

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” грудня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КОЗЛОВОЇ Валерії Андріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus ruber*

керівник роботи ПИРОГ Тетяна Павлівна, д.б.н., проф.,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28.11.2025 року № 957к

2. Строк подання здобувачем роботи 30.01.2026 р.

3. Вихідні дані до роботи Цільовий продукт біосинтезу – поверхнево-активні речовини. Біологічний агент - *Rhodococcus ruber* МР4. Об'єм ферментера для виробництва поверхнево-активних речовин – 1 м³, коефіцієнт заповнення складає - 0,6.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Реферат, Вступ, РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту, РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента, РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування, РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми, РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання, РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus ruber* МР4, РОЗДІЛ 7. Основні етапи виділення та очищення поверхнево-активних речовин, РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) Технологічна схема біосинтезу поверхнево-активних речовин на 2 аркушах формату А1. Апаратурна схема біосинтезу поверхнево-активних речовин на 1 аркуші формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання _____ « 01 » грудня 2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. Характеристика цільового продукту	01.12.2025-08.12.2025	
2	Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	09.12.2025-15.12.2025	
3	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування	16.12.2025-20.12.2025	
4	Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	23.12.2025-27.12.2025	
5	Розділ 5. Специфікація обладнання	29.12.2026-01.01.2026	
6	Розділ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus ruber</i> MP4	02.01.2026-06.01.2026	
7	Розділ 7. Основні етапи виділення та очищення поверхнево-активних речовин	08.01.2026-11.01.2026	
8	Розділ 8. Контроль виробництва	12.01.2026-14.01.2026	
9	Оформлення графічної частини	14.01.2026-16.01.2026	
10	Оформлення списку літературних джерел	17.01.2026-18.01.2026	
11	Оформлення вступу та реферату	19.01.2026-22.01.2026	
12	Оформлення презентації	23.01.2026-25.01.2026	
14	Оформлення пояснювальної записки	26.01.2026-30.01.2026	

Здобувач _____
(підпис)

Валерія КОЗЛОВА
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Тетяна ПИРОГ
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) із використанням бактерій з роду *Rhodococcus*. На основі порівняння показників синтезу ПАР та розрахунку вартості поживних середовищ для культивування штаму *Rhodococcus ruber* МР4, який синтезує 6,7 г/л поверхнево-активних речовин зі швидкістю їх синтезу 0,04 г/год. Пропонується замінити синтетичні ПАР на мікробні ПАР у миючих засобах для очищення олійних резервуарів. Згідно даних компанії Kernel за фінансовий рік 2024, щодо обсягу переробленої олії розрахована потужність виробництва з урахуванням покриття 1% від загальної потреби становить 182.2 кг ПАР за рік (34 м³ культуральної рідини з врахуванням втрат при виділенні 20%).

Технологія виробництва ПАР включає допоміжні й основні етапи виробництва. До допоміжних робіт належить: підготовка аераційного повітря, приготування розчинів кислот і лугу, а саме 6% розчинів HCl та NaOH; приготування та стерилізації запасного розчину мікроелементів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках та в інокуляторі об'ємом 10 л; підготовка і стерилізація поживних середовищ. До основних етапів технологічного процесу відноситься підготовка посівного матеріалу, в яку входить три стадії вирощування культури (у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 10, 100 л) та біосинтез ПАР у ферментері об'ємом 1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Розроблено карту постадійного контролю доферментаційних процесів і виробничого біосинтезу та зазначено методики контролю концентрації біомаси, цільового продукту (поверхнево-активних речовин), джерела карбону (глюкози) та азоту (нітрат амонію).

Дипломний проєкт викладений на 78 сторінках, містить 12 таблиць, 6 рисунків, складається зі вступу, восьми розділів, списку використаної літератури (49 найменувань), технологічної (формат А1, 2 аркуші) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем.

Ключові слова: *Rhodococcus ruber* МР4, трегалозоліпіди, культивування, мийні засоби, перероблена олія.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological and hardware schemes for the biosynthesis of surfactants (PAR) using bacteria of the genus *Rhodococcus*. Based on the comparison of surfactant synthesis indicators and the calculation of the cost of nutrient media for the cultivation of the *Rhodococcus ruber* MP4 strain, which synthesizes 6.7 g/l of surfactants with a synthesis rate of 0.04 g/h. It is proposed to replace synthetic surfactants with microbial surfactants in detergents cleaning for vegetable oil tanks. According to Kernel data for the fiscal year 2024, the calculated production capacity for the volume of processed oil is 182.2 kg of surfactant per year (34 m³ of culture liquid, taking into account losses during separation of 20%).

The technology for the production of surfactants includes auxiliary and main production stages. Auxiliary work includes: preparation of aeration air, preparation of acid and alkali solutions, namely 6% HCl and NaOH solutions; preparation and sterilization of a spare solution of trace elements for growing inoculum in flasks on stirrers and in a 10-liter inoculator; preparation and sterilization of nutrient media. The main stages of the technological process include preparation of seed material, which includes three stages of culture growth (in flasks on stirrers, in inoculators with a volume of 10, 100 liters) and biosynthesis of surfactants in a fermenter with a volume of 1 m³ with a filling factor of 0.6.

A map of stage-by-stage control of pre-fermentation processes and production biosynthesis has been developed and methods for controlling the concentration of biomass, the target product (surfactants), carbon sources (glucose) and nitrogen (ammonium nitrate) have been specified.

The diploma project is presented on 78 pages, contains 12 tables, 6 figures, consists of an introduction, eight chapters, a list of used literature (49 titles), technological (format A1, 2 sheets) and hardware (format A1, 1 sheet) schemes.

