденсор, з метою конденсації вологи, що утворюється, стерилізуючий фільтр. Опціонально - підігрів фільтра вихідних газів.</p>
3.	Змішувальна система	<p>У стандартній комплектації - механічне одинарне ущільнення валу (Опція - подвійне або магнітне), регульовані по висоті лопаті мішалки, зйомні перегородка-відбійник.</p> <p>Електродвигун постійного струму з перетворювачем частоти. Також, на валу розташований пристрій механічного пеногасіння. Швидкість перемішування, оборотів в хвилину, в залежності від обсягу ферментера: до 1000 об / хв \pm 1%.</p>
4.	Контроль температури	<p>Здійснюється шляхом подачі заохолодженої води, для охолодження, в металеву сорочку резервуару. подача води здійснюється через автоматичний електромагнітний клапан, на підставі показань датчика температури. При зниженні температури нижче заданої система активує нагрівання - електричним нагрівальним елементом, або подачею пари в теплообмінник, в залежності від конфігурації.</p>
5.	Контроль піногасіння	<p>Автоматичне ПІД-регулювання і сигналізація.</p> <p>Для автоматичного контролю процесу піногасіння використовується електрод-датчик піни. При наявності сигналу від датчика піни активується подача піногасника перистальтичним насосом, по заданому користувачем алгоритму. Також, за необхідності, ферментер може бути обладнаний спеціальною лопаттю на верхньому рівні вала мішалки біореактора, з метою здійснення механічного піногасіння.</p>

6.	Контроль рН	<p>Діапазон відображення: 0,00 ~ 14,00 ± 0,01. Діапазон автоматичного регулювання: 2,00 ~ 12,00 ± 0,05. Передбачено автоматичне дозування кислоти або лугу перистальтичними насосами в залежності від показань датчика рН.</p>
7.	Контроль розчиненого кисню	<p>0-150 ± 3 - точність відображення: 0,1% Автоматичний контроль рівня розчиненого кисню здійснюється - зміною швидкості мішалки, швидкістю подачі повітря (опціонально), зміною тиску в посудині (опціонально). В якості опції доступна для замовлення комплектація цифровими датчиком DO нового покоління з функцією ISM, з розширеним функціоналом. У голівці кожного датчика ISM розміщується мікропроцесор. Це забезпечує всі переваги і характеристики датчиків ISM, принципово недосяжні для аналогових систем.</p>
8.	Система відбору проб	Передбачено стерильну систему відбору проб за використання спеціального пробовідбірного клапану.
	Внесення посівного матеріалу	Через спеціальний порт, з фламбуванням. Внесення посівного матеріалу здійснюється в полум'ї кільцевого пальника.
	Система управління	<p>Система управління Віогус В: на основі нового покоління програмованих логічних контролерів Siemens S7-200 Smart - продуманий, стабільний, універсальний тип ПЛК, здатний задовольнити різні вимоги в сфері автоматизації, в тому числі для управління виробничими процесами.</p> <p>Для відображення даних використовується 10-дюймовий сенсорний РК-екран, зручний для користувача, простий в управлінні. Система управління адаптована до різних типів датчиків і виконавчих пристроїв, сигналів введення / виведення.</p>

5.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва пластикової плівки

Полілактат - це здатний до біологічного розкладу біосумісний термопластичний аліфатичний поліефір, мономер якого є молочна кислота. Вироби з полілактату (ПЛ), а саме упаковка, характеризуються високою твердістю, прозорістю і блиском, а також більшою здатністю (на 50%) зберігати форму після стиснення і крутіння в порівнянні з пропіленом (ПП). У зв'язку з тим, що полілактат здатен до біодеградації за участі позаклітинних мікробних деполімераз до CO_2 і H_2O , він є доволі перспективним для використання у порівнянні з хімічно синтезованими полімерами, які не піддаються деградації і, як наслідок, стрімко накопичуються у навколишньому середовищі [86].

На першому етапі виділення та очищення полілактату у виробництві є відділення біомаси від власне культуральної рідини методом, що може бути застосований при даному виробництві. Необхідність даного етапу полягає у тому, щоб позбавити біомасу бактерій від залишків поживного середовища та метаболітів, які могли утворитися у процесі проведення попередніх етапів біосинтезу.

Далі необхідним етапом є обробка отриманої біомаси детергентом та наступна екстракція. Даний етап здійснюється з метою видалення ліпідних і білкових фракцій з біомаси та наступним проведенням процесу вилучення полімеру з клітин бактерій.

Наступним етапом є проведення процесу розділення утвореної на попередньому етапі суміші. Дана операція здійснюється з метою відокремлення полімеру від залишків бактеріальної маси. В результаті отриманий фугат інактивується і зливається в збірник для подальшої утилізації, а полімер подається на наступні етапи обробки.

Далі необхідним етапом є промивка отриманого полімеру дистильованою водою з метою позбавлення від залишків детергенту та наступне відділення очищеного полімеру від промивної води.

На завершальному етапі проводиться процес сушіння з метою забезпечення відповідних якісних характеристик субстанції полілактату та наступне пакування отриманої продукції [87].

Отже, узагальнюючи наведену вище інформацію, можна стверджувати, що технологічний процес отримання (виділення) полілактату з біомаси *E.coli* буде складатися з наступних етапів:

- 1) Відокремлення біомаси від культуральної рідини;
- 2) Обробка отриманої біомаси детергентом та наступна екстракція;
- 3) Відокремлення полімеру від залишків бактеріальної маси;
- 4) Промивка отриманого полімеру;
- 5) Сушіння полімеру;
- 6) Етап фасування, пакування та маркування цільового продукту.

5.3.1. Обґрунтування вибору способу відокремлення біомаси.

Після процесу біосинтезу отримана культуральна рідина складається із залишків компонентів поживного середовища, метаболітів та біомаси молочнокислих бактерій. Для відокремлення біомаси на сьогоднішній день застосовуються такі методи:

- фільтрація;
- флотація;
- центрифугування;
- сепарація.

Стадії збору, як для видалення клітин або клітинних компонентів, так і для збору клітинних компонентів після руйнування, слід здійснювати за допомогою обладнання та в зонах, призначених для зведення до мінімуму ризику контамінації [88].

Фільтрування – це процес відділення твердої фази від рідкої шляхом проходження суспензії через фільтруючий матеріал або через полімерну сітку з відповідним діаметром отворів.

Принципова схема роботи фільтру проста: суспензія потрапляє на фільтруючу перегородку, при цьому рідка фаза проходить фільтруючий

матеріал, а тверда фаза затримується на фільтруючому матеріалі у вигляді шару осаду. Для фільтрування використовують фільтр-преси різної конструкції: барабанні вакуум фільтри (рис. 5.3), стрічкові фільтр-преси (рис. 5.4), та інші конструкції.

Процес фільтрування є менш енергоємний, проте одночасно і менш ефективний порівняно з іншими методами.



Рис 5.3. Барабанний вакуум фільтр.



Рис 5.4. Стрічковий фільтр-прес.

Недоліки процесу фільтрування полягають у великих втратах біомаси за рахунок проходження частини клітин через пори фільтруючого матеріалу, через що пори засмічуються та потребують заміни чи регенерації [89].

Флотація – виділення з рідких середовищ твердих часток або часток іншої рідини за допомогою продування крізь неї газу. Флотація заснована на

прилипанні часток, які треба виділити до пухирців газу. Флотація поділяється на :

- механічну – у рідину занурюється пристрій, який дозволяє всмоктувати повітря з атмосфери за рахунок обертового руху рідини (рис. 5.5, а);
- пневматичну – продування повітря крізь дрібнопористі тканини (рис.5.5, б);
- вакуумну – пухирці повітря утворюються з розчинених у воді газів при створенні розрідження;
- електролітичну – в камері флотатора розташовуються 2 електроди, в результаті електролізу води утворюються газова фаза і відбувається процес флотації.

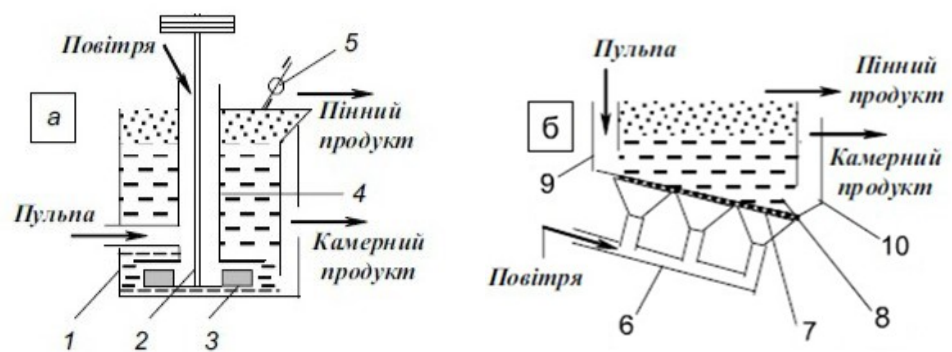


Рис.5.5. Схеми основних типів флотаційних машин: а – механічної; б – пневматичної. 1 – камера; 2 – вал; 3 – імпелер; 4 – повітряна труба; 5 – пінознімач; 6 – повітряна труба; 7– пориста перегородка; 8– конічна частина камери; 9 – завантажувальний карман; 10 – розвантажувальний карман.

Перевагами методу є його економічність, висока продуктивність і можливість використання в безперервних процесах.

Недоліком флотації являються великі втрати біомаси [90].

Центрифугування – процес зневоднення і розділення суспензій на рідку і тверду фази під дією відцентрових сил. Машини для здійснення таких операцій називаються центрифугами, які підрозділяються на фільтруючі (рис. 5.6), осаджувальні (рис. 5.7) і комбіновані (осаджувально-фільтруючі).

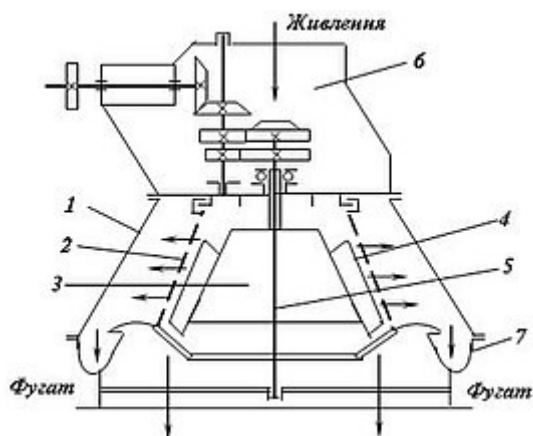


Рис. 5.6. Центрифуга фільтруюча шнекового типу: 1 – корпус центрифуги; 2 – фільтруючий ротор; 3 – корпус шнека; 4 – шкребки; 5 – головний вал; 6 – завантажувальний циліндр; 7 – жолоб для фугату.

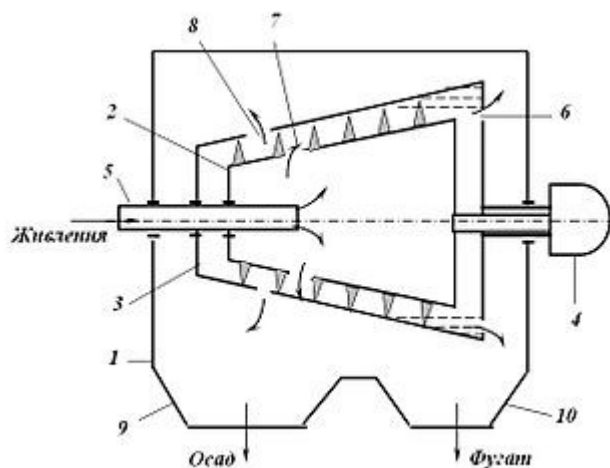


Рис.5.7. Осаджувальна центрифуга: 1 – корпус; 2 – шнек; 3 – ротор; 4 – планетарно-диференціальний механізм; 5 – живильна труба; 6 – зливні вікна; 7 – радіальні отвори; 8 – розвантажувальні отвори; 9 – камера осаду; 10 – камера фугату.

Метод центрифугування заснований на дії відцентрової сили на неоднорідної системи, що складається з двох та більше фаз. В промислових установках розділення під дією відцентрових сил застосовують для розділення часточок розміром від 0,5 мкм до 25 мм. При розділенні суспензії у фільтруючих центрифугах в роторі під дією відцентрових сил відбувається фільтрація рідини через фільтрувальну тканину або через металеву сітку з одночасним затриманням твердої фази; рідка фаза проходить через сито і

потім через отвори в роторі викидається в кожух центрифуги, а осад відвантажується або під час обертання ротору, або після його зупинки.

Недоліки процесу центрифугування полягають в:

- меншій ефективності у порівнянні з сепаруванням [91].

Сепарація – процес відділення твердої фази від рідкої, оснований на відділенні часточок з різними характеристиками. Рушійною силою процесу являється відцентрова сила.

Ефективність сепарування пропорційна частоті обертів барабану, діаметру барабану, розміру часток, різниці густин твердої та рідкої фаз.

По технологічному призначенню сепаратори поділяються на такі типи:

- фільтруючі для розділення двох взаємно нерозчинних розчинів з одночасним виділенням твердої фази;
- осаджувальні для відділення твердої фази від рідкої;
- фільтруючо-осаджувальні можуть налаштовуватися як фільтруючі або як очисні в залежності від положення ротору;
- згущуючі для підвищення концентрації зважених чи колоїдних компонентів суспензії з одночасним розділенням у випадку емульсії;
- розподільчі для розподілення зважених компонентів суспензії по розміру або густині часток [92, 93].



Рис. 5.8. Сепаратор-очищувач.

Переваги:

- менші втрати біомаси порівняно з фільтруванням та флотацією;
- можливість автоматизувати процес;
- більша ефективність порівняно з центрифугуванням.

Отже, провівши аналіз всіх наведених вище способів відділення біомаси бактерій від власне культуральної рідини доречним буде обрати метод сепарування. Адже застосовуючи даний метод спостерігаються найменші втрати біомаси бактерій, ефективність поділу знаходиться на достатньо високому рівні та наявна можливість проведення автоматизації процесу. Даний метод також використовується на етапі відокремлення полімеру від залишків бактеріальної маси та від промивної води.

5.3.2. Обґрунтування вибору методу проведення екстракції.

Значну роль в загальній вартості виробництва полілактату (ПЛ) грає спосіб екстракції полімеру з біомаси бактерій. Обираючи метод необхідним є врахування наступних показників:

- дороговизну реагентів;
- об'єми відходів, що утворюються;
- ефективність вилучення полімеру;
- ступінь його чистоти.

В даний час використовують такі підходи для виділення полімеру:

- ✓ екстракцію органічними розчинниками;
- ✓ обробку біомаси розчинами лугів, кислот, детергентів, ферментами, а також їх різні поєднання.

Більшість процесів виділення ПЛ з клітин базуються на екстракції полімеру органічними галогенвмісними розчинниками (хлороформ, дихлорметан, дихлоретан). Даний метод вимагає великої кількості летючого розчинника, а це збільшує загальну вартість виробництва і до того ж веде до забруднення навколишнього середовища. Клітинна біомаса може піддаватися обробці лужним розчином або розчином гіпохлориду натрію. Але при даній обробці можлива деструкція ефірних зв'язків і, як наслідок, зменшення значення молекулярної маси полімеру. Обробка бактеріальної суспензії

гіпохлоридом в поєднанні з поверхнево-активними речовинами показала більш високу ефективність процесу екстракції з меншим пошкодженням полімеру. Ефективність і економічність процесу екстракції буде в першу чергу залежати від вмісту полімеру в клітинах і вартості застосовуваних розчинників. Відомий спосіб, що включає температурну підготовку біомаси, ферментні руйнування клітинних стінок, виділення і промивання полімеру аніонними і поверхнево-активними речовинами [94].

У зв'язку з важливим значенням екстракції в загальній технологічній схемі отримання ПЛ проводяться дослідження, спрямовані на підвищення ефективності процесу за рахунок удосконалення апаратів для екстракції, застосування діафільтрації, гарячої екстракції слабозчинними полімер розчинниками, що не містять галогенів, використанням суперкритичної флюїдної екстракції рідким двоокисом вуглецю.

Другий підхід виділення полімеру (інша назва «безреагентний») полягає саме у видаленні білків та вуглеводів (в даному випадку забруднюючих компонентів), а не в процесі безпосередньої екстракції полімеру з клітин бактерій. Виходячи з того, що полімер асоціюється в клітинах бактерій у вигляді гранул, але при цьому гранули ще додатково містять білки-ферменти, що виступають у ролі каталізаторів реакцій синтезу і біорозпаду полімерних сполук в клітині. Описано кілька методів виділення полімеру, включаючи різні попередні способи руйнування клітин, а саме термічну обробку біомаси з наступним руйнуванням ферментами, обробку біомаси різними детергентами і розчинами лугів. Метод виділення полімеру за допомогою детергентів відрізняється від екстракції органічними розчинниками, так як руйнуються і видаляються багато клітинних компонентів і залишається у вигляді залишку фракція полімеру. Наприклад, після обробки біомаси *Ralstonia eutropha* розчинами додецилсульфата натрію різної концентрації і нагрівання суспензії до 121 °С здійснено успішне виділення гранул полілактату з вмістом домішок лише 3-4%. Аналіз результатів детергентного методу отримання полімеру виявив недоліки цього методу, серед яких можна

виділити наступні: зразки полімеру відрізнялися недостатньою чистотою, а детергенти - високою вартістю. Крім того, було показано, що цей метод вимагає великих об'ємів детергенту і достатньо великих об'ємів води очищеної для очищення полілактату від детергенту і уламків клітин бактерій. Однак в інших дослідженнях показано і перевага цього методу: можна використовувати сирі клітини відразу ж після ферментації, для екстракційного методу воду необхідно видаляти. Одним з очевидних переваг детергентного методу є відсутність органічних розчинників. Більш того, цей метод при його оптимізації може давати високі виходи, він придатний для екстракції різних типів біодеградабельних полімерів з різним вмістом мономерних одиниць різної довжини С-ланцюгів. В літературних джерелах також описаний процес отримання полімерних гранул після обробки клітин лізуючими ферментами. Цей спосіб особливо ефективний для виділення полімеру з клітин з високим його вмістом [94].

Колективом професора Е. Дж. Сински і співавторами (Massachusetts Institute of Technology (MIT), США) [95] дана оцінка можливості використання різних детергентів для виділення полігідроксиалканоатів (ПГА) з клітин *Ralstonia eutropha*, а також рекомбінантних штамів *Escherichia coli*. У цій роботі показано, що в залежності від вмісту полімеру в клітинах досліджені детергенти дозволяли отримати полімер з високим виходом і чистотою. Детергенти на основі похідних алкілбензол-сульфонової кислоти (LAS-99) мають найвищі екстрагуючі властивості. Крім того, LAS-99 є біодеградуєчим сурфактантом і безпечним для навколишнього середовища. У зв'язку з цим простий метод виділення недорогими хімікатами може бути найбільш ефективним і економічним процесом виділення полімеру.

Таким чином, відомі на сьогодні методи екстракції не відповідають всім необхідним вимогам (екологічність, невисокі витрати на реагенти, повнота вилучення і чистота полімеру). Аналіз літератури показує необхідність оптимізації методів екстракції полімеру як важливої умови підвищення

ефективності процесу в цілому і зниження вартості полімеру як кінцевого продукту біотехнології. Тому далі проведено порівняльний аналіз методів екстракції полімеру із застосуванням різних реагентів.

Екстракція полімеру із застосуванням розчинників. При дослідженні розчинності ПГА виявлено, що найвища розчинність досягається при використанні тетрахлоретану. Однак його застосування небажане внаслідок високої токсичності (сильна ниркова і печінкова отрута); гранично допустима концентрація парів у повітрі $0,001 \text{ мг/м}^3$. На процес розчинення також впливає хімічний склад ПГА. Показано, що розчинність кополімерних зразків вище, ніж у гомогенних [94].