Keywords: *Rhodococcus ruber* MP4, trehalozolipids, cultivation, detergents, recycled oil.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	10
1.1. Шляхи біосинтезу трегалозоміколатів	10
1.2. Вплив зовнішніх факторів на синтез трегалозоліпідів	11
1.3. Практичне використання трегалозоліпідів	13
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	16
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	26
3.1. Потреба у поверхнево-активних речовинах	27
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	30
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	31
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	32
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	34
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	34
4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря	36
4.3. Обґрунтування способу підготовки і стерилізації поживного середовища для культивування <i>Rhodococcus ruber</i> МР ₄	37
4.3.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	40
4.3.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах	41
4.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м ³	43

4.4. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для регуляції рН у процесі біосинтезу цільового продукту	44
4.5. Обґрунтування вибору піногасника	44
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	46
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>RHODOCOCCUS RUBER</i> МР ₄	50
РОЗДІЛ 7. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН	58
7.1. Обґрунтування методів виділення поверхнево-активних речовин	58
7.2. Обґрунтування методів очищення поверхнево-активних речовин	60
7.3. Обґрунтування стадій виділення та очищення поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus ruber</i> МР ₄	62
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	66
8.1. Мікробіологічний контроль.....	66
8.1.1. Висів на агаризовані поживні середовища	67
8.1.2. Мікроскопіювання.....	69
8.2. Показники росту і синтезу поверхнево-активних речовин.....	70
8.2.1. Визначення концентрації біомаси	70
8.2.2. Визначення концентрації поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus ruber</i> МР ₄	70
8.2.3. Визначення концентрації джерела Карбону (глюкоза) у середовищі	71
8.2.4. Визначення концентрації джерела Нітрогену (нітрат) у середовищі.....	71
8.2.5. Визначення концентрації джерела Нітрогену (амоній) у середовищі.....	72
ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА	73

ВСТУП

За сучасних умов розвитку промисловості проблема забруднення довкілля залишками олій, нафтовими вуглеводнями та іншими органічними сполуками стає все більш актуальною. Значна кількість виробничих процесів у хімічній, харчовій та нафтопереробній галузях супроводжується утворенням стійких органічних відходів, що потрапляють у воду, ґрунт і накопичуються в навколишньому середовищі. Такі сполуки є токсичними для живих організмів і важко піддаються біодеградації [1, 2]. Особливо гостро це питання постає для підприємств з переробки та зберігання рослинних олій, де необхідне регулярне очищення резервуарів, трубопроводів і технологічного обладнання від жирових і білкових залишків.

Зростаюча екологічна стурбованість у поєднанні з новими законами про контроль навколишнього середовища призвела до пошуку більш стійких альтернатив для заміни існуючих поверхнево-активних речовин [3]. Це створює потребу в розробці ефективних та екологічно безпечних методів біоремедіації, які б забезпечували очищення довкілля. В результаті, одним з найбільш інноваційних сфер розвитку цієї галузі є застосування мікробних поверхнево-активних речовин.

Превага мікробних ПАР порівняно над синтетичними ПАР, полягає через те, що вони є біологічними метаболітами, які синтезуються живими мікроорганізмами без потреби в органічному синтезі. Вони переважають нижчою токсичністю, високою біорозкладністю, екологічною безпечністю навіть при високих концентраціях і стійкістю до екстремальних умов середовища. Натомість синтетичні ПАР виробляються шляхом хімічного синтезу з непоновлюваних джерел, часто є токсичними, погано розкладаються в природі й можуть накопичуватися в екосистемах, завдаючи шкоди довкіллю [4,7]. Проте, завдяки нижчій вартості виробництва, синтетичні ПАР займають лідируючі позиції в промисловості. У той час для мікробних ПАР основними перешкодами для широкомасштабного впрова-

					НУХТ БТЕК 05.01.05 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Козлова В.А.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Пирог Т.П</i>					8	78
<i>Реценз.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						
					8			

дження на ринок є вища вартість через складність біотехнологічного процесу виробництва, але попри це, вони активно досліджуються як екологічно чиста альтернатива синтетичним речовинам [4,5].

Крім цього, мікробні поверхнево-активні речовини здатні ефективно знижувати поверхневий та міжфазний натяг, що значно полегшує розчинення й диспергування гідрофобних забруднювачів. Завдяки здатності стабілізувати або, навпаки, руйнувати емульсії, мікробні ПАР виступають універсальними засобами для процесів очищення [6,7].

Серед представників роду *Rhodococcus* вирізняється штам *Rhodococcus ruber* MP4, котрий синтезує ПАР на широкому спектрі вуглецевих субстратів (як гідрофільних, так і гідрофобних). Така здатність робить його надзвичайно перспективним для одержання екологічно безпечних поверхнево-активних речовин з метою їх використання для видалення олійних залишків та нафтових забруднень [1].

Новизна дослідження полягає у використанні штаму *Rhodococcus ruber* MP4, який демонструє високу здатність до активного продукування поверхнево-активних речовин. Встановлено, що концентрація отриманих ПАР досягає 6,7 г/л, що вважається достатньо високим показником серед представників цього роду. Даний рівень продуктивності вказує на перспективний біотехнологічний потенціал штаму *R. ruber* MP4 та підкреслює доцільність його використання у промислових процесах отримання мікробних ПАР [1].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Завдяки культивуванню бактерій *Rhodococcus ruber* МР4 відбувається отримання поверхнево-активних речовин (ПАР), а саме трегалозоліпідів.

1.1. Шляхи біосинтезу трегалозоміколатів

Біосинтез трегалозоліпідів у бактерій *Rhodococcus* здійснюється шляхом естерифікації молекули трегалози довголанцюговими жирними кислотами або міколовими кислотами, цей процес відбувається у два поступові етапи.

На початковому етапі здійснюється синтез як гідрофільної, так і гідрофобної частин.

Гідрофільна складова — трегалоза формується в результаті метаболізму глюкози, в якому декілька послідовних ферментативних перетворень об'єднують два залишки D-глюкози із специфічним α, α -1,1-глікозидним зв'язком. Саме ця будова забезпечує стійкість трегалози до суворих умов, як високі температури або агресивні розчинники[8,9].

Гідрофобна частина представлена однією або двома довголанцюговими жирними кислотами або міколовими кислотами, що робить молекулу ліпофільною. Їх синтез регулюється ферментами системи синтази жирних кислот типу II (FAS-II), зокрема еноїл-ацилпереносною протеїнредуктазою (InhA), яка відповідає за подовження ланцюгів жирних кислот. Ці кислоти міцно фіксують трегалозоліпідів на поверхні клітини або у середовищі, де потрібно знизити поверхневу напругу [8].

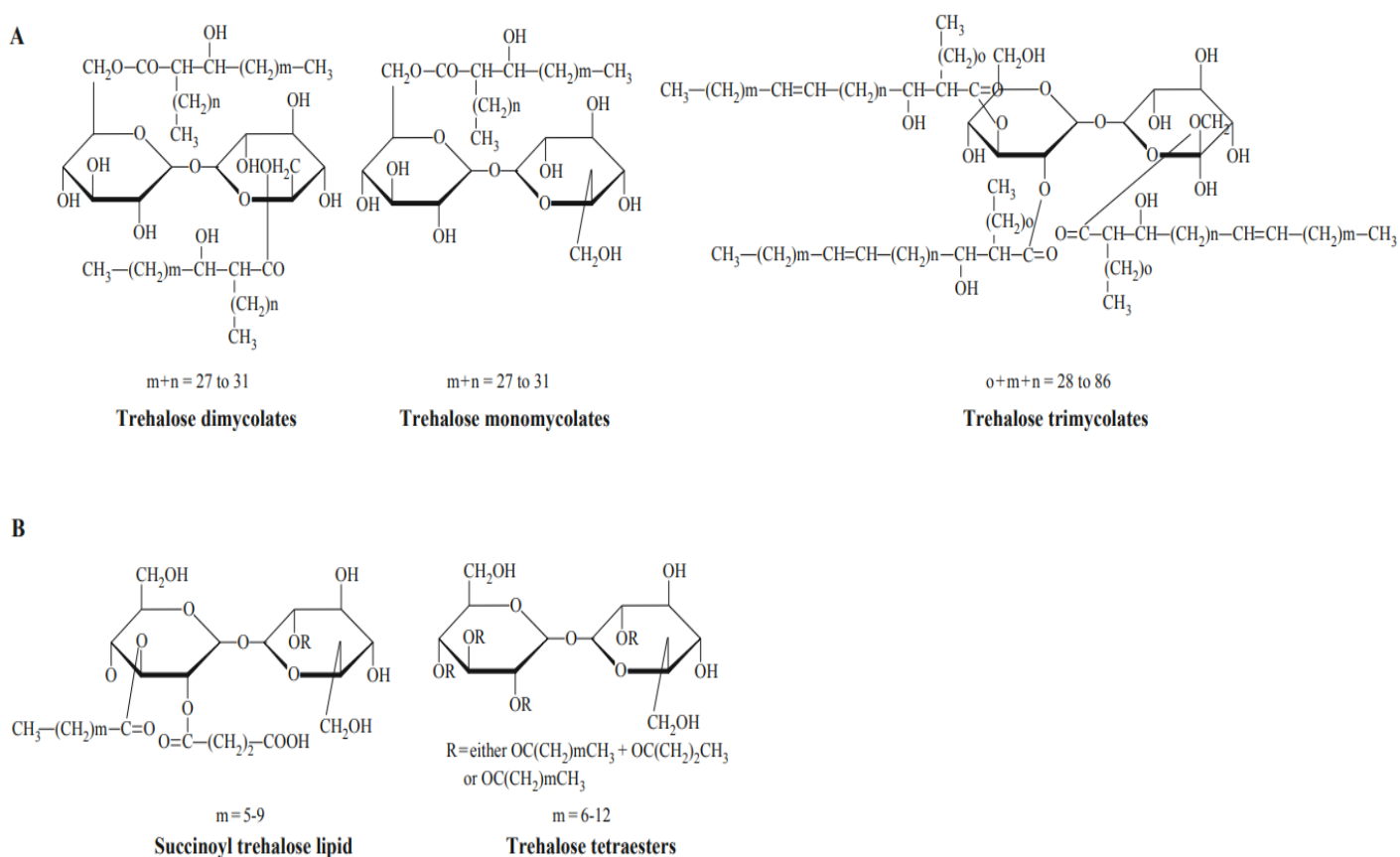
Другий етап включає естерифікацію, де трегалоза у цитоплазмі клітини сполучається з однією або двома молекулами міколових кислот, утворюючи складноєфірні зв'язки, що приводить до формування трегалоза-мономіколатів (ТММ) або трегалоза-диміколатів (ТДМ), залежно від кількості приєднаних кислотних залишків [8].

У своїй природній формі трегалозоліпідів можуть бути моноацильованими, діацильованими, триацильованими або тетраацильованими, що впливає на їх гідро-

					НУХТ БТЕК 05.01.05 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Козлова В.А.</i>				<i>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Пирог Т.П</i>						10	78
<i>Реценз.</i>						10		
<i>Н. Контр.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

фобність і біологічну активність. Кожний додатковий ацильний залишок змінює їх здатність до емульгування, поверхневу активність та біологічну взаємодію. Ці форми відрізняються не лише кількістю жирних кислот, а й довжиною та насиченістю ліпідних ланцюгів, які можуть варіювати залежно від складу живильного середовища, температури культивування та виду субстрату [9].

Також можуть утворюватися сукцинільовані форми трегалозоліпідів, які надають молекулі негативного заряду, підвищуючи її розчинність у воді та змінюючи взаємодію з клітинними мембранами, що розширює спектр їх біоактивності (рисунок) [9].



Хімічні структури трегалозоліпідів, синтезованих бакетріями роду *Rhodococcus*. (A) — неіонні трегалозоліпіди, (B) — аніонні трегалозоліпіди [9]

1.2. Вплив зовнішніх факторів на синтез трегалозоліпідів

Біосинтез трегалозоліпідів бактеріями роду *Rhodococcus* є процесом, який чутливо реагує на зовнішні умови культивування. Це процес, що активується певними

типами стресів або специфічними особливостями живильного середовища, що забезпечує оптимальне виробництво ПАР [8].

Крім цього, створення ідеального середовища культивування, а саме концентрація субстрату, концентрація та природа джерела азоту, ступінь аерації дозволяє суттєво збільшити рівень синтезу ПАР в декілька. Зазначу, що концентрація ПАР, продукованими певними представниками роду *Rhodococcus* на вуглеводнях навіть без оптимізації умов культивування та вдосконалення штамів є досить високою [10].

Одним із ключових чинників, що зумовлює продуктивність трегалозоліпідів, є природа вуглецевого джерела.

Бактерії, зокрема *Rhodococcus erythropolis* і *Rhodococcus opacus*, активно продукують трегалозоліпіді при використанні важкорозчинних у воді речовин, як нафтопродукти; n-алкани середньої і довгої довжини, наприклад, гексан, декадекан; парафінові вуглеводні. Причиною цього є необхідність для клітини пристосувати свою поверхню до гідрофобного середовища, підвищуючи її гідрофобність за допомогою трегалозоліпідів [8].