На прикладі хлороформу показано, що зі збільшенням обсягу розчинника повнота екстракції полімеру зростала практично лінійно. Так, в режимі однократного вилучення полімеру при використанні від 5 до 10 об'ємів розчинника на один об'єм сирової біомаси повнота екстракції складала відповідно 22 і 58%; зі збільшенням об'єму розчинника повнота екстракції збільшилася до 74%. Молекулярна маса отриманих зразків не залежала від об'єму використаного розчинника. Співвідношення біомаса-розчинник насамперед визначається граничною розчинністю полімеру (для сополімерів можливо зменшити це співвідношення за рахунок кращої розчинності останніх) і його вмістом в біомасі [94].

З метою підвищення ефективності процесу (зниження часу і витрати розчинників) досліджено вплив нагрівання і кратності екстракції на повноту вилучення полімеру з біомаси бактерій. При одноразовій обробці біомаси хлороформом при кімнатній температурі (25°C) протягом 2 год кількість виділеного полімеру була низькою - 20%. Труднощі були викликані особливостями будови клітинних мембран, а також наявністю води, яка міститься в біомасі і не змішується з вибраними розчинниками. При повторному циклі повнота виділення зросла до 49%; після триразового повторення процедури вдалося виділити 57,4% полімеру.

Встановлено, що проведення процесу при нагріванні суміші до 66°C повнота екстракції полімеру значно збільшується і при триразовому витяганні зростає до 80%. Повторення процедури не привело до значного збільшення ступеня вилучення, але збільшило тривалість процесу і витрата розчинника, при триразовій екстракції витрата розчинника склав 99,1 г/г полімеру, при п'ятикратної - 115,2 г/г полімеру. Заміна хлороформу дихлорметаном дала аналогічні виходи полімеру (близько 80%) і не привела до збільшення ступеня вилучення.

При додаванні до хлороформу або дихлорметану етилового спирту і проведенні триразової екстракції з нагріванням вихід полімеру збільшувався максимально до 88,5-89,8 %. Етиловий спирт витягує воду з клітини і сприяє руйнуванню бішарової структури клітинної мембрани, при цьому відбувається агрегація ліпідних молекул усередині мембрани, що супроводжується появою в мембрані води. В результаті цього бар'єрні функції мембрани знижуються [96], тому екстракція клітинного вмісту, в даному випадку полімеру, полегшується.

Крім типу розчинника варіювали температуру екстракції. Отримано серія зразків, які розрізнялися як за величиною молекулярної маси, так і ступеня хімічної чистоти (табл. 5.6) [94].

Таблиця 5.6

Характеристики зразків полімерів виділених з біомаси із застосуванням різних реагентів

№	Спосіб екстракції полімеру	Час екстракції, год	Повнота екстракції, %	Ліпіди, % від маси зразка	Сума жирних кислот мол, %
1	Хлороформ: етанол (2:1 за об'ємом)	6	88,5	3,0	2,4
2	Дихлорметан: етанол (2:1 за об'ємом)	6	83,2	2,8	2,2
3	Хлороформ: етанол (2:1 за об'ємом), нагрівання	6	91,0	1,8	1,3

4	Дихлорметан: етанол (2:1 за об'ємом), нагрівання	6	92,3	2,0	1,4
5	Попередня обробка етанолом при рН 10-11, обробка ацетоном, перерозчинених гранул в хлороформі	8	94,8	-	-

Так, зразок № 1 отримано екстракцією полімеру з біомаси сумішшю (хлороформ-спирт 2:1 за об'ємом). У зразку присутні залишкові ліпіди до 3%. Зразок № 2 отримано аналогічно, при використанні дихлорметану вихід полімеру становив 83,2%, вміст ліпідів - 2,8%. Застосування нагрівання підвищувало повноту екстракції. Зразки № 3 і 4 екстрагували при нагріванні до температури кипіння сумішей протягом години, потім осаджували полімер подвійним об'ємом гексану і відокремлювали осаджений полімер фільтруванням. Вміст ліпідів в зразках склало близько двох відсотків, повнота виділення зросла до 91%. Зразок № 5 отриманий модифікованим методом з використанням дихлорметану, що включає попередню обробку біомаси етиловим спиртом при рН 10.5-11.0 і кип'ятінням зі зворотним холодильником протягом 30 хв з дворазовим відмиванням полімеру етанолом, наступною обробкою біомаси ацетоном, центрифугуванням і екстракцією знежиреної біомаси дихлорметаном. Така обробка дозволила отримати зразок, вільний від ліпідних забруднень.

Як впливає з даних табл. 1, кількість домішок (ліпідів і жирних кислот (ЖК)) була в зразках полімеру значним і в залежності від методу могло становити від 1 до 3%; сума жирних кислот від 1,3 до 2,4% [94].

З огляду на те, що хлороформ більш токсичний, ніж дихлорметан (4 і 2-й клас небезпеки), дихлорметан має велику розчинну здатність по

відношенню до полімеру, не утворює азеотропи з осаджувачем (гексан), або його азеотропи лежать в прийнятних для екстракції межах, крім того, вартість дихлорметану значно нижче, ніж у хлороформу, тому подальше застосування хлороформу як екстрагента для полімеру є недоцільним.

У подальших дослідях, які наведені в роботі Киселева та Демиденко [94], в якості розчинника використовували дихлорметан. Як осаджувач у всіх дослідях застосовували гексан, хоча для осадження можна використовувати будь-який розчинник, який не є розчинником для полімеру: етиловий, метиловий, ізопропіловий спирт. Основна проблема полягає в утворенні азеотропних сумішей між деякими парами розчинників, що негативно позначається на їх регенерації та поверненні у виробництво. Найбільш прийнятною прийнята пара «екстрагент - осаджувач» суміш дихлорметану з гексаном, яка не утворює азеотропної суміші. Слід зазначити, що застосовуються в якості осаджувача легкозаймистих рідин (ЛЗР) роблять необхідним організацію спеціальних заходів безпечної роботи і зберігання, проте застосування цього методу виправдане для отримання обмежених за обсягами партій полімеру високого ступеня чистоти, наприклад для біомедичних цілей.

Таким чином, екстракція полімеру з біомаси клітин відбувається шляхом зміни методу варіюванням складу екстрагентів, температури і ряду інших параметрів дозволяє досягти 92-96% повноти вилучення полімеру і мінімізувати домішки. Однак при цьому неминуче виникає необхідність введення блоку розділення суміші «розчинник - осаджувач», що значно ускладнює процес. Так, при використанні системи «дихлорметан - етанол» з подальшим осадженням гексаном утворюється азеотропна суміш гексану з етанолом. Для запобігання утворенню азеотропної суміші «гексан - етанол» буде доцільно проводити попередньо обробку біомаси етанолом, а вже на наступній стадії - екстракцію дихлорметаном. Можна запропонувати другий варіант: відмовитися від використання в якості осаджувача гексану і

проводити процес осадження полімеру етанолом. Така заміна не робить негативного впливу на продукт при належній якості етилового спирту.

Дослідження безреагентного методу екстракції полімеру. У роботі Киселева та Демиденко [94] для обробки біомаси бактерій був обраний додецилсульфат натрію (ДДС-Na) - один з найпопулярніших та достатньо недорогих детергентів, котрий наразі набув широкого поширення в парфумерній, хімічній, фармацевтичній промисловості. Дія ДДС-Na заснована на його солюбілізуючій здатності. Метою даної обробки є видалення ліпідних і білкових фракцій з біомаси та отримання гранул полімеру. Обробку проводили протягом години при різній температурі. Беручи до уваги, що в результаті такої обробки полімер не розчиняється, а в розчин переходять з біомаси ліпіди і речовини білкової природи, як критерій оцінки ефективності обробки обрана чистота полімеру. Витрата ДДС-Na в дослідах в середньому склала 0,12-0,62 г/г полімеру (табл. 5.7).

Таблиця 5.7

Вихід полімеру після обробки біомаси ДДС-Na

№	Концентрація ДДС-Na, %	Температура, °С	Вихід, %	Вміст домішок, %	Молекулярна маса ($M_v \cdot 10^5$) г/моль
1	1	20	96,42	16,65	3,4
2	2,5	20	94,83	14,37	3,5
3	5	20	93,14	12,92	3,9
4	1	40	95,31	14,91	4,2
5	2,5	40	92,21	12,94	4,9
6	5	40	90,13	9,91	5,8
7	1	60	93,11	12,78	5,1
8	2,5	60	89,53	9,30	6,2
9	5	60	87,38	7,07	6,3

Примітка: вміст домішок - сумарний вміст білків, ліпідів і інших неідентифікованих компонентів в отриманому зразку полімеру.

Кращі результати досягнуті в досвіді №9. Отримані зразки мали досить великий розкид по домішках. Найменший вміст ліпідів в перерахунку на ЖК містить зразок №9 (0,2-0,4%), отриманий при обробці 5%-ним розчином

ДДС-На. У зразках №7 і 8 вміст жирних кислот склало близько 0,8-1,1%, крім того, у всіх зразках зафіксовано наявність 1-7% речовин білкової природи.

Зі зміною кількості домішок змінювалася молекулярна маса зразків. Зразки, що містять найбільшу кількість домішок, характеризуються найменшою молекулярною масою, а зі зниженням домішок - молекулярна маса підвищується. Вплив температури також мав позитивний ефект на кількість домішок в полімері, і з ростом температури чистота полімеру збільшується. Кращі показники досягнуті при обробці при 60°C, чистота для різних концентрацій склала - 87; 91; 93% відповідно. Крім температури, великий вплив на чистоту полімеру надавала тривалість обробки біомаси. Обробку біомаси проводили при температурі 60°C протягом 20, 40, 60, 100 хв. Показано, що зі збільшенням тривалості обробки чистота полімеру зростала лінійно. Найбільш високий ступінь чистоти полімеру отримана при обробці протягом 60 хв (93%), подальша обробка не приводила до підвищення чистоти зразків. В результаті обробки біомаси розчинами детергенту вдалося отримати зразки полімеру з чистотою 92%; при цьому частка ліпідів склала 0,2-0,4%. При обробці детергентами з полімеру видалені практично всі ліпідні складові, зруйновані клітинні стінки, імовірно при подальшій обробці органічними розчинниками вдасться знизити витрати на розчинники. Така обробка дозволяє на другому етапі не використовувати суміші розчинників (трихлорметан - етанол), а застосовувати чисті компоненти, що виключає утворення азеотропних сумішей, знижує витрати на регенерацію розчинників [94].

Отже, в результаті виконаного порівняльного дослідження різних методів екстракції полімеру з біомаси бактерій запропоновано два підходи: з застосуванням екстрагента (дихлорметан) і осаджувача (гексан) для одержання зразків біомедичного призначення та безреагентний метод із застосуванням детергента додецилсульфату натрію (ДДС-На), що дозволяє більш економічним способом отримувати високі виходи полімеру для технічних цілей (тара, пакувальна продукція).

5.3.3. Обґрунтування вибору способу сушіння полімеру.

Кінцевою формою виробництва мікробного полілактату є аморфні гранули, оскільки дана форма є найбільш доцільною для подальшої обробки полімеру з метою отримання біодеградабельної пластикової плівки. Головним параметром при виборі методу висушування є діапазон температур висушування. З метою запобігання злипання гранул у процесі висушування діапазон температур повинен знаходитись в межах 55-60 °C [97].

Для отримання гранул полімеру бути використані наступні методи:

- ✓ сушіння за використання розпилювальної сушарки;
- ✓ сублімаційна сушка (ліофілізація);
- ✓ вакуумна сушка.

Сушіння за допомогою розпилювальної сушарки (*рис. 5.9*) - це швидкий та економічно вигідний метод сушіння, за допомогою якого можна отримати сухі частинки порошку з бажаними властивостями, такими як хороша текучість, питомий вміст залишкової вологи та рівномірний розподіл форми та розміру. Цей процес можна розділити на чотири етапи. По-перше, рідкий продукт за допомогою механічних форсунок або розпилюючих високооберткових дисків диспергується на дрібні краплі. Потім утворений спрей стикається з нагрітим газом в сушильній камері. Третя фаза процесу сушіння розпиленням включає висушування крапель та утворення частинок. Після цього тверді частинки відокремлюються від сушильного повітря. В основному важкі частинки відокремлюються внаслідок гравітаційної сили, а дрібні частинки – за допомогою циклонів [98].



Рис. 5.9. Розпилювальна сушарка.

Перевагами цього методу сушіння є швидкість, безперервність процесу, відносна легкість організації та рентабельність процесу.

Недоліком даного способу сушіння являється контакт висушуваної речовини з високою температурою та як наслідок злипання гранул полілактату у процесі висушування.

Ліофілізація - це процес висушування холодом з виморожуванням вологи у бактеріальних препаратах чи інших матеріалах. Цей процес можна розділити на 3 етапи: заморожування, первинна сушка та вторинна сушка. На першому етапі відбувається власне заморожування продукту при низьких температурах. На етапі первинної сушки заморожену воду видаляють сублімацією під вакуумом, а на вторинній стадії сушіння незамерзлу воду видаляють десорбцією. Метод ліофілізації дозволяє отримувати сухі тканини, препарати, продукти тощо без втрати їх структурної цілісності та біологічної активності. При ліофілізації більшість білків не піддається денатурації і може довго зберігатися при помірному охолодженні (близько 0°C). Ліофілізовані тканини і препарати при зволоженні відновлюють свої первинні властивості. Ліофілізацію застосовують при необхідності тривалого зберігання і консервування різних продуктів біологічного походження, для одержання

сухої плазми донорської крові, сухих сироваток і вакцин, при трансплантації органів і тканин, у фармацевтичній і харчовій промисловості.

Переваги ліофілізації:

- збереження дисперсної фази;
- висушену продукт можна зберігати досить тривалий термін;
- відсутність впливу високих температур.

Недоліками ліофілізації є необхідність ретельної підготовки матеріалу до сушки, створення високого вакууму для повноти висихання, тривалість сушіння і досить високі енерговитрати [99].

Наступним способом висушування є вакуумна сушка (рис. 5.10). При її використанні зразки сушать шляхом випаровування рідини. Сушіння відбувається періодично, тобто у сушильну шафу на полиці закладають вологий матеріал, створюють вакуум, і починають обігрівання шафи паром через порожнини в плитах або електричним струмом. Процес закінчують коли матеріал матиме потрібну вологість, і після чого готовий сухий матеріал вивантажують [100].

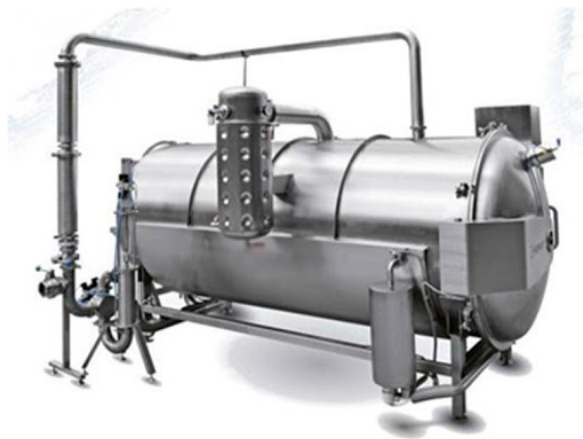


Рис. 2.10. Вакуумна сушарка.

Перевагами цього методу є :

- ✓ робота за нижчих температур у порівнянні з розпилювальною сушаркою;

- ✓ матеріал, який піддається висушуванню, не потребує спеціальної підготовки;
- ✓ тривалість сушіння і енерговитрати є меншими у порівнянні з ліофілізацією.

Отже, проаналізувавши способи висушування гранул полілактату, найбільш доцільним є використання вакуумної сушки, оскільки, по-перше, відсутній вплив високих температур у порівнянні з розпилювальною сушкою і, по-друге, тривалість сушіння і енерговитрати є меншими у порівнянні з ліофілізацією.

5.4. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря)

У відповідності до СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика» підготовку компонентів та виготовлення більшості продукції необхідно здійснювати принаймні в навколишньому середовищі класу D, щоб забезпечити достатньо низький рівень ризику контамінації частками і мікроорганізмами [101]. Тому виготовлення плівки з полілактату планується здійснювати згідно вимог GMP в асептичних умовах в приміщеннях класу чистоти D, з метою зведення до мінімуму контамінації мікроорганізмами поверхні плівки під час процесу виготовлення.

Персонал. Потрібно, щоб у чистих зонах була присутня лише мінімальна кількість необхідного персоналу; це особливо важливо при обробці в асептичних умовах. Інспектування і контроль, наскільки можливо, слід здійснювати ззовні чистих зон.

Весь персонал (включаючи співробітників, які займаються прибиранням і технічним обслуговуванням), який працює в таких зонах, повинен регулярно проходити навчання з дисциплін, пов'язаних з належним виробництвом стерильної продукції, включаючи питання гігієни й основи мікробіології. Якщо необхідно, щоб сторонні співробітники, які не пройшли такого навчання (наприклад, працюючі за контрактом будівельники або наладчики обладнання), знаходилися в чистому приміщенні, то вони мають

бути докладно проінструктовані й за ними має бути встановлений суворий нагляд.

Необхідні суворі вимоги до особистої гігієни і чистоти. Співробітники, зайняті у виробництві стерильних лікарських препаратів, мають бути проінструктовані про те, що вони зобов'язані доповідати про будь-які обставини, що можуть бути причиною поширення аномальної кількості або типів забруднень; при виникненні таких обставин бажані періодичні перевірки здоров'я співробітників. Дії, необхідні щодо персоналу, який може стати джерелом мікробіологічної контамінації, мають визначатися призначеною компетентною особою.

У чистих зонах не допускається носити наручні годинники і ювелірні прикраси, а також використовувати косметику. Переодягатися і митися необхідно згідно з письмовими методиками, розробленими так, щоб зводити до мінімуму ризик контамінації одягу для роботи в чистих зонах і не внести забруднення в чисті зони.

Необхідно, щоб одяг і його якість відповідали процесу і класу робочої зони. Одяг слід носити таким чином, щоб захистити продукцію від контамінації. У приміщеннях класу чистоти D волосся і борода (при наявності) мають бути закриті; слід носити звичайний захисний костюм і відповідне взуття або бахіли; мають бути вжиті відповідні заходи для запобігання будь-якій контамінації чистої зони ззовні.

Одяг для чистих приміщень необхідно очищати і поводитися з ним таким чином, щоб він не піддавався додатковому забрудненню, що згодом може стати причиною контамінації. Ці роботи слід виконувати відповідно до письмових методик. Для такого одягу бажано мати окремі пральні. Неправильна обробка одягу пошкоджує волокна тканини, що збільшує ризик відділення часточок [101].

Дезінфікуючих засобів. Щоб обрати миючий та дезінфікуючий засіб, необхідно врахувати його вартість та витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м² затрачається 100 мл

робочого розчину мийного чи дезінфікувального засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).

Вибір мийних та дезінфікуючих засобів залежить насамперед від об'єкта, який буде піддаватися обробці, тобто для обладнання, комунікацій та інвентарю, або для стін, стелі та підлоги.

Враховуючи такі вимоги, до миючих та дезінфікуючих засобів, як рівень антимікробної активності, необхідність забезпечувати повне видалення механічного, білкового та жирового забруднень шляхом їх диспергування та емульгування, а також бути найбільш ефективними, безпечними і недорогими, було проаналізовано наступні миючі та дезінфікуючі засоби: Дезекон ОМ, Дезекон, Vasept Forte, Славін-Дельта, Віндез ЧАС-С та Санікон. Дані мийно-дезінфікуючі засоби дозволені до використання на біотехнологічних та фармацевтичних виробництвах згідно «Державного реєстру дезінфекційних засобів» (2021).

Вартість концентратів мийних та дезінфікувальних засобів та їх витрати при виробництві наведені в таблиці 5.8.