Можливий синтез ПАР на рафінованих і відпрацьованих оліях, але інформація про рід *Rhodococcus*, які ростуть на таких субстратах, є нечисельною [10].

Синтез поверхнево-активних речовин бактеріями роду *Rhodococcus* є також слушним на змішаних субстратах. При цьому концентрація ПАР вища, ніж при застосуванні гідрофобних або гідрофільних моносубстратів [10].

Крім цього, деякі штами, зокрема *Rhodococcus ruber*, здатні синтезувати трегалозоліпіді на розчинних субстратах, таких як гліцерин, глюкоза, етанол.

У таких випадках спостерігалася різниця у локалізації ПАР: наприклад, при культивуванні на розчинних джерелах вуглецю бактерії часто продукують екстраклітинні форми трегалозоліпідів, тоді як при використанні гідрофобних субстратів переважно клітинно-зв'язані форми [8].

Рівень продукування ПАР штамми *Rhodococcus* при культивуванні на розчинних середовищах менший, ніж за наявності важкорозчинних сполук на кшталт вуглеводнів та олійних субстратів. Бо такі субстрати, окрім технічного гліцерину,

характеризуються високою вартістю, їхнє застосування є економічно невиправданим для масового виробництва ПАР. А ось застосування відходів біодизельного виробництва для біосинтезу ПАР дозволяє ліквідувати токсичні відходи, а отже, й збільшує рентабельність виробництва біодизеля, а також знижує ціни поверхнево-активних речовин [10].

Другим чинником для синтезу трегалозоліпідів є обмеження джерел азоту у середовищі. При нестачі азоту відбувається збільшення синтезу аніонних трегалозоліпідів, що змінює їх поверхневу активність і допомагає клітинам ефективніше захоплювати обмежені ресурси з навколишнього середовища [8,9].

Третім чинником є стадія росту бактерій. Найбільш інтенсивний синтез трегалозоліпідів спостерігається на стадії стаціонарного росту, коли клітини припиняють активне ділення через виснаження поживних речовин або накопичення токсичних метаболітів [8].

1.3. Практичне використання трегалозоліпідів

Трегалозоліпіди, синтезовані представниками роду *Rhodococcus*, є багатофункціональними з широким спектром застосувань, що охоплює екологічну біотехнологію, харчову та косметичну промисловість, а також біомедицину [8].

Комерційний інтерес до бактерій роду *Rhodococcus* пояснюється їхніми унікальними метаболічними властивостями. Зокрема, вони демонструють здатність розщеплювати велику кількість ксенобіотиків, причому цей процес часто супроводжується утворенням гліколіпідних ПАР [10].

Трегалозоліпіди ефективно діють як емульгатори, помітно зменшуючи поверхневий натяг між водою та гідрофобними середовищами. Це полегшує доступ до гідрофобних забрудників, як-от нафтопродукти або олійні залишки для мікроорганізмів-деструкторів. Ці властивості роблять їх надзвичайно корисними у боротьбі з нафтовими або олійними розливами та в системах очищення ґрунтів і морських вод від органічних токсинів [8,9].

У нафтовидобутку трегалозоліпіди використовуються як агенти, що мобілізують залишки нафти, яку неможливо вилучити традиційними способами. Їх

здатність емульгувати нафтопродукти сприяє збільшенню рухливості нафти в пористих середовищах, зменшуючи витрати на видобуток та усунути шкідливий вплив на довкілля [9].

Трегалозоліпіди використовуються як природні емульгатори, піноутворювачі та вологоутримуючі агенти в косметичних продуктах, наприклад, в кремах, мило, шампунь [9,11].

Вони характеризуються високою стійкістю до перепадів температури та зміни рН, що дає змогу використовувати їх у продуктах із тривалим терміном придатності та в більш агресивних умовах, не втрачаючи функціональності [9, 11].

Деякі види трегалозоліпідів, зокрема трегалозодиміколати, відомі здатністю активувати макрофаги, ключові клітини імунної відповіді. Це робить їх перспективними кандидатами для створення імунотерапевтичних препаратів [8,9].

У деяких експериментах трегалозоліпіди спричиняють апоптоз ракових клітин, зберігаючи при цьому низьку цитотоксичність щодо здорових клітин. Цей ефект вивчається в контексті розробки нових протипухлинних препаратів [9,11].

Важливою перевагою трегалозоліпідів є їх надзвичайно низька токсичність. У порівняльних дослідженнях виявлено, що трегалозоліпіди з *Rhodococcus ruber* у 100–1000 разів менш токсичні, ніж синтетичні сурфактанти (наприклад, Inipol EAP22, Corexit 9597 або Finasol OSR-5) і в 13 разів безпечніші, ніж біологічні рамноліпіди *Pseudomonas aeruginosa* [8].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

Поверхнево-активні речовини (ПАР) стають все більш популярними в широкому діапазоні застосувань. Вони мають кілька важливих властивостей для промисловості, таких як зниження в'язкості сирової нафти, емульгування, піноутворення, змочування, розділення фаз та очищення [12]. Біологічні сполуки з поверхнево-активною активністю можна загалом класифікувати на низькомолекулярні (гліколіпіди, ліпопептиди та фосфоліпіди) і високомолекулярні (полісахариди, білки, ліпопротеїни або полімерні сполуки) речовини, перший вважається фактичними ПАР, а другий зазвичай описуються як біоемульгатори. Вони мають ряд переваг в порівнянні з хімічними поверхнево-активними речовинами, включаючи здатність до біологічного розкладання, нижчої критичної концентрації міцели, зниженої токсичності, більш високої стабільності та можливості виробництва з відновлюваної сировини [8].

Поверхнево активні речовини, синтезовані представниками роду *Rhodococcus* – це в основному клітинні гліколіпіди з родовою ланкою трегалози, широко відомі як трегалозоліпіди [13]. Вони знаходять широке застосування як емульгуючі сполуки із застосуванням при видобутку нафти з пластів і в протоколах біоремедіації нафтозабруднених ґрунтів. Крім того, трегалозоліпіди можуть потенційно використовуватись в медицині як противірусний, протимікробний, протипухлинний або імуномодулюючий фактор. Трегалозоліпіди в основному синтезуються організмами, використовуючи гідрофобні субстрати, такі як н-алкани, сирі та рослинні олії, однак їх виробництво також було при використанні розчинних субстратів [12].