Проаналізувавши дані, наведені в табл. 5.8, можна зробити такі висновки:

- для миття обладнання, інвентарю, комунікацій, тари доцільно використовувати мийний засіб «Vasept forte» та «Дезекон».

«Vasept forte»: Засіб володіє мийно-дезінфікуючими властивостями, що дає змогу заощадити кошти. Видаляє механічні, білкові, жирові забруднення із зовнішніх поверхонь. Засіб має мийні, очищувальні та дезодоруючі властивості, не пошкоджує об'єкти, що піддаються знезараженню (вироби, з пластмас, гуми, металу, нержавіючої сталі, міді, алюмінію, свинцю і олова, скла та інших матеріалів), не фіксує на поверхнях об'єктів обробки забруднення органічного походження, не залишаючи плям та нальоту.

Склад даного засобу є комбінованим, що забезпечує більш ефективне очищення та дезінфекцію у порівнянні з однокомпонентними засобами.

Основними діючими речовинами є четвертинні амонієві сполуки та спирт ізопропіловий. Дані компоненти мають ряд позитивних та негативних властивостей, але при їх комбінації ці властивості взаємозаміщуються.

Засіб «VASEPT forte», має антимікробну активність до грамнегативних та грампозитивних бактерій (включаючи туберкульоз, небезпечних та особливо небезпечних (чуми, холери, туляремія, черевний тиф, клостридії, легіонельоз), має бактерицидні (включаючи збудників туберкульозу, сальмонельозів, шигельозів та умовно патогенних мікроорганізмів — збудників, віруліцидні, фунгіцидні та спороцидні властивості.

Засіб дезінфікуючий «VASEPT forte», за параметрами гострої токсичності відповідно до ГОСТ 12.1.007-76 належить до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру та при введенні у шлунок (4 клас безпеки); [103].

«Дезекон»: Рідкий концентрований лужний миючий дезінфікуючий засіб з посиленою мийною дією для дезінфекції, передстерилізаційного очищення, щоденних і генеральних прибирань і санітарної обробки.

Діючими речовинами в ньому виступають комплекс 4-х четвертинних амонієвих солей (не менше 5,5%) і синергічно діючих допоміжних компонентів, які поєднують дезінфікуючу, виражену мийну і дезодоруючу дію. рН засобу $12,4 \pm 0,5$.

Даний засіб ефективний проти грам + і грам- бактерій (включаючи *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila*, *P.aeruginosa* (*Antibiotic resistant*), та ін.), вірусів, патогенних грибів і цвілевих грибів.

Має IV клас безпеки (малонебезпечні речовини за ДСТУ 12.1.007-76) при інгаляційній та наскірній дії, не містить летючих і екологічно неблагодіючих компонентів, не подразнює органи дихання і очі, має приємний запах. Не має сенсibiliзуючої, мутагенної, тератогенної, гонадотоксичної і канцерогенної дії [104].

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва пробіотичного препарату

Назва мийного/дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Дезекон ОМ*	Обладнання, інвентар	0,5	23875	4775	441	10528,7
Дезекон*	Обладнання, інвентар	0,5	23875	4775	255	6088,1
Vasept Forte*	Обладнання, інвентар	0,5	23875	4775	201	4798,8
Славін-Дельта*	Стіни, підлога, двері, інвентар, тара	0,5	12095	1209,5	546	537
Віндез ЧАС-С*	Стіни, підлога, двері, інвентар, тара	0,2	12095	1209,5	300	648
Санікон*	Стіни, підлога, двері, інвентар, тара	0,2	12095	1209,5	255	550,8

* - засоби для дезінфекції було взято з Державного реєстру дезінфекційних засобів 2021 рік.

Примітки: Ціни мийних та/або дезінфікуючих засобів станом на 01.12.2021.

- для миття та дезінфекції стін, підлоги, та дверей – «Віндез ЧАС – С» та «Санікон».

«Віндез ЧАС-С»: Даний засіб має мийно-дезінфікуючі властивості.

Засіб має високу антимікробну активність завдяки комбінованому складу: четвертинно амонієві сполуки і спирт [105].

«Санікон»: Рідкий концентрований лужний миючий дезінфікуючий засіб з посиленою мийною дією для дезінфекції, передстерилізаційного очищення, щоденних і генеральних прибирань і санітарної обробки.

Миючий дезінфікуючий засіб «Санікон» володіє широким спектром антимікробної активності, має бактерицидну, віруліцидну, фунгіцидну та спороцидну дії.

Має IV клас небезпеки (малонебезпечні речовини по ГОСТ 12.1.007-76). Не містить альдегідів, фосфатів, активного хлору, кисню та інших агресивних, високотоксичних, летких і екологічно небезпечних компонентів. Засіб дозволено для застосування в присутності пацієнтів та персоналу, що не бере участь в проведенні дезінфекції, не дратує органи дихання і очі [106].

Засоби варто застосовувати з інтервалом в 3 місяці для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів.

Вентиляційне повітря. Повітря виробничих приміщень – потенційне джерело забруднення препаратів, тому його очищення є одним з ключових завдань підготовки виробництва. Як вентиляційне повітря розуміють повітря, очищене від часток та мікроорганізмів у системі підготовки дво- або триступінчатої фільтрації, яке надходить до приміщень виробництва нестерильних лікарських засобів.

Системи вентиляції та кондиціонування повітря мають бути обладнані звуковбирними й віброгасячими пристроями, з метою зниження рівня шуму та вібрації до заданих меж, автоматичним регулюванням температури й вологості, блокуванням, сигналізацією.

Повітроводи слід періодично очищати та проводити їх дезінфекційну обробку для уникнення розвитку сторонньої мікрофлори. Повітроводи,

фільтрувальні камери і їх конструкції мають бути виготовлені з матеріалу, стійкого до дезінфекційних розчинів з метою уникнення їх пошкодження.

Очищення припливного повітря має бути ступінчастим, з метою видалення частинок різного діаметру, що наявні у повітрі. Кількість рівнів очищення обумовлюється необхідною чистотою повітряного середовища приміщення.

З метою очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) необхідним є застосування фільтрів класу G – фільтрів грубого очищення.

З метою очищення повітря до ступеня $E = 95\%$ необхідним є застосування фільтрів класу F – фільтрів тонкої очистки.

На кожному рівні фільтри повинні відповідати наступним класам:

- для виробничих приміщеннях D класу чистоти:

1 рівень – не нижче класу G 3

2 рівень – не нижче класу F 6

На кожному рівні очищення слід передбачити штуцери з метою відбору проб повітря для визначення концентрації механічних часток до та після фільтрації [101, 107].

Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки. Підготовка матеріалів для первинного пакування включає порядок їх звільнення від тари, перегляду та відбракування (при необхідності).

Персонал, що здійснює підготовку матеріалів для первинного пакування, має бути ознайомлений зі стандартними робочими процедурами щодо підготовки матеріалів для первинного пакування.

Контроль мікробіологічної чистоти матеріалів для первинного пакування проводять відповідно з Методичними рекомендаціями щодо контролю мікробіологічної чистоти матеріалів для первинного пакування, затвердженими наказом МОЗ України 14.12.01 N 502.

Звільнення від тари рекомендується проводити з використанням напіваавтомату, що забезпечує підняття її на рівень транспортуючого пристрою, пошарове зсування та накопичення на стіл і подання на перегляд.

Перегляд може здійснюватися візуально, наприклад, на переглядових столах, обладнаних пристроєм для перевертання, та лампами денного світла. Відбракуванню підлягають матеріали для первинного пакування, що мають відхилення на зовнішній вигляд від вимог діючої нормативної документації.

Підготовлені матеріали для первинного пакування та закупорювальні матеріали мають бути використані відразу ж для пакування лікарських засобів. Термін їх зберігання не може перевищувати більше 48 год при умовах, що максимально захищають від повторного забруднення.

Стерилізовані матеріали для первинного пакування та закупорювальні матеріали, що надходять від виробника в герметичній упаковці, слід звільняти від упаковки і переглядати в умовах, що максимально знижують ризик контамінації мікроорганізмами та механічними частками [108].

Отже, підготовка пластикової плівки, виготовлена з полілактату, для використання у ролі первинного пакування складається з наступних етапів:

- ✓ звільнення від упаковки;
- ✓ попередній перегляд;
- ✓ відбракування (за необхідності).

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

6.1. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу

Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу, зображеного на апаратурній схемі, наведена в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу полілактату за культивування *E. coli* JW0885

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1, ФГ-2	Пристрій для забору повітря з вбудованим фільтром грубої очистки	1	<p>Пристрій для забору повітря Systemair TLP 200/5.0, Швеція.</p> <p>Основні технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Вбудований повітряний фільтр – G4; - Електропідключення - 220 V / 50 Hz; - Частота обертання - 2578 об/мин; - Ступінь захисту - IP44; - Маса - 40,5 кг [109].
К-3	Компресор	1	<p>Компресор серії DPR-D з прямим приводом. Переваги лінійки компресорів DALGAKIRAN:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ ефективний двигун клас ІЕ3 як стандарт (опціонально ІЕ4); ✓ можливість безперервної роботи при температурі навколишнього середовища до 46 °С; ✓ триступеневе відділення оливи від повітря; ✓ низький рівень шуму і мінімальна вібрація. <p>Всі моделі серії DPR D мають компактні габарити і функціональний дизайн з захисними кришками, що швидко знімаються, і простими у використанні контролерами, які забезпечують можливість оперативної заміни деталей і мінімізують час простою [110].</p>

					НУХТ БТЕК 02.02.15 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Черепанський В.В.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.				111	26
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

РОЗДІЛ 6. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу

Т-4, Т-45, Т-47	Теплообмінник-нагрівач	1	<p>Повітрянагрівач водяний НКВ 125-2, Україна.</p> <p>Водяний нагрівач припливного повітря Вентс НКВ 125-2 складається з корпусу, який виконаний з оцинкованої сталі і теплообмінник, з мідних трубок, поверхня теплообміну - з алюмінієвих пластин Для герметичного з'єднання з повітроводами нагрівачі забезпечені гумовими ущільнювачами. Нагрівачі випускаються в двох-або чотирирядною виконанні і призначені для експлуатації при максимальному робочому тиску 1,6 МПа (16 бар) і максимальній робочій температурі води + 100 ° С. На вихідному колекторі нагрівача передбачений патрубок для установки погрузного датчика вимірювання температури або захисту від обмороження калорифера [111].</p>
Р-5	Ресивер	1	<p>Ресивер Р 35.294.01. Їх виготовлення, монтаж, пуск в експлуатацію і експлуатація повинні здійснюватися відповідно до правил НПАОП 0,00-1.07 «Правила будови і безпечної експлуатації ємностей, що працюють під тиском».</p> <p>Повітря від компресорів, поступаючи в ресивери, розширюється і охолоджується. Завдяки великому обсягу стисненого повітря в ресивері, пульсація повітря, викликана роботою компресорів, згладжується.</p> <p>Ресивери виготовлені в повній відповідності з правилами будови і безпечної експлуатації посудин, що працюють під тиском, та технічних умов ТУ У 28.2-32866025-001-2007 на виготовлення [112].</p>
Т-6, Т-48	Теплообмінник-охолоджувач	1	<p>Охолоджувач повітря Salda AVA 200, Литва. Посадковий діаметр, мм - 200 Призначений для витрати повітря, м3 / год: 230-700.</p> <p>Круглий водяний охолоджувач Salda AVA використовується в системах вентиляції для надходження холодного повітря. Даний тип охолоджувачів виготовлений з мідних трубок і алюмінієвих пластин. Корпус виготовлений з якісної оцинкованої бляхи. В даному водяному охолоджувачі є система дренажу конденсату [113].</p>

ГФ-7	Головний фільтр очистки повітря	1	<p>Фільтр тонкої очистки ФЯК F9 592x490x600-8 класу F9.</p> <p>Основні технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Вид рамки – оцинкована; - Фільтруючий матеріал - поліестер+спанбонд; - Максимальна робоча температура: 60-70°C; - Ступінь очищення становить 90- 99 % ; - Кількість карманів – 8 шт.[114].
Д-8, Д-15, Д-19, Д-24, Д-28, Д-33, Д-37, Д-42	Дозатор об'ємно-ваговий (сипучі речовини)	8	<p>Дозатор VD1-V8 (Україна). Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Обсяг дозуючої речовини - 0,2-400 кг; - Довжина / Ширина / Висота, мм - 1100/1000/1800; - Електроживлення, В/Гц - 220/50; - Споживання електроенергії, кВт/год: 0.7; <p>Вага: 90 кг [115].</p>
М-9, М-16, М-20, М-25, М-29, М-34, М-38	Мірник	7	<p>Мірники виготовлені з нержавіючої сталі, мають шкалу, яка розташована у віконці по всій висоті виробу, а також, кожен мірник проходить державну метрологічну перевірку.</p> <p>Точність виробів, %: 0,02 - 0,5.</p> <p>Об'єми мірників – 2, 5, 10, 20, 50 та 100 л [116].</p>
РЗ-10, РЗ-21	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	2	<p>Реактор об'ємом 5 л фірми «Промвіт» (Україна). Корпус обладнаний верхньою якірною мішалкою з розвиненою поверхнею перемішування з плаваючими шкребками з тефлону і нижньою турбінної мішалкою. Для керованого нагріву продукту корпус реактора оснащений водяною сорочкою з електропідігрівом.</p> <p>Матеріали виготовлення всіх вузлів, що контактують з продуктом - сталь AISI 316L.</p> <p>Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Номінальний об'єм, л – 5,0; - Частота обертання мішалки, об/хв: 25-55; - Напруга в електромережі, В: 220; - Потужність приводу мішалки, Вт: 150; - Тип ущільнення мішалки: торцьове; - Вивантаження продукту через вентиль нижнього спуску санітарного виконання. - Габаритні розміри, мм: В = 400; L = 660; Н = 940; <p>Маса, кг: 65 [117].</p>

ЗП-12	Засівний пристрій	1	Збірник циліндричний із днищем з нижнім спуском. Об'єм – 1 л.
Ф-13, Ф-17, Ф-22, Ф-26, Ф-31, Ф-35, Ф-40, Ф-50	Індивідуальний фільтр стерильного повітря	8	Фільтр Д-23. Фільтрувальний матеріал – ФП (фільтр Петрянова), пропускна здатність – 3400 м3/год, ступінь очищення E=99,999 %. Виробник: «Вентиляторний завод «Укрвентсистеми» [118].
ФР-14	Ферментер (інокулятор)	1	Ферментер Biostat® C-DCU (Німеччина) з номінальним об'ємом 10 л. Технічні характеристики: <ul style="list-style-type: none"> - Ємність з нержавіючої сталі з торосферичним дном з нижнім перемішуванням; - Відношення розмірів, H:D: 2:1; - Має поздовжнє оглядове віконце; - Матеріал, що контактує з продуктом - нержавіюча сталь AISI 316L, EPDM, боросилікатне скло; зовнішній - нержавіюча сталь AISI 304; - Мішалка: 3-х лопатева сегментна; - Температура стерилізації до 130°C; - Має контролер приводу мішалки; - Швидкість перемішування 20-1500 об/хв [119].
РЗ-18	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор об'ємом 30 л фірми «Промвіт» (Україна). Технічні характеристики: <ul style="list-style-type: none"> - Матеріал обшивки і зовнішніх панелей: сталь AISI 304; - Робочий тиск в корпусі, бар: атмосферний, корпус герметичний; - Температура в сорочці, °C: від +5 до +95; - Габаритні розміри, мм, не більше: В = 700; L = 1200; Н = 1500; - Тип мішалки: якірна не симетрична мешалка. На валу мішалки розташовані додаткові лопаті з розворотом робочих площин під 45°, що забезпечують ефективне перемішування; - Місце установки приводу мішалки: на кришці реактора, по центру; - Швидкість обертання мішалки: 35 - 80 об/хв, плавно-регульована, нереверсивна. - Потужність двигуна приводу, кВт, не більше: 0,75. [120].

ФР-23	Ферментер (інокулятор)	1	<p>Ферментер Biostat® С-DCU (Німеччина) з номінальним об'ємом 100 л. Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ємність з нержавіючої сталі з торосферичним дном з нижнім перемішуванням; - Відношення розмірів, Н:Д: 3:1; - Має поздовжнє оглядове віконце; - Матеріал, що контактує з продуктом - нержавіюча сталь AISI 316L, EPDM, боросилікатне скло; зовнішній - нержавіюча сталь AISI 304; - Мішалка: 6-ти лопатева сегментна; - Температура стерилізації до 130°C; - Має контролер приводу мішалки; - Швидкість перемішування 20-700 об/хв [119]. -
РЗ-27	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	<p>Реактор об'ємом 160 л фірми «Діоніс» (Україна), оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Номінальний об'єм корпусу, л: 160; - Частота обертання мішалок, об / хв: плавно регульована від 0 до 100. - Матеріали виготовлення корпусу, кришки, мішалки: н / ж сталь 08X18H10T, (AISI 321) - Тип ущільнення мішалки: торцьове; - Вивантаження продукту через вентиль нижнього спуску санітарного виконання. - Габаритні розміри, мм: L x B x H: 740x600x1220 [121]. -
РЗ-30	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	<p>Реактор об'ємом 20 л фірми «Промвіт» (Україна). Матеріали виготовлення всіх вузлів, що контактують з продуктом - сталь AISI 316L. Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Номінальний об'єм, л – 20,0; - Частота обертання мішалки, об/хв: 25-55; - Напруга в електромережі, В: 220; - Потужність приводу мішалки, Вт: 150; - Тип ущільнення мішалки: торцьове [122].