Було ідентифіковано кілька видів продуцентів ПАР, що належать до роду *Rhodococcus*, такі як *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus fascians*, *Rhodococcus longus*, *Rhodococcus wratislaviensis*, *Rhodococcus equi*, *Rhodo-*

					НУХТ БТЕК 05.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Козлова В.А.			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пирог Т.П					15	78
Реценз.						15		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

coccus rhodochrous, *Rhodococcus opacus* та *Rhodococcus sp* [12].

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

З метою вибору найоптимальнішого біологічного агента, ми взяли декілька штамів роду *Rhodococcus*, а саме *Rhodococcus sp.* ADL36, *R. erythropolis* AQ5-07, *Rhodococcus sp.* SP1d та *R. ruber* MP₄.

Штам *R. erythropolis* AQ5-07, ґрунтова бактерія, раніше виділена з Острову Кінг-Джордж була перевірена на здатність асимілювати ріпакову олію та продукувати ПАР. Тобто для культивування ПАР в середовищі була присутня відпрацьована ріпакова олія. Олія канолі в основному використовується на дослідницьких станціях і, крім того, використовується в різних техніках приготування їжі. Штам *R. erythropolis* AQ5-07 також може розщеплювати фенол і дизельне паливо та має стійкість до важких металів. Тому загальна ціль – це розробка засобів для видалення масел, таких як рапсова олія, з навколишнього середовища та відходів «сірої» води з використанням біологічних підходів, оскільки термічний процес деградації нафти є дорогим і неефективним [14].

R. ruber MP₄ виділений із осадових відкладень Суммам Ваді для розщеплення вуглеводнів, тому що цей вододіл підлягає забрудненню органічними речовинами з різних джерел. Основними причинами органічного забруднення є неконтрольовані викиди промислових відходів, змащення мийних станцій, маслозаводів і несанкціонованих скидів. Сира нафта є одним з найважливіших органічних забруднювачів. Будучи складною сумішшю, він містить велику кількість хімічних речовини, які в основному складаються з чотирьох фракцій: насичені вуглеводні, ароматичні вуглеводні, смоли та асфальтени. Головним чином, ці останні сполуки зберігаються в навколишньому середовищі через їх низьку розчинність у воді та поглинання твердих частинок, які осідають у ґрунті та відкладах [1].

Штам *Rhodococcus sp.* ADL36 виділений із ґрунтів Антарктики, характеризується широкою катаболічною різноманітністю, високою стійкістю в умовах низького вмісту кисню та поживних речовин, в несприятливих умовах

навколишнього середовища, тому використовується для очищення нафтових вуглеводнів і гетероциклічних сполук. Як субстрат для синтезу ПАР використовували дизельне паливо [13].

Rhodococcus sp. SP1d - морський штам здатний продукувати поверхнево-активні речовини на відпрацьованих оліях, дизельному паливі, н-гексадекані. ПАР, синтезовані на дизелі і н-гексадекані є перспективними для біоремедіації забрудненого нафтою ґрунту. Крім того, очищені ПАР цього штаму здатні руйнувати біоплівку бактерій, що стимулюють ріст рослин *Pseudomonas protegens* MP12 [12].

Середовище для культивування штамів *R. erythropolis* AQ5-0 та *R. ruber* MP₄ містить дріжджовий екстракт, а як субстрат для вирощування *R. ruber* MP₄ використовують глюкозу. Крім цього, для культивування штамів *R. ruber* MP₄ та *Rhodococcus sp.* SP1d використовується середовища, до складу яких входять мікроелементи, у той час для культивування *Rhodococcus sp.* ADL36 та *R. erythropolis* AQ5-0 склад середовищ значно простіший.

Огляд біосинтезу мікробних ПАР, що використовуються з метою очищення олійних залишків та нафтових вуглеводнів наведено у табл. 2.1.

Дані табл. 2.1 показують, що вихід синтезованих поверхнево-активних речовин широко варіює залежно від продуцента, тривалості культивування та складу поживного середовища. Концентрація синтезованих ПАР у продуцентів сильно відрізняється, найбільшу кількість (6,7 г/л) утворює *R. ruber* MP₄, а найменшу (0,31-0,34 г/л) - *Rhodococcus sp.* ADL36. Тому по причині дуже низької концентрації синтезованих поверхнево-активних речовин штамом *Rhodococcus sp.* ADL36, надалі аналіз даних будемо проводити без цього штаму.

В ситуації, яка у нас склалась неможливо зробити точні висновки щодо підбору біологічного агента, наступним кроком є розрахунок вартості поживного середовища, необхідного для культивування обраних мікроорганізмів. (табл. 2.2).

Після проведення розрахунку вартості поживних середовищ, можна констатувати, що середовище для культивування *R. ruber* MP₄ дешевше в 3,7 рази відповідно до *Rhodococcus sp.* SP1d у якого джерело вуглецю – гексадекан, але дорожчий в 3,1 та 3,5 рази порівнюючи з *R. erythropolis* AQ5-07 та *Rhodococcus sp.*

SP1d у якого джерело вуглецю – дизель. Однак період культивування цих продуцентів дуже відрізняється. За тривалістю культивуванню *R. erythropolis* AQ5-07 є найоптимальнішим, але кількість синтезованих поверхнево-активних речовин є найменшою.

З метою остаточного вибору найефективнішого біологічного агента було здійснено обрахунок умовної вартості 1 г цільового продукту (табл. 2.3). Відомості представлені у табл. 2.3, вказують, що умовна вартість ПАР, синтезованих штамом для *R. ruber* MP₄, є найменшою і становить 0,31 грн/г, тоді як обсяг утворених ПАР за 1 год є одним з найвищих – 0,040 г/год.

На основі отриманих даних та проаналізованої інформації в табл. 2.2 і 2.3, можна зробити висновок, що серед розглянутих представників найперспективнішим для синтезу ПАР є *R. ruber* MP₄.