ФР-32	Ферментер (інокулятор)	1	<p>Ферментер Biorus 1000 л (Росія). Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Номінальний об'єм, л: 1000; - Робочий об'єм, л: 700; - Сорочка з ізоляцією для термостатування і подачі пари, ферментер стерилізується на місці; - Внутрішня поверхня шорсткістю не більше 0,8 мкм; - Апарат виготовлений з нержавіючої сталі 304. - Вал з трьома мішалками; - Подвійне механічне ущільнення з шаровим затвором; - 4 відбійника, 10% від внутрішнього діаметра ємкості; - Швидкість перемішування 50-300 об / хв; - Відношення розмірів, H:D: 3:1; - Датчики: - рН датчик, Температурний датчик; - Система циркуляції [123].
РЗ-36	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	<p>Реактор об'ємом 630 л фірми «Діоніс» (Україна). Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Номінальний об'єм корпусу, л: 630; - Робочий об'єм корпусу, л: 440; - Частота обертання мішалок, об / хв: плавно регульована від 0 до 80. - Встановлена потужність, при U = 380 В, кВт - Електродвигуна приводу: 3,5; - Матеріали виготовлення корпусу, кришки, мішалки: н / ж сталь 08X18H10T, (AISI 321) - Діаметр, мм: d = 800. <p>Маса, кг 930,0 [124].</p>
РЗ-39	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	<p>Реактор-змішувач об'ємом 100 л фірми «Промвіт» (Україна).</p> <p>Корпус реактора, являє собою вертикальну циліндричну ємність з псевдоеліптичним днищем і кришкою. Поточна температура в корпусі реактора, виводяться на дисплей терморегулятора в цифровому вигляді.</p> <p>На кришці реактора розташовані: привід мішалки, люк, ліхтар з підсвічуванням, штуцера під «клемп» різних прохідних перетинів.</p> <p>Мішалка має регулятор для плавної зміни швидкості обертів обертання мішалки за допомогою частотного інвертора. Швидкість перемішування 50</p>

			<p>об/хв.</p> <p>Ущільнення мішалки - торцеве.</p> <p>Проконтролювати обсяг завантаженого компонента можна за допомогою цифрового індикатора «Обсяг продукту» з дискретністю 100 мл, встановленого на пульті управління, який підключений до «Перетворювач тиску UT-11» розташованому в днищі реактора (початково перетворювач тиску UT-11 запрограмований на вимір обсягу води) . Датчик манометричного типу в асептичному виконанні і прилад для візуалізації даних (контролер) відомої німецької фірми WIKA [125].</p>
ФР-41	Ферментер (інокулятор)	1	<p>Ферментер Biorus 8 м³ (Росія). Технічні характеристики:</p> <p>Робочий об'єм – 5,6 м³.</p> <p>Повний об'єм – 8 м³.</p> <p>Нержавіюча сталь AISI 316 для всіх поверхонь, що контактують з продуктом, AISI 304 - для поверхонь, що не контактують з продуктом.</p> <p>Співвідношення діаметра і висоти: 1: 2-2,2</p> <p>Розрахунковий тиск в ємності: 0,3 МПа, розрахунковий тиск в сорочці: 0,35 МПа.</p> <p>Торосферичне дно, без застійних зон.</p> <p>Діапазон робочих температур - від кімнатної температури + 8 ° С до + 60 ° С. Максимальна робоча температура - до 135 ° С.</p> <p>Підсвічування внутрішнього обсягу ферментера [126].</p>
РЗ-43	Реактор-змішувач для приготування поживного середовища	1	<p>Реактор об'ємом 400 л фірми «Діоніс» (Україна). Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Номінальний об'єм корпусу, л: 400; - Робочий об'єм корпусу, л: 320; - Частота обертання мішалок, об / хв: плавно регульована від 0 до 80. - Встановлена потужність, при U = 380 В, кВт - Електродвигуна приводу: 3,5; - Матеріали виготовлення корпусу, кришки, мішалки: н / ж сталь 08X18H10T, (AISI 321) - Діаметр, мм: d = 800. <p>Маса, кг 630,0 [124].</p>

Н-44, Н-49	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий DAB KPF (Україна). Потужність двигуна – 0,370 кВт; Продуктивність – 0,06 м ³ /год; Висота подачі – 25 м [127].
ФР-51	Ферментер	1	<p>Виконаний з нержавіючої сталі - марки AISI 316L для всіх поверхонь, що контактують з продуктом, AISI 304 - для тих поверхонь, що не контактують з продуктом (сорочка, зовнішня оболонка та інше). Ферментер обладнаний необхідним набором портів і роз'ємів для підключення датчиків і обв'язки біореактора.</p> <p>Відношення діаметра до висоти: 1:2,5. Коефіцієнт заповнення: 70%.</p> <p>Розрахунковий тиск: 0,3 МПа, розрахунковий тиск сорочки: 0,3 МПа. Ефективність теплообміну і розподілу температури усередині підвищена за рахунок поліпшеної системи поділу каналів.</p> <p>Донна частина ферментера - торосферична, без застійних зон. Контроль і підтримка заданої температури під час ферментації здійснюється за рахунок подачі води в сорочку, для охолодження, або активацією нагрівального елемента, для нагріву, для обсягів не більше 300 л. Якщо обсяг ферментера більше 300 літрів, то нагрів здійснюється шляхом циркуляції води через теплообмінник і подачею пари в нього. Використовується непрямий нагрів. Контроль температури в циркуляційному контурі здійснюється за допомогою вбудованого терморегулятора (робочий температурний діапазон - кімнатна температура + 8 °С, до +60 °С).</p> <p>Для контролю за рівнем рідини використовується оглядове вікно з великим кутом огляду, є підсвічування.</p> <p>Контроль і управління параметрами в стандартній комплектації - швидкість мішалки (20 - 1000 об / хв), температура, рН, рО₂, датчик піни, подача повітря на вентиляцію - через ротаметр, опційно - автоматичний контроль, через витратомір [128].</p>

6.2. Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу

Технологічна схема біосинтезу полілактату включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і власне біосинтез).

Технологічну схему біосинтезу наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря.

ДР 1.1. Забір повітря

За використання пристрою для забору повітря (ПЗ-1) відбувається процес забору атмосферного повітря, який здійснюється на висоті 30 м від поверхні землі. Даний пристрій додатково закривається ґратами, які виготовлені із заліза. Далі повітря через повітрязабірну шахту за участі вентилятора потрапляє до фільтру грубого очищення (ФГ-2).

ДР 1.2. Попереднє грубе очищення від пилу і механічних часток

За використання набивних фільтрів (ФГ-2), які складаються з волокнистих матеріалів, відбувається процес попереднього грубого очищення повітря відбувається. Частинки, які містяться у повітрі, рухаючись з певною швидкістю затримуються на поверхні волокна інерційним механізмом осадження. Ступінь очищення – 80 %.

На даному етапі фільтри попереднього очищення знижуючи кількість контамінантів, які могли б перейти на наступний етап очищення, водночас захищають компресори від забруднень.

ДР 1.3. Стиснення повітря

За використання поршневого компресора (К-3) здійснюється процес стиснення повітря до 0,35 МПа, що в свою чергу призводить до підвищення його температури до 120–250 °С і збільшення вмісту вологи.

Робота даного компресора заснована на дії поршня, який рухається в циліндрі, а також шатуна і колінчастого валу. Робота таких компресорів аналогічна роботі ручних велосипедних насосів, тому що поршень, що рухається уздовж циліндра, викликає всмоктування повітря, а потім тисне на нього, тим самим зменшуючи його обсяг і збільшуючи тиск. Компресорне

обладнання такого типу користуються репутацією довговічних і безвідмовних. Воно легко справляється навіть з великими обсягами стисненого повітря і не потребує складного технічного обслуговування.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи

З метою відведення надлишкової вологи стиснене повітря «переохолоджують» до температури 25 °С за використання охолодженої води в охолоджувачі повітря (Т-4).

Далі охолоджене повітря рухається до ресивера (Р-5). Повітряні ресивери (інша назва - повітрязбірники) представляють собою металеві посудини, всередині яких знаходиться стиснене повітря.

Вони оснащені запобіжним клапаном, призначеним для скидання газу при скачках тиску в мережі; вхідними та вихідними патрубками для підключення в мережу і проходження газу з ресивера; патрубком для зливу конденсату.

Необхідність в установці ресивера обумовлена тим, що компресор в мережу стисненого повітря видає газ порціями, це може бути причиною поломки або зниження якості продукції підприємства, т. К. Практично всі види обладнання дуже чутливі до пульсацій стисненого повітря. Ресивери призначені для придушення цих пульсацій при роботі компресорів. При згладжуванні коливань тиску стисненого повітря робота компресора стає більш рівномірною, пусків двигуна стає менше. За час перебування повітря в ресивері його температура падає, утворюється конденсат, який видалається з системи ($W = 60 \%$).

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Для уникнення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів повітря підігрівають до температури 30°С. Для даного процесу використовується теплообмінник (Т-6). Принцип дії водяного рекуператора повітря полягає в перенесенні теплової енергії з окремо розташованого витяжного теплообмінника до припливного за допомогою води, антифризу, чи інших теплоносіїв.

ДР 1.6. Очищення на головному фільтрі

За використання головного фільтра (ГФ-7) відбувається очищення повітря від пилу та мікроорганізмів (розмір частинок більше 1 мкм). Головний фільтр представляє собою циліндричну ємність із сферичним дном та кришкою. В середині фільтру знаходяться дві решітки, між якими розміщують фільтруючий матеріал. Заміну фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. У разі забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Видалення контамінантів (розмір частинок більше 0,2 мкм) за допомогою мембрани засновано на ситовому ефекті. В якості індивідуального фільтруючого матеріалу використовується скловата типу ЦФД з діаметром волокна 2,5 – 3 мкм та діаметром пор 0,2 мкм. Пористість мембран досягає 80 %. Термостійкість скловати становить 400°C. Ступінь очищення становить $E = 99,999 \%$.

ДР 2. Приготування та стерилізація допоміжних розчинів.

ДР 2.1. Приготування та стерилізація концентрованого розчину пантотенату кальцію.

На технічних вагах у попередньо відтарованій тарі зважують 10 г пантотенату кальцію. Наважки вносять в колбу об'ємом 2 л, додають 990 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131°C упродовж 40 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 540 мл поживного середовища. Джерелом вуглецю в середовищі є глюкоза, джерелом азоту – дріжджовий екстракт. Вміст компонентів для приготування 540 мл середовища наведено у табл. 6.2.

**Склад композицій для стерилізації поживного середовища для
одержання посівного матеріалу в колбах на качалках**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму 600 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Ксилоза	20	12	А	451
Триптон	10	6		
Дріжджовий екстракт	5	3		
Вода		430		
Хлорид натрію	5	3	Б	89
Пантотенат кальцію	0,001	0,0006		
Вода		86		
Разом:		540		540

ДР 6.1.1. Приготування і стерилізація композиції А.

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 12 г ксилози, 3 г дріжджового екстракт та 6 г триптону. Наважки вносять в колбу об'ємом 1 л, додають 430 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112⁰С упродовж 30хв.

ДР 6.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 3 г хлориду натрію, а також на аналітичних вагах зважують 0,0006 г пантотенату кальцію. Наважки переносять у колбу об'ємом 250 мл та додають 86 мл дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131⁰С упродовж 40 хв.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті 10 л.

Для вирощування інокуляту на даній стадії необхідно 6 л поживного середовища (враховуючи, що 10% (0,54 л) від об'єму середовища припадає на посівний матеріал). Також враховуємо 0,43 л конденсату, що утворюється під час стерилізації середовища в посівному апараті. Вміст компонентів для приготування 5,4 л поживного середовища наведено у табл. 6.3.

Таблиця 6.3

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у посівному апараті об'ємом 10 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму 6000 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Ксилоза	20	120	А	1310
Триптон	10	60		
Дріжджовий екстракт	5	30		
Вода		1100		
Хлорид натрію	5	30	Б	3660
Пантотенат кальцію	0,001	0,006		
Вода		3630		
Конденсат		430		430
Разом:		5400		5400

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 120 г ксилози, 30 г дріжджового екстракту, та 60 г триптону. Наважки поміщають у колбу об'ємом 3 л, додають 1100 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30хв. Потім вміст колб переносять в посівний апарат об'ємом 10 л (ФР-14).

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-8) у реактор-змішувач об'ємом 5 л (РЗ-10) додають 30 г хлориду натрію. Далі при постійному перемішуванні (50-80 об/хв) за температури 40 °С за допомогою мірника (М-9) додають 3,63 л питної води. Після розчинення солі композиції Б подаються в посівний апарат об'ємом 10 л (ФР-14). Стерилізують композицію при 131°С упродовж 40 хв та тиску 0,15 МПа. Після охолодження композиції окремо вносять 6 мл стерильного розчину пантотенату кальцію (від ДР 2.1).

ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті 100 л.

Для вирощування інокуляту на даній стадії необхідно 56 л поживного середовища, враховуючи конденсат, що утворюється під час стерилізації середовища в посівному апараті (5,6 л). Також додатково 6 л середовища припадає на посівний матеріал. Вміст компонентів для приготування 56 л поживного середовища наведено у табл. 6.4.

Таблиця 6.4

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у посівному апараті об'ємом 100 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму 62 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Ксилоза	20	1,2	А	19,7
Триптон	10	0,6		
Дріжджовий екстракт	5	0,3		
Вода		17,6		
Конденсат		1,97		1,97
Хлорид натрію	5	0,3	Б	30,7
Пантотенат кальцію	0,001	0,056 г		
Вода		30,4		
Конденсат		3,6		3,6
Разом:		56		56

ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-15) у реактор-змішувач об'ємом 30 л (РЗ-18) додають 1200 г глюкози, 300 г дріжджового екстракту та 600 г триптоні. Далі при постійному перемішуванні (50-80 об/хв) за допомогою мірника (М-16) додають 17,6 л питної води. Стерилізують в реакторі-змішувачі при температурі 112⁰С упродовж 30 хв та тиску 0.05 МПа. Після цього подаються в посівний апарат об'ємом 100 л (ФР-23).

ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-19) у реактор-змішувач об'ємом 5 л (РЗ-21) додають 300 г хлориду натрію. Далі при постійному перемішуванні (50-80 об/хв) за допомогою мірника (М-20) додають 2,7 л питної води. Після розчинення солі композиції Б подаються в посівний апарат об'ємом 100 л (ФР-23) та додатково вноситься 27 л питної води. Стерилізують композицію при 131⁰С упродовж 40 хв та тиску 0.15 МПа. Після охолодження композиції окремо вносять 62 мл стерильного 1%-го розчину пантотенату кальцію (від ДР 2.1).

ДР 3.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м³.

Для вирощування інокуляту на даній стадії необхідно 611 л поживного середовища, враховуючи конденсат, що утворюється під час стерилізації середовища в посівному апараті (61,1 л). Також додатково 56 л середовища припадає на посівний матеріал. Вміст компонентів для приготування 555 л поживного середовища наведено у табл. 6.5.

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у посівному апараті об'ємом 1 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму 611 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Ксилоза	20	12,22	А	118
Триптон	10	6,11		
Дріжджовий екстракт	5	3,05		
Вода		96,6		
Конденсат		11,8		11,8
Хлорид натрію	5	3,05	Б	376
Пантотенат кальцію	0,001	0,611 г		
Вода		372,9		
Конденсат		49		
Разом:		555		555

ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-24) у реактор-змішувач об'ємом 160 л (РЗ-27) додають 12,22 кг глюкози, 3,05 кг дріжджового екстракту та 6,11 кг триптону. Далі при постійному перемішуванні (50-80 об/хв) за допомогою мірника (М-25) додають 96,6 л питної води. Стерилізують в реакторі-змішувачі при температурі 112⁰С упродовж 30 хв та тиску 0,05 МПа. Після цього подаються в посівний апарат об'ємом 1 м³ (ФР-32).

ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-28) у реактор-змішувач об'ємом 20 л (РЗ-30) додають 3,05 кг хлориду натрію. Далі при постійному перемішуванні (50-80 об/хв) за допомогою мірника (М-29) додають 6,1 л питної води. Після розчинення солі композиції Б подаються в ферментер об'ємом 1 м³ (ФР-32) та додатково вноситься 373 л питної води.

Стерилізують композицію при 131⁰С упродовж 40 хв та тиску 0,15 МПа. Після охолодження композиції окремо вносять 611 мл стерильного 1%-го розчину пантотенату кальцію (від ДР 2.1).

ДР 3.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 8 м³.

Для вирощування інокуляту на даній стадії необхідно 5,55 м³ поживного середовища, враховуючи конденсат, що утворюється під час стерилізації середовища в посівному апараті (555 л). Також додатково 550 л середовища припадає на посівний матеріал. Вміст компонентів для приготування 5 м³ поживного середовища наведено у табл. 6.6.

Таблиця 6.6

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у посівному апараті об'ємом 8 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму 5,55 м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Ксилоза	20	111	А	384
Триптон	10	55,5		
Дріжджовий екстракт	5	27,75		
Вода		190		
Конденсат		38,4		38,4
Хлорид натрію	5	27,75	Б	4060
Пантотенат кальцію	0,001	5,55 г		
Вода		4026,7		
Конденсат		517		517
Разом:		5000		5000

ДР 3.5.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-33) у реактор-змішувач об'ємом 630 л (РЗ-36) додають 111 кг глюкози, 27,75 кг дріжджового екстракту та 55,5 кг триптону, а також окремо на технічних вагах зважують

5,55 г пантотенату кальцію. Далі при постійному перемішуванні (50-80 об/хв) за допомогою мірника (М-34) додають 190 л питної води. Стерилізують в реакторі-змішувачі при температурі 112⁰С упродовж 30 хв та тиску 0,05 МПа. Після цього подаються в посівний апарат об'ємом 8 м³ (ФР-41).

ДР 3.5.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-37) у реактор-змішувач об'ємом 100 л (РЗ-39) додають 27,75 кг хлориду натрію та 5,55 г пантотенату кальцію. Далі при постійному перемішуванні (50-80 об/хв) за допомогою мірника (М-38) додають 42 л питної води. Після розчинення солі композиції Б подаються в ферментер об'ємом 8 м³ (ФР-41) та додатково вноситься 4026,7 л питної води. Стерилізують композицію при 131⁰С упродовж 40 хв та тиску 0,15 МПа.

ДР 3.6. Приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу в ферментері об'ємом 80 м³.

Для вирощування інокуляту на даній стадії необхідно 55,5 м³ поживного середовища, враховуючи конденсат, що утворюється під час стерилізації середовища в посівному апараті (5,55 м³). Також додатково 5,5 м³ середовища припадає на посівний матеріал. Вміст компонентів для приготування 5 м³ поживного середовища наведено у табл. 6.7.

Таблиця 6.7

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у ферментері об'ємом 80 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму 55,5 м³ середовища, т (м³)	Композиція	Об'єм композиції, V, м³
Ксилоза	20	1,11	А	44,95
Триптон	10	0,555		
Дріжджовий екстракт	5	0,277		
Хлорид натрію	5	0,277		

Пантотенат кальцію	0,001	55,5 г		
Вода		42,7		
Конденсат		5,55		5,55
Разом:		50,5		50,5

ДР 3.6.1. Приготування композиції А

На об'ємно-ваговому дозаторі (Д-42) зважують 1,11 т ксилози, 555 кг триптону, 277 кг дріжджового екстракту, 277 кг хлориду натрію і окремо на технічних вагах зважують 55,5 г пантотенату кальцію. Наважки поміщають у реактор-змішувач (РЗ-43) перед УБС. Додають 44,95 м³ води. Перемішування відбувається за допомогою мішалки, якою обладнаний реактор.

ДР 3.6.2. Нагрів поживного середовища.

Поживне середовище із реактора-змішувача насом Н-44 подається на стерилізаційну колонку К-46, де стерилізується „гострою” парою при Р=5атм і температурі 131±2⁰С. Температура стерилізації підтримується автоматично.

ДР 3.6.3. Витримування поживного середовища.

Підігріте середовище безперервним потоком надходить у витримувач Т-45, де витримується 8-10 хв. Проходження середовища через витримувач забезпечує його повну стерилізацію.

ДР 3.6.4. Охолодження поживного середовища.

Після витримувача середовище охолоджують в теплообміннику Т-48. Середовище охолоджується до температури культивування 30 ± 1 ⁰С, після цього стерильне та охолоджене середовище подається по трубопроводу за допомогою відцентрового насосу (Н-49) у ферментер (ФР-51). Час стерилізації становить 2 години.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *E. coli* JW0885 зберігають у пробірках зі скошеним агаризованим середовищем LB ампіцилін-100 (містить 100 мкг/мл

ампіциліну). Пересіви здійснюють кожні 2–3 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять у суворо асептичних умовах.

ТП 4.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з середовищем LB ампіцилін-100, розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі із середовищем LB ампіцилін-100 і вирощують при температурі 30 °С упродовж 24 год.

ТП 4.3. Вирощування посівного матеріалу в пробірках.

Отримані ізолювані колонії (від ТП 4.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним середовищем LB ампіцилін-100 (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 24 год. Засіяні пробірки ставлять у термостат з температурою 30 °С та витримують впродовж 24 год. Контроль за чистотою культури здійснюють мікроскопіюванням.

ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках.

У колбу об'ємом 1 л із 451 мл розчину композиції А (від ДР 3.1.1) в асептичних умовах вносять 89 мл розчину композиції Б (від ДР 3.1.2) та 0,06 г ампіциліну. Перемішують і розливають по 270 мл в дві стерильні качалочні колби об'ємом 500 мл.

У пробірку з робочою культурою *E. coli* JW0885, вирощеною на середовищі LB ампіцилін-100, вносять 5 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), стерильною піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках проводять за наступних умов: температура – 30 °С, частота обертання – 120 об/хв, час вирощування – 24 год.

Після вирощування культуральну рідину з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 2 л.

ТП 4.5. Вирощування культури у інокуляторі об'ємом 10 л.

В інокулятор із 3,66 л простерилізованої та охолодженої композиції Б (від ДР 3.2.2) асептично передають 1,31 л охолодженого до кімнатної температури стерильного розчину композиції А (від ДР 3.2.1) та вносять 0,6 г ампіциліну. Посівний матеріал із засівної колби (від ДР 4.4), дотримуючись правил асептики, переносять в інокулятор.

Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 120 об/хв, час вирощування – 24 год., витрати повітря – 1 л/л·хв, корекцію рівня рН впродовж культивування не проводять, під час вирощування у інокуляторі стерильним стисненим повітрям підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа.

Кожні 8 год проводять мікробіологічний контроль культуральної рідини на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.6. Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 100 л.

Охолоджений до кімнатної температури стерильний розчин композиції А від ДР 3.3.1 асептично перекачують у посівний апарат об'ємом 100 л, у якому міститься стерильний розчин солей тієї ж температури від ДР 3.3.2 та вносять 6,2 г ампіциліну. Засів проводиться перетискуванням стерильним стисненим повітрям посівного матеріалу з інокулятора (від ТП 4.5) через трубу перетискання до посівного апарату.

Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 120 об/хв, час вирощування – 24 год., витрати повітря – 1 л/л·хв, корекцію рівня рН впродовж культивування не проводять, під час вирощування у інокуляторі стерильним стисненим повітрям підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа.

Кожні 8 год проводять мікробіологічний контроль культуральної рідини на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.7. Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 1 м³.

Охолоджений до кімнатної температури стерильний розчин композиції А від ДР 3.4.1 асептично перекачують у посівний апарат об'ємом 1 м³, у якому міститься стерильний розчин солей тієї ж температури від ДР 3.4.2 та вносять 61,1 г ампіциліну. Засів проводиться перетискуванням стерильним стисненим повітрям посівного матеріалу з інокулятора (від ТП 4.6) через трубу перетискання до посівного апарату.

Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 120 об/хв, час вирощування – 24 год., витрати повітря – 1 л/л·хв, корекцію рівня рН впродовж культивування не проводять, під час вирощування у інокуляторі стерильним стисненим повітрям підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа.

Кожні 8 год проводять мікробіологічний контроль культуральної рідини на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.8. Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 8 м³.

Охолоджений до кімнатної температури стерильний розчин композиції А від ДР 3.5.1 асептично перекачують у посівний апарат об'ємом 8 м³, у якому міститься стерильний розчин солей тієї ж температури від ДР 3.5.2 та вносять 550 г ампіциліну. Засів проводиться перетискуванням стерильним стисненим повітрям посівного матеріалу з інокулятора (від ТП 4.7) через трубу перетискання до посівного апарату.

Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 120 об/хв, час вирощування – 24 год., витрати повітря – 1 л/л·хв, корекцію рівня рН впродовж культивування не проводять, під час вирощування у інокуляторі стерильним стисненим повітрям підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа.

Кожні 8 год проводять мікробіологічний контроль культуральної рідини на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5. Виробничий біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 80 м³.

Охолоджений до кімнатної температури стерильний розчин композиції А від ДР 3.6.1 асептично перекачують у ферментер об'ємом 80 м³ та вносять 8 кг ампіциліну.

Засів проводиться перетискуванням стерильним стисненим повітрям посівного матеріалу з посівного апарату (від ТП 4.8) через трубу перетискання до ферментера.

Процес культивування ведуть за наступних умов: температура — 30 °С, швидкість перемішування – 120 об/хв, час вирощування – 48 год., витрати повітря – 1 л/л·хв, корекцію рівня рН впродовж культивування не проводять, під час вирощування у інокуляторі стерильним стисненим повітрям підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа.

Культивування ведуть до досягнення концентрації полілактату 7,3 г/л.

Отриману культуральну рідину передають далі на отримання цільового продукту.

6.3. Контроль ділянки біосинтезу

Упродовж етапів культивування періодично (кожні 8 год) з ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та контролю наступних показників: концентрації цільового продукту (полілактату) та клітин *E. coli* JW0885, а також визначення концентрації джерела вуглецю і азоту в культуральній рідині.

6.3.1. Мікробіологічний контроль

Контроль мікробіологічний (мікроскопіювання). Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою. На знежирене предметне скло бактеріологічною петлею наносять краплю бульйонної культури досліджуваного мікроорганізму чи суспензії бактеріальних клітин у фізіологічному розчині чи водопровідній воді. Краплю накривають чистим знежиреним накривним склом і при необхідності запаюють парафіном, щоб запобігти висиханню препарату. Накривне скло треба накладати обережно, щоб у препараті не утворилися бульбашки повітря. Потім на накривне скло

за допомогою скляної палички наносять 1-2 краплини імерсійного масла та мікроскопіюють (об'єктив x90) [129].

Під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Escherichia coli*. Клітини даного мікроорганізму мають вигляд коротких паличок заокругленими кінцями, поліморфні (можуть мати вигляд кокобактерій або нитки) (рис. 6.1).

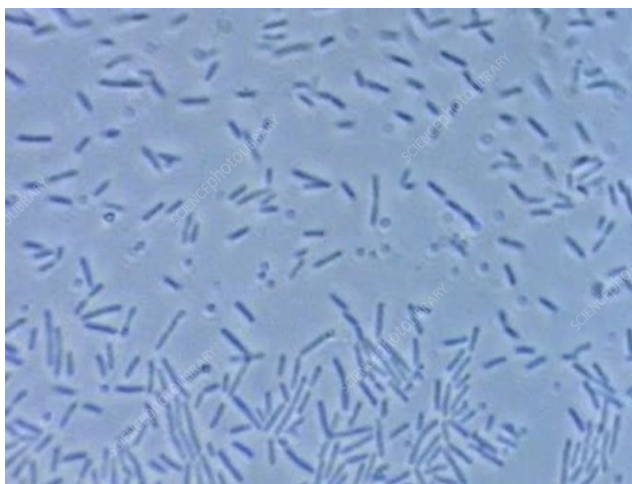


Рис. 6.1. Клітини *E. coli* під мікроскопом [130].

6.3.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

6.3.2.1. Концентрація цільового продукту (полілактату)

Концентрацію цільового продукту, а саме полілактату, визначають за допомогою газової хроматографії.

Методика. Підготовка зразка: Відібрану під час процесу культивування культуральну рідину (об'єм проби 100 мл) центрифугують при 4000 об/хв і температурі 4°C протягом 10 хв. Після центрифугування супернатант відкидають та знешкоджують. Далі отримані клітини бактерій ресуспендують у дистильованій воді та центрифугують, як на попередньому етапі, а супернатант відкидають та знешкоджують. Цей крок повторюють ще раз для повного видалення залишків середовища (процес промивання клітин). Далі промиті клітини бактерій сушать при температурі 70°C.

Проведення аналізу (підготовка зразка для газової хроматографії): Для аналізу відбирають близько 30–100 мг висушеної біомаси і змішують її з 1 мл розчину, що містить 15% (об/об) сірчаної кислоти та 0,9% (мас/об) бензойної

кислоти в метанолі (розчин РНА), та 2 мл хлороформу. Суміш інкубують при 95°C протягом ночі для реакції метанолізу.

Далі до суміші додають 1 мл дистильованої води і ретельно перемішують. Суміш залишають на 3 години до завершення фазового поділу. Органічну фазу на дні збирають та аналізують за використання газового хроматографа [131].



Рис. 6.2. Процедура підготовки зразка для газової хроматографії.

6.3.3. Визначення концентрації клітин бактерій

Для визначення концентрації клітин в культуральній рідині проводять вимірювання оптичної густини культуральної рідини при 600 нм (OD_{600}) використовуючи спектрофотометр Ultrospec 3000 (Amersham Biosciences, Упсала, Швеція). Концентрацію клітин, визначену як маса сухих клітин (DCW) на літр, розраховують за використання заздалегідь визначеного коефіцієнту перерахунку між OD_{600} та DCW ($1 OD_{600} = 0,373 \text{ г DCW/l}$) [133].

6.3.4. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення концентрації джерела вуглецю. Для культивування *E. coli* JW0885 використовується поживне середовище джерелом вуглецю в якому є ксилоза. Концентрацію цукрів (ксилози) у супернатанті визначають за допомогою системи ВЕРХ, оснащеної детектором показника заломлення.

Перед початком проведення аналізу супернатант культуральної рідини пропускають через целюлозно-ацетатний фільтр з розміром пор 0,2-мкм.

Потім здійснюють аналіз за допомогою ВЕРХ (Jasco, Японія), обладнаної колоною Aminex HPX-87H (Bio-Rad) та детектором RI. Зразки елюювали в ізократичному режимі з використанням 0,014 N H₂SO₄ як рухомої фази [134].

Визначення концентрації джерела азоту. Для культивування *E. coli* JW0885 використовується поживне середовище LB, основним джерелом азоту в якому є дріжджовий екстракт.

Вміст азоту в дріжджовому екстракті, і загального азоту в культуральній рідині, визначається за допомогою автоматичного обладнання Kjeltac™ 1030 або 2400 [135, 136]. Дане обладнання працює за принципом методу К'ельдаля. Дане обладнання використовується для складних зразків і для спеціальних аналізів з низькою концентрацією нітрогену.

Суть методу К'ельдаля полягає у тому, що у процесі визначення відбувається мінералізація випробуваного зразка під впливом концентрованої сірчаної кислоти при нагріванні в присутності каталізаторів. В якості каталізаторів можливе використання суміші калію сульфату. При цьому азот перетворюється в амонію сульфат. При додаванні натрію гідроксиду виділяється аміак, який переганяють з паром в приймач, що містить кислоту для його поглинання: сірчану або хлористоводородную. Далі надлишок кислоти одтитровують розчином натрію гідроксиду. За результатами титрування розраховують вміст азоту [137]. Всі вище описані операції автоматично проводяться на обладнанні Kjeltac™ 1030 та 2400.

Для того, щоб розпочати дослідження достатньо помістити точно відміряні 10 мл культуральної рідини, яка попередньо була відібрана з ферментера та за допомогою центрифугування звільнена від клітин бактерій, в робочий циліндр аналізатора. Після встановлення циліндра, аналізатор автоматично розпочинає визначення вмісту азоту. Вимірювання здійснюється впродовж близько 30 хв, після чого результати виводяться на дисплей обладнання [138].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ПОЛІЛАКТАТУ

7.1. Специфікація обладнання ділянки виділення та очищення субстанції

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена в табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Специфікація ділянки допоміжних робіт, виділення та очищення полілактату

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Д-1	Дозатор об'ємно-ваговий (сипучі речовини)	1	Дозатор VD1-V8 (Україна). Технічні характеристики: - Обсяг дозуючої речовини - 0,2-40 кг; - Довжина / Ширина / Висота, мм - 1100/1000/1800; - Електроживлення, В/Гц - 220/50; - Споживання електроенергії, кВт/год: 0.7; - Вага: 90 кг [139].
Ф-2	Індивідуальний фільтр стерильного повітря	1	Фільтр Д-23. Фільтрувальний матеріал – ФП (фільтр Петрянова), пропускна здатність – 3400 м ³ /год, ступінь очищення E=99,999 %. Виробник: «Вентиляторний завод «Укрвентсистеми» [140].
РЗ-3	Реактор-змішувач для стерилізації та приготування розчину додецилсульфат у натрію	1	Реактор об'ємом 2 м ³ фірми «Промвіт» (Україна). Корпус реактора, являє собою вертикальну циліндричну ємність з псевдоеліптичним днищем і кришкою. Поточна температура в корпусі реактора, виводяться на дисплей терморегулятора в цифровому вигляді. На кришці реактора розташовані: привід мішалки, люк, ліхтар з підсвічуванням, штуцера під «клемп» різних прохідних перетинів. Мішалка має регулятор для плавної зміни швидкості обертів обертання мішалки за допомогою частотного інвертора. Швидкість перемішування 50 об/хв. Ущільнення мішалки - торцеве[141].

НУХТ БТЕК 02.02.15 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	
Розроб.		Черепанський В.В.			
Перевір.		Грегірчак Н.М.			
Консультант					
Н. Контр.					
Затверд.		Стабніков В.П.			
РОЗДІЛ 7. Опис технологічного процесу виділення та очищення субстанції полілактату					
			Літ.	Арк.	Акрушів
				137	12
Кафедра БТМ					

Д-4	Дозатор об'ємно-ваговий (рідини)	1	<p>Електронний дозатор Serv_W21 (Україна) (дозатор-змішувач) проточного типу призначений для автоматичного дозування рідин без механічних включень.</p> <p>Технічні характеристики дозатора:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Обсяг дозуючої рідини, л: 0,1 до 999,9; - Дискретність встановлення дози, л: 0,1 або 1; - Відносна похибка дозування, %: $\pm 1,5$; - Температура рідини на вході дозатора, °C: від 1 до 80; - Напруга живлення частотою 50 Гц, В: $220 \pm 10\%$; - Споживана потужність, ВА, не більше: 30 [142].
З-5	Збірник для культуральної рідини	1	<p>Збірник об'ємом 1 м³ фірми «Промвіт» (Україна).</p> <p>Корпус реактора, являє собою вертикальну циліндричну ємність з псевдоеліптичним днищем і кришкою. Поточна температура в корпусі реактора, виводяться на дисплей терморегулятора в цифровому вигляді. На кришці реактора розташовані: привід мішалки, люк, ліхтар з підсвічуванням, штуцера під «клемп» різних прохідних перетинів. Мішалка має регулятор для плавної зміни швидкості обертів обертання мішалки за допомогою частотного інвертора. Швидкість перемішування 50 об/хв.</p> <p>Ущільнення мішалки - торцеве.</p> <p>Проконтролювати обсяг завантаженого компонента можна за допомогою цифрового індикатора «Обсяг продукту» з дискретністю 100 мл, встановленого на пульті управління, який підключений до «Перетворювач тиску UT-11» розташованому в днищі реактора [141].</p>
ПН-6	Перистальтичний насос	1	<p>Перистальтичні насоси високого тиску серії FPSH - це промислова серія насосів, розрахована на цілодобову роботу. При використанні цих насосів для горизонтальної подачі довжина горизонтального напірного трубопроводу може становити від 400 до 3000 м.</p> <p>Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Продуктивність: до 150 м³ / год • Температура: макс. 90 °C • Тиск: макс. 15 бар • Матеріали: корпус: високоміцний чавун; шланги: NR, NBR, EPDM, Nuralon і ін. • Розміри: діаметр шлангів: від 1/4 до 5 [143].

С-7, С-9, С-12	Сепаратор	3	<p>Сепаратор для біотехнології МВРХ 810Н фірми ООО "БИОТЕХНО" (Білорусь).</p> <p>Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Максимальна пропускна здатність - 15 м³/год; - Максима пропускна здатність твердої фази - 600 л/год; - Температура середовища, що подається -0 - 100°C; - Об'єм ротора - 15 л; - Швидкість ротора - 6250 об./хв.; - Об'єм твердої фази - 5,0/9,8 л; - Максимальне прискорення - 8624 g; - Встановлена потужність двигуна - 15/18,5 кВт; - Час запуску - 5 хв.; - Час зупинки без тормоза (приблизно)- 16 хв; - Рівень звукового тиску - 76 дБ(А); - Швидкість обертання двигуна, синхр. 50 Гц - 1500 об./хв.; - Матеріали - 1.4401 UNS 31600 (нерж. сталь); - Габаритні розміри (В×Д×Ш) - 1555×1622×1255 мм; - Вага брутто – 2000 кг [144]
Е-8	Екстрактор (реактор-змішувач для процесу екстракції)	1	<p>Реактор об'ємом 630 л фірми «Діоніс» (Україна).</p> <p>Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Номінальний об'єм корпусу, л: 3200; - Робочий об'єм корпусу, л: 2240; - Частота обертання мішалок, об / хв: плавно регульована від 0 до 500. - Встановлена потужність, при U = 380 В, кВт - Електродвигуна приводу: 3,5; - Матеріали виготовлення корпусу, кришки, мішалки: н / ж сталь 08X18Н10Т [145].
Н-9, Н-12	Насос відцентровий	2	<p>Насос відцентровий DAB KPF (Україна).</p> <p>Потужність двигуна – 0,370 кВт;</p> <p>Продуктивність – 0,06 м³/год;</p> <p>Висота подачі – 25 м [146].</p>

РЗ-11	Реактор-змішувач для промивання полімеру	1	<p>Реактор об'ємом 500 л фірми «Флагма» (Україна). Матеріали виготовлення всіх вузлів, що контактують з продуктом - сталь AISI 316L.</p> <p>Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Номінальний об'єм, л – 500; - Частота обертання мішалки, об/хв: 50-200; - Напруга в електромережі, В: 220; - Потужність приводу мішалки, Вт: 150; - Тип ущільнення мішалки: торцьове [147].
ВС-14	Вакуумна сушарка	1	<p>Сушильна камера фірми ООО "ХимМикс" (Україна). Вакуумна сушильна машина періодичної дії застосовується для сушіння в'язких, порошкоподібних або кристалічний матеріалів в умовах вакууму.</p> <p>Наявність куттера дозволяє додрібнювати матеріали, які комкуються [148].</p>
ФПВ-15	Фасувально-пакувальна машина	1	<p>Фасувальний автомат з ваговим дозатором АФ-50 (8) -В. Автомат фасувально-пакувальний, з стрічковим (вібраційних) ваговим дозатором, призначений для створення автоматичного процесу фасування (дозування) харчових і нехарчових сипучих продуктів, і упаковки їх в полімерні упаковки, що формуються пакувальним автоматом з рулонної плівки, в формі великої «подушки» або «стоячого пакета».</p> <p>Продуктивність: до 500 уп./год [149].</p>

7.2. Опис технологічної схеми виділення та очищення субстанції

Технологічна схема виділення та очищення полілактату включає допоміжні роботи (підготовка 5%-го розчину додецилсульфату натрію) та технологічний процес (відокремлення біомаси від культуральної рідини, обробка отриманої біомаси детергентом, екстракція полімеру, відокремлення полімеру від залишків бактеріальної маси, промивка отриманого полімеру, сушіння, а також фасування та маркування гранул полімеру.

Технологічну схему виділення та очищення наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Приготування та стерилізація допоміжних розчинів.

ДР 1.1. Приготування та стерилізація 5%-го розчину додецилсульфату натрію.

У реактор-змішувач (РЗ-3) об'ємом 2 м³ по трубопроводу подають 1,5 м³ води очищеної. За постійного перемішування та підтримуючи температуру на рівні 40 °С вносять за використання об'ємно-вагового дозатора (Д-1) 80,2 кг додецилсульфату натрію. Після повного розчинення стерилізують при 131 °С протягом 40 хв.

ТП 2. Відділення біомаси.

ТП 2.1. Сепарування культуральної рідини.

Зі збірника (З-5) культуральна рідина за допомогою перистальтичного насосу (ПН-6) направляється до сепаратора (С-7) де відбувається процес розділення на біомасу бактерій та залишки поживного середовища, в тому числі метаболітів (відправляються на знешкодження). Процес розділення у сепараторі відбувається за наступних параметрів: швидкість обертання ротора 5000-6000 об./хв, тривалість - 30 хв, температури - 4°С [4]. Отримана волога маса по трубопроводах подається на наступний етап.

ТП 3. Екстракція полімеру.

ТП 3.1. Змішування біомаси з детергентом.

Отримана на попередньому етапі волога біомаса подається в екстрактор з мішалкою об'ємом 2,5 м³ (Е-8). Туди ж з реактора-змішувача чистого розчинника (РЗ-3) (від ДР 1.1) подається 5%-вий розчин додецилсульфату натрію в кількості 4-5 л/кг вологої біомаси [4].

ТП 3.2. Екстракція полілактату.

Екстракцію проводять при температурі 60 °С протягом години за постійного перемішування [4].

ТП 4. Відділення полімеру.