Біосинтез поверхнево-активних речовин бактеріями роду *Rhodococcus*

Біологічний агент	Склад середовища, г/л	Тривалість процесу, год	Концентрація ПАР, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Література
<i>Rhodococcus</i> sp. ADL36	Дизель – 1% (8,5 г/л) K ₂ HPO ₄ – 1 KH ₂ PO ₄ – 1 NH ₄ NO ₃ – 1 MgSO ₄ – 0,2 FeCl ₃ – 0,05 CaCl ₂ – 0,02	72	0,34 (екстракція метил-трет-бутиловим ефіром) 0,31 (екстракція сумішшю хлороформу і метанолу)	Культивування у колбі на 250 мл на качалці (150 об/хв), рН 7,0, 20°C	Habib S., Ahmad S.A., Wan Johari W.L., Abd Shukor M.Y., Alias S.A., Smykla J., Saruni N.H., Abdul Razak N.S., Yasid N.A. Production of Lipopeptide Biosurfactant by a Hydrocarbon-Degrading Antarctic <i>Rhodococcus</i> . <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 2020, 21(17):6138. doi: 10.3390/ijms21176138.
<i>Rhodococcus erythropolis</i> AQ5-07	Відпрацьована ріпакова олія – 3,5 % (об'ємна частка) Дріжджовий екстракт – 0,3 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 1 KH ₂ PO ₄ – 0,9 K ₂ HPO ₄ – 0,6 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,2	72	1,5	Культивування у колбах 250 мл із 100 мл середовища на качалці (150 об/хв), рН 7,5, 15°C	Ibrahim S., Abdul Khalil K., Zahri KNM., Gomez-Fuentes C., Convey P., Zulkharnain A., Sabri S., Alias S.A., González-Rocha G., Ahmad S.A. Biosurfactant Production and Growth Kinetics Studies of the Waste Canola Oil-Degrading Bacterium <i>Rhodococcus erythropolis</i> AQ5-07 from Antarctica. <i>Molecules</i> . 2020, 25(17):3878. doi: 10.3390/molecules25173878.
<i>Rhodococcus</i> sp. SP1d	Дизель - 1 % (об'ємна частка) або	240	н-Гексадекан - 2,38 Дизель – 1,86	Культивування у колбах з 25 мл середовища на качалці (200 об/хв), 27°C.	Andreolli M., Villanova V., Zanzoni S., D'Onofrio M., Vallini G., Secchi N., Lampis S. Characterization of trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine

	<p>н-Гексадекан - 1 % (об'ємна частка) NH_4NO_3 – 3 Na_2HPO_4 – 2,2 KH_2PO_4 – 0,8 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0147 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,00422 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,0027 ZnCl_2 – 0,000681 H_3BO_3 – 0,000618 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,00049 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,000242 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,000238</p>				strain <i>Rhodococcus sp.</i> SP1d and its potential for environmental applications. <i>Microb. Cell Fact.</i> 2023, 22(1):126. doi: 10.1186/s12934-023-02128-9.
<i>Rhodococcus ruber</i> MP4	<p>Глюкоза – 20 Дріжджовий екстракт – 0,1 NaCl – 30 Na_2HPO_4 – 3 KH_2PO_4 – 2 NH_4NO_3 – 1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,7 FeCl_3 – 0,03 CaCl_2 – 0,02 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,0005 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,0005</p>	168	6,7	Культивування у колбах 2 л з 500 мл середовища на качалці (150 об/хв), 30°C.	Yalaoui-Guellal D., Brahmi F., Touati A., De Champs C., Banat M.I., Madania K. Production of Biosurfactants by Hydrocarbons degrading bacteria isolated from Soummam watershed Sediments of Bejaia in Algeria. <i>Environ. Prog. Sustain. Energy.</i> 2017, 37(1):189-195. doi: 10.1002/ep.12653.

**Вартість поживних середовищ для культивування представників роду *Rhodococcus* -
продуцентів поверхнево-активних речовин**

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Rhodococcus erythropolis</i> AQ5-07	Відпрацьована ріпакова олія	3,5 % (об'ємна частка) – 32 г/л	6	0,19 (грн/л)	https://flagma.ua/uk/kuplyu-vikoristanu-oliyu-o7701324.html
	Дріжджовий екстракт	0,3	683	0,20	https://vianoksgel.ua/ua/p2429300269-drozhzhevoj-ekstrakt.html
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1	19,20	0,019	https://www.systopt.com.ua/item-amonij-sirchanokyslyj-sulfat-amoniyu?srsltid=AfmBOoq8i7G7oXAAi421p0nzZ8_Dxw7mw1Xxj0VQZpvv0VZB88EniuVD
	KH ₂ PO ₄	0,9	106	0,095	https://www.covalent.com.ua/shop/potassium_phosphate/
	K ₂ HPO ₄	0,6	150	0,09	https://novohim.com.ua/catalog/promislova-ximiya-j-sirovina/kalij-fosfornokislj-2-zamishhenij/
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	28	0,0056	https://growex.market/product/magniy-sulfat-7-vodniy?srsltid=AfmBOorZOeescgKjXKwtWR1_fJIQ4fL0FBST-TW5GIVLsNj-3ArvTvlg
	Вартість 1л середовища – 0,60 грн				
<i>Rhodococcus</i> sp. SP1d	Дизель	1 % (об'ємна частка) або 8 г/л	39	0,3 (грн/л)	https://agro-ukraine.com.ua/trade/m-1332227/prodazha-dizelnoe-toplivo-evro-5-dostavka-ot-3-kub-tsena-39-grn/

або Гексадекан	1 % (объемна частка) або 7,7 г/л	950	7,3 (грн/л)	http://metalab.com.ua/index.php?route=product/product&path=20_26_68&product_id=340
NH ₄ NO ₃	3	27	0,081	https://novohim.com.ua/catalog/dobriiva-mikroelementi-zaxist-roslin/amiachna-selitra-amonij-azotnokislij/?utm_medium=googleads&utm_source=mobile&utm_campaign=20894506254&utm_content&source=source_type&device=device_type&gad_source=1&gclid=CjwKCAiA5eC9BhAuEiwA3CKwQkgLr7QK3z2VKggexGe9XPoN-sP_6cKDaz-P8Wly-b2gnh4i4aM7RoCvB0QAvD_BwE
Na ₂ HPO ₄	2,2	99	0,21	https://chemsale.com.ua/ua/product/natrij-fosfornokislyj/
KH ₂ PO ₄	0,8	106	0,084	https://www.covalent.com.ua/shop/potassium_phosphate/
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,0147	42	0,00062	https://www.systopt.com.ua/item-kaltsij-hlorystyj-hloryd-kaltsiyu-2-vodnyj?srsltid=AfmBOorbrWBkKYapr-zRzTGnXRgSMgD4vnELJ1PdUZT0DqXArJG03PPQ
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,00422	58,60	0,000247	https://him-component.com.ua/ua/p594694116-marganets-sernokislyj-monogidrat.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAiOa9BhBqEiwABCdG8_y8uHpb58FhYiS9Yq6RadCtadc0F_1PBbdCfnTXftNU2kWywfEeyRoCJhwQAvD_BwE
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,0027	220,80	0,000596	https://shop.hlr.ua/ua/jelezo-hlornoe-6-vodn-ch-231832.html
ZnCl ₂	0,000681	97	0,000066	https://primehim.com.ua/index.php?route=product/product&path=20_&product_id=277&gclid=CjwKCAiA5eC9BhAuEiwA3CKwQkFdLmFnDlG SXOYbtmkgdm-zs5QiriIZgVe_mDh71Cp7T8d9NqqRtRoC-ScQAvD_BwE
H ₃ BO ₃	0,000618	72	0,000044	https://reaplust.com.ua/tetraborna?srsltid=AfmBOorwJkyr2VthDMJtUv2IOWu26VFOiW38C2P7L9KAed3c5v64dQd2