ТП 4.1. Відокремлення полімеру від залишків бактеріальної маси.

Зі екстрактора (Е-8) отримана суспензія за допомогою насосу (Н-9) направляється до сепаратора (С-10) для процесу її розділення на полімер та залишки бактеріальної маси. Процес розділення у сепараторі відбувається за наступних параметрів: швидкість обертання ротора 5000-6000 об./хв, процес відділення триває протягом 20 хв. Отриманий фугат направляють на

очищення, а полімер подається в реактор-змішувач (РЗ-11) для подальшої обробки.

ТП 5. Промивка отриманого полімеру.

ТП 5.1. Промивка полімеру від залишків детергенту.

У реактор-змішувач (РЗ-11) обладнаний мішалкою, де вже знаходиться полімер звільнений від залишків біомаси бактерій, по трубопроводу подають воду очищену з метою промивки отриманого полілактату. Процес здійснюється за наступних параметрів: частота обертання мішалки 200 об/хв, процес здійснюється протягом 30 хв [4].

ТП 6. Відділення полімеру.

ТП 6.1. Відокремлення полімеру від промивної рідини.

Зі реактора-змішувача (РЗ-11) отримана суспензія на попередньому етапі за допомогою насосу (Н-12) направляється до сепаратора (С-13) для процесу її розділення на полімер та промивну рідину. Процес сепарування здійснюється за таких параметрів: швидкість обертання ротора 5000 об./хв, процес відділення триває протягом 30 хв. Отримана промивна рідина направляють на знешкодження, а полімер подається на наступний етап.

ТП 7. Сушіння полімеру.

ТП 7.1. Сушіння полімеру у вакуумній сушарці.

Отриманий на попередньому етапі вологий полімер піддають сушінню у вакуумній сушарці (ВС-14). Сушіння здійснюється за періодичного способу, тобто отриманий на попередньому етапі вологий матеріал поміщають у шафу на полиці, далі створюється вакуум, потім розпочинається обігрів шафи парою через порожнини в плитах або електричним струмом. Зупинка процесу проводиться в той момент, коли гранули полімеру матимуть залишкову вологість до 1%, після чого готовий сухий матеріал вивантажують. Отримані гранули полімеру поступають на наступний кінцевий етап. Параметри процесу: температура сушіння 40-60 °С, тривалість сушіння 10 год, тиск 0,4 МПа.

ПМВ 8. Фасування та маркування гранул полімеру.

ПМВ 8.1. Фасування та маркування гранул полілактату в мішки.

Процес фасування в упаковку та маркування готового продукту (у ролі упаковки використовуються мішки, які виступають бар'єром від вологи при транспортуванні та зберіганні) проводиться автоматично за використання фасувально-пакувальної машини (ФМП-15). Вкладання наповнених та герметичного запакованих мішків з гранулами полілактату на піддони для зручності подальшого переміщення здійснюється персоналом.

ЗВ 9. Знешкодження відходів.

ЗВ 9.1. Знешкодження рідких відходів.

На даному етапі рідкі відходи планується знешкодження за використання методу біологічної очистки – аеротенків. Аеротенк – це автономна система каналізації, де відбувається біологічне очищення стічної води активним мулом під впливом кисню..

З метою унеможливлення інактивації активного мулу, що може призвести до погіршення процесу очистки, перед подачею стічних вод до аеротенків необхідно довести значення рН до 6,5 – 7,5. Для цього процесу використовується розчин гідроксиду натрію.

В конструкції аеротенків витискувачів стічна вода й активний мул подаються зосереджено з однієї з торцевих сторін аеротенку, а випускаються також зосереджено з іншої торцевої сторони. Навантаження на активний мул знижується уздовж споруди. Такий вид аеротенка дозволяє забезпечити високу якість очищення, однак чутливий до різких коливань витрати й складу стоків. Аеротенки-витискувачі доцільніше застосовувати за відсутності різких коливань витрати стічних вод і вмісту токсичних речовин.

Установка працює таким чином: стічну воду подають у первинний відстійник води, де виводяться збурені частинки забруднювальної речовини.

Для покращання осаджування сюди подається частина надлишкового намулу. Після освітлення вода надходить до переаератора 2. Сюди ж скеровують частину надлишкового намулу із вторинного відстійника, де стічні води попередньо аеруються повітрям протягом 15—20 хв. За

необхідності у переаератор можна вводити нейтралізуючі добавки та живильні речовини.

Із переаератора стічна вода подається в аеротенк, через який циркулює й активний намул. Біохімічні процеси в аеротенку протікають у два етапи: адсорбція поверхнею активного намулу органічних речовин і мінералізація легкоокислювальних речовин при інтенсивному споживанні кисню; доокислення повільноокислювальних органічних речовин і регенерація активного намулу. На цьому етапі кисень споживається досить повільно.

Аеротенк поділяється на дві частини: регенератор (25 % від загального об'єму) й аеротенк, в якому відбувається основний процес очищення. Наявність регенератора дає можливість очищати більш концентровані стічні води і збільшити продуктивність агрегату.

Потім стічна вода з намулом надходить до вторинного відстійника, де намул відокремлюється від води. Більша частина намулу повертається до аеротенка, а його надлишок спрямовують у переаератор.

7.3. Контроль ділянки виділення та очищення субстанції

Основні показники, які контролюються упродовж виробничого процесу виділення та очищення полілактату з біомаси *E. coli* JW0885 є показники ефективності екстракції, а саме повнота виділення полімеру, ступінь його хімічної чистоти і молекулярно-масові характеристики.

Повнота виділення полімеру. Повнота виділення визначаються як відсоток від вихідного вмісту полімеру в біомасі. Початковий та кінцевий вміст полімеру в біомасі визначається з використанням хроматографа з хромато-масс-детектором (6890/5975C, Agilent Technologies, США) [150, 151].

Матеріали хроматографічних колонок. Внутрішній діаметр використовуваних колонок становив 2,5 мм. Одна з колонок була заповнена 2% Reoplex 400 на Chromosorb GAW 60-80, тоді як інша колонка, заповнена Carbowax M 20 TPA на Chromosorb WAW DMCS 80-100 [151].

Експериментальні умови. Колонку Reoplex використовували за таких умов: початкова температура (Т-1) = 90°C; кінцева температура (Т-2) = 150°C. Час витримки для початкової температури становив 1 хв, для кінцевої температури 5 хв; швидкість підвищення температури становила 8°C/хв; швидкість потоку газу-носія становила 30 мл N₂/хв. Колонку Carbowax використовували при Т-1 = 100°C з витратою газу-носія 20 мл N₂/хв. Усі інші умови відповідають тим, що використовуються у колонці Reoplex.

Попередня обробка. Попередня обробка клітинних зразків полягає у центрифугуванні з наступним суспендуванням у суміші 2 мл метанолу (3% H₂SO₄, об./об.) і 2 мл хлороформу, потім нагрівають при 100 °С протягом 3,5 год. Після охолодження до кімнатної температури додають 1 мл H₂O і зразок енергійно струшують протягом 10 хв. Дозволяється розділити дві фази, під час яких клітинний детрит збирається на міжфазі. Органічну фазу, яка підлягає аналізу, поміщають у флакони і можуть зберігати у незміненому вигляді при 4 °С протягом декількох тижнів. Впродовж аналізу використовується швидкість протікання складала 0,5 мл за 1 хвилину [150, 151].

Молекулярно-масові характеристики. Молекулярну масу зразків полімерів визначають за допомогою хроматографії з виключенням розмірів (Agilent Technologies 1260 Infinity, США) у поєднанні з багатокутним лазерним розсіюванням світла (MALLS, Dawn Heleos II, Wyatt Technology, США) та диференціальною рефрактометриєю (dRI, Optilab T-rEX, Wyatt Technology, США).

Зразки розчиняють протягом ночі в хлороформі ВЕРХ-класу (4 мг/мл) і фільтрували перед аналізом через фільтр-шприц (нейлонова мембрана, розмір пор 0,45 мкм). Для аналізу 100 мкл зразка вводили в хроматографічну систему, що містить хлороформ ВЕРХ-класу (попередньо фільтрували через 0,02 мкм мембранний фільтр). Використовувана швидкість протікання складала 0,6 мкл за 1 хвилину. Поділ проводили за допомогою колонки PL Gel MIXED-C (300 75 мкм, Agilent Technology, США). Молекулярну масу зразків полімеру розраховували за допомогою програмного забезпечення ASTRA,

використовуючи значення приросту показника заломлення зразків полімеру у хлороформі ($dn/dc = 0,0334$ мл/г), який було визначено на основі відгуку диференціального рефрактометра, передбачаючи 100% відновлення маси зразка з колонки [150, 152].

Ступінь чистоти полімеру. Залишкові ліпіди, включаючи жирні кислоти (ЖК) як показник забруднення полімеру, визначали з використанням хроматографа з хромато-мас-детектором (6890/5975С, Agilent Technologies, США).

Підготовка зразка. Ліпіди з сирової біомаси виділяють за методом Фолча сумішшю хлороформу і метанолу (2:1 за об'ємом). В отриманому екстракті полімер відокремлюють від ліпідів осадженням подвійним об'ємом гексану. Екстракт ліпідів (ліпіди, які легко екстрагуються) висушують на роторному випарнику і надалі піддають метанолізу для отримання метилових ефірів жирних кислот (МЕЖК). Метаноліз жирних кислот проводиться в суміші метанолу та сірчаної кислоти (50:1 за об'ємом) при температурі 90°C протягом 2 год.

Методика. Метилові ефіри жирних кислот аналізували на хромато-мас-спектрометрі GCD Plus ("Hewlett Packard", США). Умови хроматографування: газ-носій - гелій, швидкість - 1 мл/хв; температура введення проби 220 °С; початкова температура хроматографування 120°C, підйом температури до 230°C зі швидкістю 5 °С в хв; колонка капілярна HP-5M, довжина 30 м, діаметр - 0.25 мм; температура трансферної лінії 250 °С, джерела іонів - 165 °С, режим електронного удару при 70 eV, режим сканування фрагментів від 45 до 450 m/z при 0.5 с/с. Ідентифікацію жирних кислот проводили порівнянням їх часу утримування і мас-спектрів зі стандартами; використовували насичені, моноєнові, дієнові, триєнові, тетра- і пентаєнові кислоти з довжиною ланцюга від 10 до 20, а також в-гідроксикислоти ("Serva", Німеччина і "Sigma", США). Для ідентифікації ненасичених кислот проводили порівняння іонних хроматограм вихідних МЕЖК і гідрованих зразків. Положення подвійних зв'язків моноєнових

кислот визначали після отримання диметилдисульфідних (ДМДС) похідних відвідних МЕЖК. Наявність в ланцюзі ЖК пропанового кільця ідентифікували після бромовання гідрованих зразків. Ідентифікація довголанцюгових в-гідроксикислот підтверджують також аналізом відповідних триметилсилільних (ТМС) похідних [150, 153].

Далі наведена карта постадійного контролю (табл. 7.2).

Таблиця 7.2

Карта постадійного контролю виробництва полілактату

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Кт, Кх, Км 1.1 <i>Приготування та стерилізація 5%-го розчину додецилсульфату натрію</i>	Розчин додецилсульфат натрію Температура, час, концентрація, відсутність сторонньої мікрофлори	Термометр, годинник, манометр, хімічний контроль, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, концентрація розчину та мікробіологічний контроль після стерилізації	t=131 °C, T = 40 хв, P = 0,15 МПа, C = 5%, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт 2.1 <i>Випарювання культуральної рідини</i>	Культуральна рідина Температура, час, тиск	Термометр, годинник, манометр	Температура визначається безперервно під час процесу випарювання	t=70-80 °C, T = 15 хв, P = 0,008-0,01 МПа
Кт 3.1 <i>Сепарування культуральної рідини</i>	Обладнання Тривалість сепарування, частота обертання ротора, температура процесу	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр	Частота обертання, температура визначається безперервно під час сепарування	τ = 30-40 хв, t = 4°C, n=5000-6000 об/хв
Кт 4.2 <i>Екстракція полілактату</i>	Суміш біомаси та детергенту Температура, час, частота обертання мішалки	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр	Частота обертання, температура визначається безперервно під час екстракції	τ = 60 хв, t = 60°C, n=500 об/хв

Закінчення табл. 7.2

Кт 5.1 <i>Відокремлення полімеру від залишків бактеріальної маси</i>	Суспензія Тривалість сепарування, частота обертання ротора	Годинник, технічний тахометр	Частота обертання визначається безперервно під час розділення	$\tau = 20$ хв, $n=5000$ об/хв
Кт 6.1 <i>Промивка полімеру від залишків детергенту</i>	Полімер з промивною водою Час, частота обертання мішалки	Годинник, технічний тахометр	Частота обертання визначається безперервно під час процесу	$\tau = 30$ хв, $n=200$ об/хв
Кт 7.1 <i>Відокремлення полімеру від промивної рідини</i>	Полімер з промивною водою Тривалість сепарування, частота обертання ротора	Годинник, технічний тахометр	Частота обертання визначається безперервно під час розділення	$\tau = 30$ хв, $n=5000$ об/хв
Кт 8.1 <i>Сушіння полімеру у вакуумній сушарці</i>	Обладнання Тривалість сушіння, температура сушіння, тиск	Манометр, годинник, термометр технічний	Тиск, температура визначається безперервно під час сублимаційного сушіння	$t= 40-60$ °С, $\tau = 10$ год, $P=0,4$ МПа
Кт 9.1 <i>Фасування та маркування гранул полілактату в мішки</i>	Мішок з гранулами Вага одного мішка	Ваги	Вага мішків визначається безперервно під час пакування полімерних гранул	$m=50$ кг

РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ПЛАСТИКОВОЇ ПЛІВКИ З ПОЛІЛАКТАТУ

8.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва пластикової плівки

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі ділянки виробництва пластикової плівки з полілактату, наведена в табл. 8.1.

Таблиця 8.1

Специфікація ділянки допоміжних робіт та процесу виробництва пластикової плівки з полілактату

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1, Ф-2	Пристрій для забору повітря з вбудованим фільтром грубої очистки	1	Пристрій для забору повітря Systemair TLP 200/5.0, Швеція. Основні технічні характеристики: - Вбудований повітряний фільтр – G4; - Електропідключення - 220 V / 50 Hz; - Частота обертання - 2578 об/мин; - Ступінь захисту - IP44; - Маса - 40,5 кг [109].
В-3	Вентилятор	1	Відцентровий вентилятор Ostberg TKS 300 A, Швеція. Основні технічні характеристики: - Тип воздуховоду – прямокутний; - Тип вентилятора – відцентровий; - Частота обертання – 2760 об/хв; - Продуктивність - до 986 м ³ /год [154].
Ф-4	Головний фільтр очистки повітря	1	Фільтр тонкої очистки ФЯК F6 592x490x600-8 класу F9. Основні технічні характеристики: - Вид рамки – оцинкована; - Фільтруючий матеріал - . поліестер+спанбонд; - Максимальна робоча температура: 60-70°C; - Ступінь очищення становить 90- 99 % ; - Кількість карманів – 8 шт.[155].

					НУХТ БТЕК 02.02.15 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Черепанський В.В.			РОЗДІЛ 8. Опис технологічного процесу виробництва пластикової плівки з полілактату	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					149	6
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Т-5	Теплообмінник-охолоджувач	1	<p>Охолоджувач повітря Salda AVA 200, Литва. Посадковий діаметр, мм - 200 Призначений для витрати повітря, м³/год: 230-700.</p> <p>Круглий водяний охолоджувач Salda AVA використовується в системах вентиляції для надходження холодного повітря. Даний тип охолоджувачів виготовлений з мідних трубок і алюмінієвих пластин. Корпус виготовлений з якісної оцинкованої бляхи. В даному водяному охолоджувачі є система дренажу конденсату [156].</p>
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	<p>Повітрянагрівач водяний НКВ 125-2, Україна.</p> <p>Водяний нагрівач припливного повітря Вентс НКВ 125-2 складається з корпусу, який виконаний з оцинкованої сталі і теплообмінник, з мідних трубок, поверхня теплообміну - з алюмінієвих пластин Для герметичного з'єднання з повітроводами нагрівачі забезпечені гумовими ущільнювачами. Нагрівачі випускаються в двох-або чотирирядною виконанні і призначені для експлуатації при максимальному робочому тиску 1,6 МПа (16 бар) і максимальній робочій температурі води + 100 ° С. На вихідному колекторі нагрівача передбачений патрубок для установки погрузного датчика вимірювання температури або захисту від обмороження калорифера [157].</p>
Е-7	Екструдер	1	<p>Екструдер Rheomex 252/254 фірми Thermo Haake, США. Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - макс. крутний момент - 160 Nm; - Захист від перевантаження - зрізний штифт; - Контроль температури - електричний з повітряним протиохолодженням; - Кількість температурних зон – 3; - Макс. температура – 450 °С [158].
УЛП-8	Устаткування для лиття пластикової плівки	1	<p>Устаткування для лиття пластикової плівки YXLY 750 фірми YONGXU, Китай. Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Товщина листа - 0,15-2,0 мм; - Співвідношення довжини до діаметра - 32:1; - Робоча потужність – 50 кВт; - Номінальна потужність - 150 кВт [159].
АП-9	Автомат для пакування	1	<p>Автомат для пакування виробництва «Ковчег», Україна. Автомат для пакування призначений для пакування рулонів у термозбіжну плівку із запаюванням в автоматі та подальшою усадкою плівки в термотунелі [160].</p>

8.2. Опис технологічного процесу виробництва пластикової плівки

Технологічна схема виготовлення плівки з полілактату складається з допоміжних робіт (підготовка вентиляційного повітря для виробничих приміщень) та основний процес (розплавлення гранул полілактату в екструдері; видавлювання розплавлених гранул через листову матрицю; гартування сформованої плівки; розтягування плівки; намотування плівки на бобіну).

Технологічну схему наведено у графічній частині.

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря.

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

На даному етапі за використання повітрязабірника (ПЗ-1) відбувається забір повітря для подальшого його очищення. Даний процес відбувається на висоті близько 20 – 30 м.

ДР 1.2. Грубе очищення повітря

На етапі грубого очищення повітря відбувається процес вилучення основної маси великих часток пилу діаметром понад 10 мкм. Фільтри грубої очистки G 3 (Ф-2), які встановлюються на даному етапі, представляють собою злегка змащене пружне скловолокно спеціального плетіння. Всередині фільтра розташовані дві решітки, між якими поміщають фільтруючий матеріал. Ступінь очищення становить $E = 80\%$.

ДР 1.3. Попередня фільтрація на фільтрах тонкої очистки

Процес попередньої фільтрації відбувається за використання фільтрів F 6 (Ф-3), який призначений для попередньої очистки повітря від часток розміром більше 5 мкм (пил, продукти корозії), та одночасно для захисту більш ефективного фільтру тонкої очистки. Ступінь очищення повітря 98%.

ДР 1.4. Стабілізація термодинамічних показників

Повітря за допомогою вентилятора (В-4) подається до кожухотрубного теплообмінника (Т-5), охолоджується за допомогою хладагенту фреону або підігрівається до $21-23^{\circ}\text{C}$ за допомогою теплообмінника-нагрівача (Т-6) в залежності від пори року, коли проводиться забір повітря. Вологість повітря

повинна перебувати в межах 30-60%. Після цього повітря направляється до виробничих приміщень класу чистоти D.

ТП 2. Виготовлення пластикової плівки з полілактату.

ТП 2.1. Розплавлення гранул полілактату в екструдері.