	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,00049	172	0,000084	https://mychem.in.ua/ua/p2243771199-mednyj-kuporos-sulfat.html?srsltid=AfmBOoqOFZwfeV4-SnPSdVFzKQ0y9OmIsG8kYy4HlaJXifEmU71OEOuq
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,000242	1300	0,00031	https://www.himozon.com.ua/store/%d0%bc%d0%be%d0%bb%d1%96%d0%b1%d0%b4%d0%b0%d1%82-%d0%bd%d0%b0%d1%82%d1%80%d1%96%d1%8e-%d0%bd%d0%b0%d1%82%d1%80%d1%96%d0%b9-%d0%bc%d0%be%d0%bb%d1%96%d0%b1%d0%b4%d0%b5%d0%bd%d0%be%d0%b2%d0%be%d0%ba/
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,000238	76	0,000018	https://harkiv-torg.com.ua/ua/p825624692-kobalt-hloristyj.html?srsltid=AfmBOoqn5JHzYVnfriO2RYRBTYJRwv5a2EFLIyXu0q5dU95Zf5c4c4Ny
Вартість 1л середовища (джерело вуглецю – дизель)– 0,68 грн					
Вартість 1л середовища (джерело вуглецю – гексадекан)– 7,7 грн					
<i>Rhodococcus ruber</i> МР ₄	Глюкоза	20	53,40	1,068	https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza
	Дріжджовий екстракт	0,1	683	0,068	https://vianoksgel.ua/ua/p2429300269-drozhzhevoj-ekstrakt.html
	NaCl	30	14	0,42	https://megachem.com.ua/ua/natrij-hloristyj-farm.html
	Na ₂ HPO ₄	3	99	0,297	https://chemsale.com.ua/ua/product/natrij-fosfornokislyj/
	KH ₂ PO ₄	2	106	0,212	https://www.covalent.com.ua/shop/potassium_phosphate/
	NH ₄ NO ₃	1	27	0,027	https://novohim.com.ua/catalog/dobryva-mikroelementi-zaxist-roslin/amiachna-selitra-amonij-azotnokislij/?utm_medium=googleads&utm_source=mobile&utm_campaign=20894506254&utm_content&source=source_type&device=device_type&gad_source=1&gclid=CjwKCAiA5eC9BhAuEiwA3CKwQkgLr7QK3z2VKggexGe9XPoN-sP_6cKDaz-P8Wly-b2gnh4i4aM7RoCvB0QAvD_BwE
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,7	28	0,0196	https://growex.market/product/magniy-sulfat-7-vodniy?srsltid=AfmBOorZOeescgKjXKwtWR1_fJIQ4fL0FBST-TW5GIVLsNj-3ArvTvlg
FeCl ₃	0,03	66	0,00198	https://primehim.com/index.php?route=product/product&path=20&product_id=256&gclid=CjwKCAiA5eC9BhAuEiwA3CKwQqDirS0od	

					TzIeu1udnD8V8TZFIPNX6N912ir1mbAdmmayzXcN9EZnhoCv6IQAvD_BwE
	CaCl ₂	0,02	40,80	0,000816	https://novohim.com.ua/en/catalog/industrial-chemicals-and-raw-materials/calcium-chloride-technical-calcium-chloride/?utm_medium=googleads&utm_source=mobile&utm_campaign=20894506254&utm_content&source=source_type&device=device_type&gad_source=1&gclid=CjwKCAiA5eC9BhAuEiwA3CKwQk4JhhEJHjsERbrMO2ed0mO6F6VRMDOblJHMT02NjfqQS-ZwSp0g7hoCyoEQAvD_BwE
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	45,30	0,00045	https://himfarminvest.com.ua/cinka-sulfat-geptagidrat-semivodnyj-uk
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0005	172	0,000086	https://mychem.in.ua/ua/p2243771199-mednyj-kuporos-sulfat.html?srsId=AfmBOoqOFZwfeV4-SnPSdVFzKQ0y9OmIsG8kYy4HIaJXifEmU71OEOuq
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,0005	58,60	0,0000293	https://him-component.com.ua/ua/p594694116-marganets-sernokislyj-monogidrat.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAiOa9BhBqEiwABCdG8_y8uHpb58FhYiS9Yq6RadCtadc0F_1PBbdCfnTXftNU2kWywfEeyRoCJhwQAvD_BwE
Вартість 1л середовища – 2,11 грн					

**Умовна вартість 1 г поверхнево-активних речовин,
синтезованих бактеріями роду *Rhodococcus***

Біологічний агент	Концентрація ПАР, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість ПАР, утворених за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>Rhodococcus erythropolis</i> AQ5-07	1,5	72	0,021	0,60	0,4
<i>Rhodococcus</i> sp. SP1d (джерело вуглецю – дизель)	1,86	240	0,0078	0,68	0,37
<i>Rhodococcus</i> sp. SP1d (джерело вуглецю – гексадекан)	2,38	240	0,0099	7,7	3,23
<i>Rhodococcus ruber</i> MP ₄	6,7	168	0,040	2,11	0,31

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

Потреба у поверхнево-активних речовин (ПАР) зумовлена сучасними технологічними та екологічними вимогами у промисловості, харчовому виробництві, хімічній та нафтохімічній галузях.

У олійно-екстракційній та харчовій промисловості ПАР застосовують для очищення резервуарів і обладнання без розбирання, а в нафтовій і хімічній галузях — для емульгування нафтопродуктів та залишків масел.