Полімер у вигляді гранул надходить через завантажувальну воронку екструдера (Е-7) в гвинтовий канал шнеку і захоплюється за рахунок різниці сил тертя між полімером і стінкою циліндра і полімером і гвинтовими стінками каналу. У міру руху полімеру по шнеку у ньому розвивається високий гідростатичний тиск. Тертя, що виникає на контактних поверхнях під час руху полімеру, викликає розігрів полімеру. Тепло, що виділяється при цьому, йде на нагрівання полімеру. Деяка частина тепла підводиться також від розташованих на циліндрі нагрівачів. У міру руху твердої пробки по каналу шнека тиск у ній зростає, пробка ущільнюється, її поверхня, що торкається внутрішньої стінки циліндра, нагрівається, і на ній утворюється тонкий шар розплаву. Поступово товщина цього шару збільшується, і в той момент, коли вона дорівнюватиме товщині радіального зазору між стінкою корпусу і гребнем гвинтової нарізки шнека, останній почне зішкрібати шар розплаву зі стінки, збираючи його перед своєю штовхаючою гранню. Цей переріз шнека є фактичним кінцем зони живлення та початком зони плавлення.

Зона плавлення – найбільш складна із зон шнеку – характеризується перебуванням у каналі полімерного матеріалу у двох станах: розплавленому та твердому. Ширина пробки зменшується до 0,1-0,2 ширини гвинтового каналу шнека, циркуляційний рух у шарі розплаву, що збирається перед стінкою, що штовхає, руйнує залишки пробки, дроблячи її на дрібні шматки. Переріз шнека, у якому починається дроблення пробки, прийнято вважати кінцем зони плавлення.

Перебіг розплаву полімеру в зоні дозування відбувається під дією сил в'язкого тертя, що розвиваються внаслідок відносного руху нека та стінки циліндра, подібно до течії рідини у гвинтових насосах – по гвинтовій

траєкторії. Прийнято представляти цей перебіг як суму двох незалежних рухів: поступального – вздовж осі гвинтового каналу та циркуляційного – у площині нормальній до осі гвинтового каналу. Температури для зони подачі, плавлення та дозування становлять 160, 180 і 175 °С відповідно.

ТП 2.2. Видавлювання розплавлених гранул через листкову матрицю.

Після екструдера розплавлена маса полілактату відразу потрапляє до устаткування для лиття пластикової плівки (УЛП-8), а саме до формувальної голівки, яка представляє собою тонку щілину. Зазвичай щілина між матрицею встановлюється на 10% або на 25–50 мкм більше, ніж цільова товщина листа. Тобто щілина між матрицею повинна становити 265–290 мкм (з яких 240 мкм – це товщина цільової плівки). Плівка із формувальної головки виходить у вигляді безперервного полотна, яке рухається до наступного етапу обробки.

ТП 2.3. Гартування сформованої плівки.

Після етапу видавлювання плівка гартується на полірованих хромованих валках, які охолоджуються циркуляційною водою до температури 25–50 °С. Через низьку міцність PLA при розплаві переважно використовується конфігурація горизонтальних валків. Щоб зменшити ймовірність захоплення повітря та зменшити дефекти листів рекомендується розташовувати матрицю якомога ближче до вхідного зазору та трохи вище зазору, щоб пристосуватись до невеликого провисання розплавленого полотна PLA.

ТП 2.4. Розтягування сформованої плівки.

Після етапу гартування плівка піддається розтягуванню в напрямку машини 2–3х, тоді як співвідношення поперечного розтягування можна використовувати 2–4х. Цей процес проходить за температури при 60–80 °С. Температура досягається за рахунок підігріву валків у відповідній зоні устаткування для лиття пластикової плівки (УЛП-8).

ТП 2.5. Намотування на бобіну готової плівки.

Повністю сформована пластикова плівка з полілактату потрапляє до останньої частини устаткування для лиття пластикової плівки (УЛП-8), де

сама проходить процес її намотування на бобіну. Намотування полотна PLA має здійснюватися з хорошим контролем натягу, щоб отримати постійну щільність намотування. Довжина плівки у одній бобіні повинна становити 500 ± 1 м.

ПМВ 3. Пакування та маркування готової продукції.

ПМВ 3.1. Герметичне пакування та маркування бобін з плівкою.

Заключним етапом виробництва пластикової плівки з полілактату є розрізання загальної бобіни на окремі бобіни відповідної ширини та наступне герметичне пакування у поліетиленову плівку з метою захисту її від механічних пошкоджень та мікробної контамінації упродовж періоду зберігання та транспортування. Пакування та маркування здійснюється за допомогою автомату для пакування (АП-9).

ВИСНОВКИ

1. Накопичення пластику як на суші, так і в океанах є важливим питанням нашого часу, і сучасні тенденції прогнозують, що масштаб цього питання буде експоненціально зростати. Таким чином, вкрай важливо впроваджувати рішення щодо зменшення швидкості накопичення пластику, а також працювали над зменшенням впливу, який матиме неминуче зростання. Одним із рішень даної проблеми є активне впровадження упаковки із біопластику, а саме упаковки виготовленої на основі полілактату, що дасть змогу попередити виникнення проблем накопичення у навколишньому середовищі та шкоди для неї.

2. Найбільш доцільно проводити синтез полілактату саме методом бродіння, адже він є ефективнішим, нетоксичним, має низьку вартість, та проводиться в один етап.

3. У результаті порівняльного аналізу проведеного в даній роботі для біосинтезу полілактату обраний штам *E. coli* JW0885, тому що:

- ✓ умовна вартість 1 г полімеру при культивуванні *E. coli* JW0885 є найнижчою (1,41 грн/г) у порівнянні з умовною вартістю полімеру, одержаного культивуванням *C. glutamicum* ATCC13803 (12,53 грн/г) та *R. eutropha* 437-540 (4,22 грн/г);
- ✓ продуктивність біосинтезу полілактату у *E. coli* JW0885 є більшою майже у 8 разів порівняно з *C. glutamicum* ATCC13803 (0,15 та 0,019 г/л за год відповідно), та у 30 разів більша порівняно з *R. eutropha* 437-540 (0,005 г/л за год).

4. Розроблена та описана технологія отримання пластикової плівки з полілактату, яка використовуватиметься як компонент первинної упаковки (блістера) для лікарського засобу. Масштабування даної технології забезпечить отримання дослідних та промислових партій полімерів у кількостях, необхідних проведення комплексу регламентованих досліджень, розробки та стандартизації спеціалізованої полімерної продукції.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Kijchavengkul A. Perspective Compostability of polymers. *Polymer International*. 2008; 57 (18): 793-804.
2. Волова Т.Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*. 2014; 7 (2): 104-133.
3. Chanprateep S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Biosci. Bioeng.* 2010; 12(110): 621-632.
4. Киселев Е.Г., Демиденко А.В., Барановский С.В., Волова Т.Г. Масштабирование технологии синтеза биodeградируемых полигидроксиалканоатов в условиях опытного производства. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*. 2014; 7 (2): 134-147.
5. Киселев Е. Г., Демиденко А. В. Сравнительное исследование методов экстракции полигидроксиалканоатов из биомассы бактерий. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*. 2014; 7 (2): 148-160.
6. Nduko J.M., Matsumoto K., Ooi T., Taguchi S. Effectiveness of xylose utilization for high yield production of lactate-enriched P(lactate-co-3-hydroxybutyrate) using a lactate-overproducing strain of *Escherichia coli* and an evolved lactate-polymerizing enzyme. *Metab Eng.* 2013; 15:159-66. doi: 10.1016/j.ymben.2012.11.007
7. Dey U., Mondal N.K., Das K., Dutta S. An approach to polymer degradation through microbes. *J Pharm.* 2012; 2(3): 385–388.
8. Haider T., Völker C., Kramm J., Landfester K., & Wurm F. R. Plastics of the future? The impact of biodegradable polymers on the environment and on society. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019; 58: 50-62.

9. Dilkes-Hoffman L. S., Pratt S., Lant P. A. & Laycock B. The Role of Biodegradable Plastic in Solving Plastic Solid Waste Accumulation. *Plastics to Energy*. 2019; 469–505.
10. Bhatnagar S., Kumari R. (2013) Bioremediation: a sustainable tool for environmental management—a review. *Ann Rev Res Biol*. 2013; 3(4): 974–993.
11. Auta H.S., Emenike C.U., Fauziah S.H. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environ Int*. 2017; 102: 165-176.
12. Guo J.-J., Huang, X.-P., Xiang, L., et al. (2020). Source, migration and toxicology of microplastics in soil. *Environment International*. 2020; 137: 1-13.
13. de Souza Machado A. A., Lau C. W., Till J., Kloas W., Lehmann A., Becker R., Rillig M.C. Impacts of Microplastics on the Soil Biophysical Environment. *Environ Sci Technol*. 2018; 52(17): 9656-9665.
14. Rillig M. C., Ingraffia R., de Souza Machado A. A. Microplastic Incorporation into Soil in Agroecosystems. *Front Plant Sci*. 2017; 8: 1805.
15. Huang Y., Zhao Y., Wang J., Zhang M., Jia W., Qin X. LDPE microplastic films alter microbial community composition and enzymatic activities in soil. *Environ Pollut*. 2019; 254(Pt A): 112983.
16. Arthur E., Moldrup P., Holmstrup M., Schjonning P., Winding A., Mayer P., de Jonge L.W. Soil microbial and physical properties and their relations along a steep copper gradient. *Agric. Ecosyst. Environ*. 2012; 159: 9–18.
17. Naveed M., Herath L., Moldrup P., Arthur E., Nicolaisen M., Norgaard T., Ferre T.P.A., de Jonge L.W. Spatial variability of microbial richness and diversity and relationships with soil organic carbon, texture and structure across an agricultural field. *Appl. Soil Ecol*. 2016; 103: 44–55.
18. Rillig M.C., Muller L.A.H., Lehmann A. Soil aggregates as massively concurrent evolutionary incubators. *ISME J*. 2017; 11: 1943–1948.

19. Rubol S., Manzoni S., Bellin A., Porporato A. Modeling soil moisture and oxygen effects on soil biogeochemical cycles including dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA). *Adv. Water Resour.* 2013; 62: 106–124.
20. Veresoglou S. D., Halley J. M., Rillig M. C. Extinction risk of soil biota. *Nat Commun.* 2015; 6: 8862.
21. Pathak V.M., Navneet. Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. *Bioresour. Bioprocess.* 2017; 4 (15): 1-31.
22. van den Oever M., Molenveld K., van der Zee M., & Bos H. Bio-based and biodegradable plastics : facts and figures : focus on food packaging in the Netherlands. (Wageningen Food & Biobased Research; No. 1722). *Wageningen Food & Biobased Research.* 2017; 1-65.
<https://doi.org/10.18174/408350>
23. Reichert C. L., Bugnicourt E., Coltelli M. B., Cinelli P., et al. Bio-Based Packaging: Materials, Modifications, Industrial Applications and Sustainability. *Polymers (Basel).* 2020; 12(7): 1558.
24. Piemonte V. Bioplastic wastes: the best final disposition for energy saving. *J. Polym. Environ.* 2011; 19(4): 988-994.
25. Rossi V., Cleeve-Edwards N., Lundquist L., Schenker U., Dubois C., Humbert S., & Jolliet O. (2015). Life cycle assessment of end-of-life options for two biodegradable packaging materials: sound application of the European waste hierarchy. *Journal of Cleaner Production.* 2015; 86:132–145.
26. Detzel A., Kauertz B., Derreza-Greeven C. & Kirsch A. Untersuchung der Umweltwirkungen von Verpackungen aus biologisch abbaubaren Kunststoffen. *Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau.* 2012.
27. Chung H., Yang J. E., Ha J. Y., Chae T. U., Shin J. H., Gustavsson M., et al. Biobased production of monomers and polymers by metabolically engineered microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology.* 2015; 36: 73–84.

28. Yang T. H., Kim T. W., Kang H. O., Lee S.-H., Lee E. J., Lim S.-C., et al. Biosynthesis of polylactic acid and its copolymers using evolved propionate CoA transferase and PHA synthase. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010; 105: 150–160.
29. David Y., Joo J. C., Yang J. E., Oh Y. H., Lee S. Y., Park S. J. Biosynthesis of 2-Hydroxyacid-Containing Polyhydroxyalkanoates by Employing butyryl-CoA Transferases in Metabolically Engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol J*. 2017; 12(11).
30. Mizuno S., Enda Y., Saika A., Hiroe A., & Tsuge T. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates containing 2-hydroxy-4-methylvalerate and 2-hydroxy-3-phenylpropionate units from a related or unrelated carbon source. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2018; 125: 295–300.
31. Park S. J., Jang Y.-A., Lee H., Park A.-R., Yang J. E., Shin J., et al.. Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for the biosynthesis of 2-hydroxyacid-containing polyhydroxyalkanoates. *Metabolic Engineering*. 2013; 20: 20–28.
32. Park S. J., Jang Y. A., Noh W., Oh Y. H., Lee H., David Y., et al. Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of polyhydroxyalkanoates from sucrose. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015; 112: 638–643.
33. Choi S.Y., Cho I.J., Lee Y., Park S., Lee S.Y. Biocatalytic synthesis of polylactate and its copolymers by engineered microorganisms. *Methods Enzymol*. 2019; 627: 125-162.
34. Ren Y., Meng D., Wu L., Chen J., Wu Q., & Chen G. Q. Microbial synthesis of a novel terpolyester P(LA-co-3HB-co-3HP) from low-cost substrates. *Microbial Biotechnology*. 2017; 10: 371–380.
35. Tajima K., Han X., Satoh Y., Ishii A., Araki Y., Munekata M., et al. In vitro synthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) incorporating lactate (LA) with a block sequence by using a newly engineered thermostable PHA

- synthase from *Pseudomonas* sp. SG4502 with acquired LA-polymerizing activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012; 94: 365–376.
36. Dudley Q. M., Karim A. S., & Jewett, M. C. Cell-free metabolic engineering: Biomanufacturing beyond the cell. *Biotechnology Journal*. 2015; 10: 69–82.
 37. Song Y., Matsumoto K. I., Yamada M., Gohda A., Brigham C. J., Sinskey A. J., et al. Engineered *Corynebacterium glutamicum* as an endotoxin-free platform strain for lactate-based polyester production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012; 93: 1917–1925.
 38. Jung Y. K., & Lee S. Y. Efficient production of polylactic acid and its copolymers by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 2011. 151, 94–101.
 39. Jung Y. K., Kim T. Y., Park S. J., & Lee S. Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of polylactic acid and its copolymers. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011; 105: 161–171.
 40. Karamanlioglu M., Preziosi R., & Robson G. D. Abiotic and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly(lactic acid): A review. *Polymer Degradation and Stability*. 2017; 137: 122–130.
 41. Zaaba N. F., & Jaafar M. A review on degradation mechanisms of polylactic acid: Hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation. *Polym Eng Sci*. 2020; 60(9): 2061-2075.
 42. Qi X., Ren Y., & Wang X. New advances in the biodegradation of Poly(lactic) acid. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2017; 117: 215–223.
 43. Jeon H.J., Kim M.N. 2013. Biodegradation of poly(L-lactide) (PLA) exposed to UV irradiation by a mesophilic bacterium. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. 2013; 85: 289-293.
 44. Penkhrue W., Khanongnuch C., Masaki K., Pathom-aree W., Punyodom W., Lumyong S., 2015. Isolation and screening of biopolymer-degrading

- microorganisms from northern Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2015; 31: 1431-1442.
45. Kim M.Y., Kim C., Moon J., Heo J., Jung S.P., Kim J.R. Polymer Film-Based Screening and Isolation of Polylactic Acid (PLA)-Degrading Microorganisms. *J Microbiol Biotechnol.* 2017; 27(2):342-349.
46. Karamanlioglu M., Houlden A., Robson G.D., Karamanlioglu M. Isolation and characterisation of fungal communities associated with degradation and growth on the surface of poly(lactic) acid (PLA) in soil and compost. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2014; 95: 301-310.
47. Penkhrue W., Khanongnuch C., Masaki K., Pathom-aree W., Punyodom W., Lumyong S., 2015. Isolation and screening of biopolymer-degrading microorganisms from northern Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2015; 31: 1431-1442.
48. Hanphakphoom S., Maneewong N., Sukkhum S., Tokuyama S., Kitpreechavanich V., 2014. Characterization of poly(L-lactide)-degrading enzyme produced by thermophilic filamentous bacteria *Laceyella sacchari* LP175. *J. General Appl. Microbiol.* 2014; 60: 13-22.
49. Hajighasemi M., Nocek B.P., Tchigvintsev A., et al. Biochemical and structural insights into enzymatic depolymerization of polylactic acid and other polyesters by microbial carboxylesterases. *Biomacromolecules.* 2016; 17: 2027-2039.
50. Jeon H.J., Kim M.N. Biodegradation of poly(L-lactide) (PLA) exposed to UV irradiation by a mesophilic bacterium. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2013; 85: 289-293.
51. Laycock B., Nikolić M., Colwell J. M., Gauthier E., Halley P., Bottle S., & George G. Lifetime prediction of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science.* 2017; 71: 144–189.
52. Rudnik, E. & Briassoulis D. Degradation behaviour of poly(lactic acid) films and fibres in soil under Mediterranean field conditions and laboratory simulations testing. *Industrial Crops and Products.* 2011; 33(3): 648–658.

53. Martin R. T., Camargo L. P., & Miller S. A. Marine-degradable polylactic acid. *Green Chem.* 2014; 16(4): 1768–1773.
54. Greene J. PLA and PHA Biodegradation in the Marine Environment. *Department of Resources Recycling and Recovery: Sacramento, CA, USA.* 2012.
55. Bagheri A. R., Laforsch C., Greiner A., Agarwal S. Fate of So-Called Biodegradable Polymers in Seawater and Freshwater. *Glob Chall.* 2017; 1(4):1700048.
56. Makadia H. K., & Siegel S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers.* 2011; 3(3): 1377–1397.
57. Biodegradable and Sustainable Plastic Alternatives in Pharmaceutical Packaging [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=20060>
58. Chen Y., Awasthi A. K., Wei F., Tan Q., Li J. Single-use plastics: Production, usage, disposal, and adverse impacts. *Sci Total Environ.* 2021; 752:141772. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141772.
59. Confronting Plastic Pollution One Bag at a Time [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://blog.epa.gov/2016/11/01/confronting-plastic-pollution-one-bag-at-a-time/>
60. Wu Y., Guo P., Zhang X., Zhang Y., Xie S., Deng J. Effect of microplastics exposure on the photosynthesis system of freshwater algae. *J Hazard Mater.* 2019; 374:219-227. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.04.039.
61. Герасимчук В.Г. Стратегія використання пластику у циркулярній економіці: розвиток бізнесу, скорочення відходів. *Економічний вісник НТУУ «КПІ».* 2019; 16: 31-41.
62. Насіров М. Ф. Інерційний та інноваційний сценарії поводження з відходами пластику у середньо- та довгостроковій перспективі. *Економічна наука.* 2018; 8: 71-75.

63. Lopes M. S., Jardini A. L., & Filho R. M. Poly (Lactic Acid) Production for Tissue Engineering Applications. *Procedia Engineering*. 2012; 42: 1402–1413.
64. Farah S., Anderson D. G., & Langer R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016; 107: 367–392.
65. Bergström J. S., Hayman D. An Overview of Mechanical Properties and Material Modeling of Polylactide (PLA) for Medical Applications. *Ann Biomed Eng*. 2016; 44(2): 330-340.
66. Hamad K., Kaseem M., Yang H.W. et al. Properties and medical applications of polylactic acid: A review. *eXPRESS Polymer Letters*. 2015; 9(5): 435–455.
67. New, eco-friendly product: Thermal insulated packaging [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.swiftpak.co.uk/insights/thermal-insulated-packaging-pla>
68. Castro-Aguirre E., Iñiguez-Franco F., Samsudin H., Fang X., Auras R. Poly(lactic acid)-Mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016; 107: 333-366.
69. Murariu M., Dubois P. PLA composites: From production to properties. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016; 107:17-46.
70. ГОСТ 25250-88 «Пленка поливинилхлоридная для изготовления тары под пищевые продукты и лекарственные средства. Технические условия» [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4294829/4294829183.pdf>
71. European Parliament and Council Directive 94/62/EC of 20 December 1994 on packaging and packaging waste heavy metal content as described in Article 11.
72. PE Films Weights and Measures Single Wound Weight per 1,000 Lineal Metres [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://brentwoodplastics.com/handy-math-feet-single-wound-m>

73. Polylactic Acid Market Size, Share & Trends Analysis Report By End-use (Packaging, Textile, Agriculture, Automotive & Transport, Electronics), By Region (North America, APAC, Europe), And Segment Forecasts, 2021 – 2028 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/polylactic-acid-pla-market>
74. Babu R. P., O'Connor K., & Seeram R. Current progress on bio-based polymers and their future trends. *Progress in Biomaterials*. 2013; 2(1): 1-16.
75. Polymer Properties Database [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://polymerdatabase.com/Films/PLA%20Films.html>
76. Nduko J.M., Matsumoto K., Ooi T., Taguchi S. Effectiveness of xylose utilization for high yield production of lactate-enriched P(lactate-co-3-hydroxybutyrate) using a lactate-overproducing strain of *Escherichia coli* and an evolved lactate-polymerizing enzyme. *Metab Eng*. 2013; 15:159-66. doi: 10.1016/j.ymben.2012.11.007
77. Choi S.Y., Cho I.J., Lee Y., Park S., Lee S.Y. Biocatalytic synthesis of polylactate and its copolymers by engineered microorganisms. *Methods Enzymol*. 2019; 627:125-162. doi: 10.1016/bs.mie.2019.04.032
78. Riaz S., Fatima N., Rasheed A., Riaz M., Anwar F., & Khatoun Y. Metabolic Engineered Biocatalyst: A Solution for PLA Based Problems. *International Journal of Biomaterials*. 2018; 1–9. doi:10.1155/2018/1963024
79. Jamshidian M., Tehrany E. A., Imran M., Jacquot M., and Desobry S. Poly-Lactic Acid: production, applications, nanocomposites, and release studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010; 5 (9): 552–571.
80. Castro-Aguirre E., In˜iguez-Franco F., Samsudin H., Fang X., & Auras R. Poly (lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016; 107: 333–366.

81. Pawar R. P., Tekale S. U., Shisodia S. U., Totre J. T., and Domb A. J. Biomedical applications of poly(lactic acid). *Recent Patents on Regenerative Medicine*. 2014; 1 (4): 40–51.
82. Ochi A., Matsumoto K., Ooba T., Sakai K., Tsuge T., Taguchi S. Engineering of class I lactate-polymerizing polyhydroxyalkanoate synthases from *Ralstonia eutropha* that synthesize lactate-based polyester with a block nature. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013; 97(8): 3441-7. doi: 10.1007/s00253-012-4231-9
83. Загальна характеристика мікроорганізмів і способи їх культивування [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://moodle.znu.edu.ua/pluginfile.php?file=/236895/mod_resource/content/1/2.pdf
84. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Загальна біотехнологія» для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти за освітньо-професійною програмою «Біотехнології та біоінженерія» зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія/ Укл.: старший викладач Філімоненко О.Ю. – Кам'янське, ДДТУ, 2019.–35 с.
85. Промышленные ферментеры [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus/promyishlennyye-fermenteryi.html>
86. Choi S.Y., Cho I.J., Lee Y., Park S., Lee S.Y.. Biocatalytic synthesis of polylactate and its copolymers by engineered microorganisms. *Methods Enzymol*. 2019; 627:125-162.
87. Киселев Е.Г., Демиденко А.В., Барановский С.В., Волова Т.Г. Масштабирование технологии синтеза биodeградируемых полигидроксиалканоатов в условиях опытного производства. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*. 2014; 7 (2): 134-147.

88. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 Лікарські засоби. Належна виробнича практика.
89. Барышников Н. А., Беляков Г. В., Таурова А. А., Филиппов А. Н. Фильтрация суспензии через пористую среду с учетом гравитации // Мембраны и мембранные технологии. – 2016. – т. 6, № 1. – с. 92–98.
90. Флотация [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://medic.studio/biotehnologii/flotatsiya-70593.html>
91. Черевко О. І., Поперечний А. М. Процеси і апарати харчових виробництв: підручник / О. І. Черевко, А. М. Поперечний. — 2-е видання, доп. та випр. — Х.: Світ Книг, 2014. — 495 с.
92. Doran P. M. Unit Operations. Bioprocess Engineering Principles. 2013. P. 445–595.
93. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
94. Киселев Е. Г., Демиденко А. В. Сравнительное исследование методов экстракции полигидроксиалканоатов из биомассы бактерий. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология.* 2014; 7 (2): 148-160.
95. Yang Y.H., Brigham C., Willis L., Rha C., Sinskey A. Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Biotechnol Lett.* 2011; 33: 937-942.
96. Gurtovenko A.A., Anwar J. Interaction of ethanol with biological membranes: The formation of non-bilayer structures within the membrane interior and their significance. *J. Phys. Chem. B.* 2009; 113: 1983-1992.
97. Molding and processing guidelines for pla (polylactic acid) compounds [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.rtpcompany.com/molding-and-processing-guidelines-for-pla-polylactic-acid-compounds/>
98. Сидоров Ю. І. Розпилювальні сушарки в біотехнології. *Biotechnology.* 2012; 5 (4): 46-54.

99. Лиса Я. П. Дослідження впливу температури як параметра процесу ліофілізації. *Вісник Кременчуцького національного університету імені Михайла Остроградського*. 2013; 5: 184-189.
100. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 252 с.
101. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020 Лікарські засоби. Належна виробнича практика.
102. Інструкція з використання дезінфікуючого засобу «VASEPT forte» [Електронний ресурс]. Режим доступу: [file:///C:/Users/LENOVO/Downloads/Інструкція%20з%20використання%20VASEPT%20forte%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/LENOVO/Downloads/Інструкція%20з%20використання%20VASEPT%20forte%20(2).pdf)
103. Дезекон [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uk.interdez.com.ua/product/dezekon-unvcpd>
104. Виндез ЧАС-С 1л Дезинфекция поверхностей и ИМН [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/p657394633-vindez-chas-dezinfektsiya.html>
105. САНІКОН [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uk.interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-sanikon-interdez-kiev>
106. Электронный промышленный дозатор воды и жидкостей Serv_W21 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/p491625353-elektronnyj-promyshlennyj-dozator.html>
107. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В. Карлаш – К: НУХТ, 2013. – 143 с.

108. Методичні рекомендації щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів. Наказ N 502 від 14.12.2001. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0502282-01#Text>
109. Промышленные ферментеры [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus/promyishlennyye-fermenteryi.html>
110. Приточная установка Systemair TLP 200/5.0 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bioclimat.com.ua/p549549991-pritochnaya-ustanovka-systemair.html>
111. Компрессоры серии DPR-D с прямым приводом [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/kompresory-seriyi-dpr-d-z-pryamym-pryvodom>
112. Водяной нагреватель НКВ 125-2 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/p531045258-vodyanoj-nagrevatel-nkv.html?prosale=&utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=pla_stroitelstvo&utm_term=%7Bkeyword%7D&gclid=Cj0KCQjwpfHzBRCiARIsAHHzyZoQOIzBLFNMTlnz8UgYz176kE_Kax6PNaASC-T7oOCCKoPm5aW9uIaAkrHEALw_wcB
113. Ресивер Р 35.294.01 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://provent.com.ua/product/resiver-r-3529401/>
114. Охладитель воздуха Salda AVA 200 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vencon.ua/products/kruglyj-vodyanoj-ohladitel-salda-ava-200>
115. Карманный фильтр ФЯК F9 592x490x600-8 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://asfilter.com.ua/catalog/karmannyye-filtry/karmannyy-filtr-592kh490kh600-8-f9/>

- 116.Весовой дозатор для сыпучих продуктов VD1-V8 (0,2-400 kg) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/p412586071-vesovoj-dozator-dlya.html>
- 117.Мерник технический [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/p873581768-mernik-tehnicheskij-500l.html>
- 118.Реакторы JUCHHEIM cocoon — прочность как у стали, коррозионная стойкость как у стекла [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.millab.ru/about/news/production_news/view/391-reaktory-juchheim-cocoon-prochnost-kak-u-stali-korrozionnaya-stoykost-kak-u-stekla/
- 119.Фильтр Д аэрозольный [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://ukrvent.ua/filtr_d.html
- 120.BIOSTAT D-DCU [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.sartogsm.ru/biostat_d50_d100.html
- 121.Мобильный реактор объемом 30л [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://promvit.com.ua/mobilnyj-reaktor-obemom-30l-iz-stali-304l-s-nagrevom-i-otkidnoj-kryshkoj/>
- 122.Аппарат СЭРН-160 литров, Реактор эмалированный 160 литров [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://bigl.ua/p6490752-apparat-sern-160>
- 123.Реактор объемом 20 л [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://promvit.com.ua/reaktor-obemom-20-l-2-e-telezhki-i-3-i-stola-iz-nzh-stali/>
- 124.Промышленный ферментер BIORUS 1000 L [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://bio-rus.ru/primeryi-speczifikaczij/promyishlennyij-fermenter-biorus-1000-l-dlya-veterinarii.html>
- 125.Реактор эмалированный, 400 литров, 630 литров, реактор из нержавеющей стали 0,63м³ [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/p6490813-reaktor-emalirovannyj-400.html>

126. Реактор объемом 100 л [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://promvit.com.ua/reaktor-obemom-100-l-2-e-telezhki-i-3-i-stola-iz-nzh-stali/>
127. Промышленные биореакторы от компании Biorus [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus/promyishlennyye-bioreaktoryi.html>
128. Вихревые насосы DAB KPS, DAB KPF, DAB KP [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.dabpump.com.ua/tsentrobeznyie-nasosy/90-dab-kps-dab-kpf-dab-kp.html>
129. Шульга Н.М., Бовкун А.О., Млечко Л.А. Мікроскопіювання у санітарно-мікробіологічному контролі виробництва молочних продуктів. Навчальний посібник. - К.: ІПДО НУХТ, 2008. – 49 с.
130. *E. coli* bacteria, light microscopy [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.sciencephoto.com/media/666823/view/e-coli-bacteria-light-microscopy>
131. Nduko J.M., Matsumoto K., Ooi T., Taguchi S. Effectiveness of xylose utilization for high yield production of lactate-enriched P(lactate-co-3-hydroxybutyrate) using a lactate-overproducing strain of *Escherichia coli* and an evolved lactate-polymerizing enzyme. *Metab Eng.* 2013; 15:159-66. doi: 10.1016/j.ymben.2012.11.007
132. Yamada M., Matsumoto K., Nakai T., & Taguchi, S. Microbial Production of Lactate-Enriched Poly[(R)-lactate-co-(R)-3-hydroxybutyrate] with Novel Thermal Properties. *Biomacromolecules.* 2009; 10(4): 677–681.
133. Jung Y. K., Lee S.Y. Efficient production of polylactic acid and its copolymers by metabolically engineered *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 2011; 151(1):94-101.
134. Matsumoto K., Okei T., Honma I., et al. Efficient (R)-3-hydroxybutyrate production using acetyl CoA-regenerating pathway catalyzed by coenzyme

- A transferase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012; 97(1): 205–210.
135. Ooi May Foong, Mazlan N., Foo Hooi Ling, et al. Effects of carbon and nitrogen sources on bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* I-UL4. *Malaysian Journal of Microbiology*. 2015; 11 (2): 176-184.
136. Ruan L., Wang Y., Yan Q., & Yu P. H. Microcalorimetric studies on the polyhydroxyalkanoates production of recombinant *Escherichia Coli*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2006; 42(3): 270–273.
137. ОФС.1.2.3.0011.15 Определение азота в органических соединениях методом Кьельдаля [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-3-0011-15-opredelenie-azota-v-organicheskikh-soedineniyah-metodom-keldalya/>
138. Анализаторы азота Kjellec System моделей 1030, 2300, 2400, 8400, 8420, 8460. Руководство по эксплуатации.
139. Весовой дозатор для сыпучих продуктов VD1-V8 (0,2-40 kg) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/p412586071-vesovoj-dozator-dlya.html>
140. Фильтр Д аэрозольный [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://ukrvent.ua/filtr_d.html
141. Реактор 250 л [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://promvit.com.ua/reaktor-250-l/>
142. Электронный промышленный дозатор воды и жидкостей Serv_W21 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/p491625353-elektronnyj-promyshlennyj-dozator.html>
143. Насосы высокого давления серии FPSH [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://ascopumps.com.ua/pumps/peristalticheskie/serii_fpsh.html
144. Промышленный сепаратор для биотехнологии MBPX 810H [Электронный ресурс]. Режим доступа:

<https://biotechno.ru/chem/promyshlennyye-separatory/promyshlennyy-separator-dlya-biotekhnologii-mbpx-810h/>

145. Реактор эмалированный, 400 литров, 630 литров, реактор из нержавеющей стали 0,63м³ [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/p6490813-reaktor-emalirovannyj-400.html>
146. Вихревые насосы DAB KPS, DAB KPF, DAB KP [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.dabpump.com.ua/tsentrobezhnnye-nasosy/90-dab-kps-dab-kpf-dab-kp.html>
147. Реактор 500 л [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://odessa.flagma.ua/reaktor-nerzhaveyushchiy-reaktor-nerzhaveyka-vse-o8271223.html>
148. Вакуумна сушарка лопатева 1800 літрів [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/ua/p1360490482-vakuumnaya-sushilka-lopastnaya.html?&primelead=MC43NQ>
149. Фасовочный автомат с весовым дозатором АФ-50(8)-В [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://packtech.com.ua/oborudovanie/fasovochnoe/avtomaty-serii-mastadont/af-8-v>
150. Киселев Е. Г., Демиденко А. В. Сравнительное исследование методов экстракции полигидроксиалканоатов из биомассы бактерий. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*. 2014; 7 (2): 148-160.
151. Braunegg G., Sonnleitner B., Lafferty R.M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-b-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 1978; 6: 29–37.
152. Vostrejs P., Adamcová D., Vaverková M. D., Enev V., Kalina M., et al. Active biodegradable packaging films modified with grape seeds lignin. *RSC Advances*. 2020; 10(49): 29202–29213.

153. Kalacheva G.S., Volova T.G. fatty acid composition of wautersia eutropha lipids under conditions of active polyhydroxyalkanoates synthesis. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2007; 76 (5): 535-540.
154. Ostberg TKS 300 A [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://bioclimat.com.ua/p549549035-ostberg-tks-300.html>
155. Карманный фильтр ФЯК F9 592x490x600-8 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://asfilter.com.ua/catalog/karmannyye-filtry/karmannyu-filtr-592kh490kh600-8-f9/>
156. Охладитель воздуха Salda AVA 200 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://vencon.ua/products/kruglyj-vodyanoj-ohladitel-salda-ava-200>
157. Водяной нагреватель НКВ 125-2 [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://prom.ua/p531045258-vodyanoj-nagrevatel-nkv.html?prosale=&utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=pla_stroitelstvo&utm_term=%7Bkeyword%7D&gclid=Cj0KCQjwpfHzBRCiARIsAHHzyZoQOIzBLFNMTlnz8UgYz176kE_Kax6PNaASC-T7oOCCKoPm5aW9uIaAkrHEALw_wcB
158. Instruction Manual Extruder Sensor Rheomex 252/254 [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.nmt.edu/academics/mtls/faculty/mccooy/docs/haake/rheomex_252_e.pdf
159. Yxly Plastic Sheet Casting Extruder, Plastic PP Sheet Extruder to Make Sheet Tape Casting Machine, PP/PS/PE Sheet Casting Machine, Cast Extruding Machine [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://yongxujx.en.made-in-china.com/product/TXdnhvNcbJRp/China-Yxly-Plastic-Sheet-Casting-Extruder-Plastic-PP-Sheet-Extruder-to-Make-Sheet-Tape-Casting-Machine-PP-PS-PE-Sheet-Casting-Machine-Cast-Extruding-Machine.html>

160. Автомат для упаковки рулонов в термоусадочную пленку [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/p12892391-avtomat-dlya-upakovki.html>

ДОДАТКИ

1. Черепанський В.В., Грегірчак Н.М. Аналіз методів синтезу полілактату // Матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті", 15–16 квітня 2021 р. – К.: НУХТ, 2021 р. – Ч.1. – 422 с.

Додаток 1

Міністерство освіти і науки України

Національний університет харчових технологій

87

**Міжнародна наукова
конференція молодих учених,
аспірантів і студентів**

**"Наукові здобутки молоді –
вирішенню проблем
харчування людства у ХХІ
столітті"**

15–16 квітня 2021 р.

Частина 1

Київ НУХТ 2021

Section 12

Biotechnology and microbiology

Chairperson – professor Tetiana Pyrog

Secretary – associate professor Oksana Skrotska

Секція 12

Біотехнологія і мікробіологія

Голова - професор Тетяна Пирог

Секретар – доцент Оксана Скроцька

44. Аналіз методів синтезу полілактату

Вячеслав Черепанський, Наталія Грегірчак
Національний університет харчових технологій

Вступ. Наразі одним із перспективних матеріалів для виготовлення упаковки є полілактат. Процес отримання полілактату передбачає проведення полімеризації молочної кислоти, тому вибір методу його проведення є достатньо важливим [1].

Матеріали і методи. Полімеризація молочної кислоти може проводитись двома методами: хімічним та власне під час культивування мікроорганізмів (бродиння) [2]. Проаналізовано характеристики кожного з методів та обрано найбільш ефективний.

Результати. Полілактат – це здатний до біологічного розкладу біосумісний термопластичний аліфатичний поліефір, мономером якого є молочна кислота [1].

Хімічним методом поліконденсації молочної кислоти можна отримувати тільки низькомолекулярний полілактид, оскільки в процесі виділяється побічний продукт – вода, відвести яку з реакційної суміші складно, і тому високополімерний ланцюг руйнується. Одержаний низькомолекулярний полілактид деполімеризують до димера молочної кислоти, а потім до лактиду. Далі лактид полімеризують при високій температурі з додаванням каталізатора октаноату олова, отримуючи високомолекулярний полілактид.

Інший метод передбачає проведення процесу бродиння за участі генетично модифікованих мікроорганізмів. Генетичні зміни проводять з метою появи здатності мікроорганізмів синтезувати ферменти, які необхідні для одноетапного синтезу полілактиду [3]. Узагальнююча порівняльна характеристика обох методів отримання полілактату наведена в табл.

Таблиця. Порівняння методів отримання полілактату

Характеристика процесу	Хімічний метод	Метод бродиння
Сировина для синтезу	Використовуються нафтохімічні ресурси	Використовуються відновлювані ресурси
Оптична чистота синтезованої молочної кислоти	Утворюється рацемічна суміш як D (-), так і L (+) молочної кислоти	Утворюється лише одна оптично чиста форму D (-) або L (+) молочної кислоти
Кількість етапів синтезу	2-3 етапи	Одноетапний процес
Вартість проведення синтезу	Висока	Низька

Висновок. Отже, можна зробити висновок, що найбільш доцільно проводити синтез полілактату саме методом бродиння, адже він є ефективнішим, екологічнішим, має низьку вартість, та проводиться в один етап.

Література

1. Choi S.Y., Cho I.J., Lee Y., et al. (2019), Biocatalytic synthesis of polylactate and its copolymers by engineered microorganisms. *Methods Enzymol*, 627, p. 125-162.
2. Riaz S., Fatima N., Rasheed A., et al. (2018), Metabolic Engineered Biocatalyst: A Solution for PLA Based Problems. *International Journal of Biomaterials*. p. 1–9.
3. Castro-Aguirre E., Iniguez-Franco F., Samsudin H., et al. (2016), Poly (lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 107, p. 333–366.