Поверхнево-активні речовини зменшують поверхневий натяг між рідинами або рідиною і твердою поверхнею, діючи як медіатор на межі розділу речовин, які інакше не змішувалися б, наприклад, олія та вода [15]. Тому ПАР є основою сучасних мийних і знежирювальних засобів, застосовуваних у харчовій промисловості, для миття посуду, прання, очищення обладнання, цистерн і резервуарів.

Для практичного прикладу застосування ПАР у промисловості розглянемо компанію Kernel — одного з найбільших виробників і експортерів рослинної олії в Україні. Компанія володіє шістьма олійноекстракційними заводами, двома сільськогосподарськими кластерами, п'ятнадцятьма силосів та одним перевантажувальним терміналом [16], де ПАР застосовуються для очищення резервуарів, обладнання та транспорту для зберігання і відвантаження олії, забезпечуючи ефективність технологічних процесів та дотримання санітарних і екологічних стандартів.

Їхні олійноекстракційні заводи сертифіковані за стандартами ISO 9001 «Система управління якістю», до того ж ISO 22000 «Управління безпекою харчових продуктів» [16]. Тому відповідно до ISO 22000 та екологічних норм, які обмежують використання агресивних кислот і лугів, використовуються ПАР, що дозволяють ефективно очищати поверхні з меншим використанням агресивних хімічних речовин[17].

Згідно з річним звітом Kernel за фінансовий рік 2024 (FY2024)

					НУХТ БТЕК 05.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Козлова В.А.			Лім.	Арк.	Акрушів	
Перевір.		Пирог Т.П				26	78	
Реценз.					Кафедра БТМ			
Н. Коитр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						
					РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ			26

(https://www.kernel.ua/wp-content/uploads/2024/10/FY2024_Kernel_Annual_Report_.pdf), компанією було перероблено 3,2 млн тонн олійних культур, що на 24% більше, ніж у 2023 р. [16], досягнувши 98% завантаження потужностей своїх олійноекстракційних заводів.

Також відповідно до звіту компанією було реалізовано 1,477 млн.тонн олії рослинного походження, з яких:

- 1,430 млн тонн — соняшникова олія
- 47 тис. тонн — ріпакова олія

Таким чином, Kernel посідає одне з провідних місць у світі серед виробників і експортерів соняшникової олії з часткою близько 6 % у світовому виробництві [16].

3.1. Потреба у поверхнево-активних речовинах

Розщеплення жиру та олії полягає у подоланні їхньої природної незмішуваності з водою, оскільки неполярні молекули жиру несумісні з полярною водою. Поверхнево-активні речовини (ПАР), завдяки амфифільній будові, взаємодіють гідрофобними хвостами з молекулами жиру [15], порушуючи сили когезії та диспергуючи забруднення на дрібніші частинки. Дрібні частинки жиру або олії інкапсулюються в міцели ПАР, що запобігає їх повторному осіданню та забезпечує ефективне видалення водою. Ефективність процесу визначається концентрацією ПАР, температурою та характеристиками поверхневого забруднення [15].

Оскільки ПАР часто використовується як один з компонентів для миючих засобів, розрахуємо потребу ПАР в Україні на прикладі миття олійних резервуарів.

У відкритих джерелах відсутня інформація щодо конкретного мийного засобу, який компанія Kernel застосовує для очищення олійних резервуарів. Тому для розрахунків використаємо мийний засіб «ЕКЛІН-Н» (Україна) — рідкий, нейтральний засіб, спеціально розроблений для ефективного видалення білкових, жирових, механічних та інших органічних забруднень з різних типів виробничих поверхонь і обладнання. Засіб застосовується на підприємствах харчової, фармацевтичної, мікробіологічної, парфумерно-косметичної та переробної

промисловості [18-19]. Пропонуємо замінити хімічні ПАР у складі мийного засобу на екологічно безпечні бідеградабельні ПАР мікробного походження.

Склад засобу «ЕКЛІН-Н»: масовий вміст діючих та допоміжних речовин: суміш іоногенних та неіоногенних поверхнево-активних речовин - до 9%, етоксильовані спирти - до 3%, вода, комплексоутворювач, що сприяє омиленню жирів [19].

Механізм дії засобу полягає у високій змочувальній, емульгуючій та диспергуючій здатності [18]. Він ефективно руйнує міжмолекулярні зв'язки в забрудненнях, емульгує жири та забезпечує глибоке очищення навіть важкодоступних ділянок. Рекомендована концентрація становить 0,1–3,0 % на 5–10 л розчину [18].

Компанія Kernel володіє кількома олійними терміналами в Україні, які забезпечують зберігання та перевалку рослинних олій [20-21], а саме:

- ОйлЕкспортТермінал (порт Південний, Одеська область) ємність резервуарів 47 000 тонн олії.
- ТрансГрейнТермінал-олія (порт Чорноморськ, Одеська область) ємність резервуарів 73 600 тонн.
- Рені-Ойл (порт Рені, Одеська область) ємність резервуарів 15 000 тонн [20-21].

Відповідно до річного звіту Kernel за 2024 рік (https://www.kernel.ua/wp-content/uploads/2024/10/FY2024_Kernel_Annual_Report_.pdf), обсяг переробленої олії становив 1 477 000 тонн, а місткість всіх резервуарів для перевалки — 135 600 тонн. Таким чином, за рік усі резервуари спустошуються приблизно:

$$1\,477\,000 / 135\,600 \approx 11 \text{ разів}$$

На підприємстві діють три основні перевалочні пункти з 69 резервуарами:

- «ТрансГрейнТермінал-олія» — 37 [22],
- «Рені-Ойл» — 8,
- «ОйлЕкспортТермінал» — 24.

Оскільки точні дані щодо місткості резервуарів «Рені-Ойл» та «ОйлЕкспортТермінал» відсутні у відкритих джерелах, тому у розрахунках прийнято середній показник — 2000 м³/резервуар.

Після спорожнення резервуари очищають, якщо вони не використовуються для того самого сорту, продукту, або якщо під час перевірки виявлено залишки [23]. Через брак даних про повторне використання резервуарів для однакових продуктів, у розрахунках передбачено миття після кожного спорожнення. Тоді кількість миттів одного резервуара на рік дорівнює числу його спустошень. При середній кратності спустошень 11 разів на рік, загальна кількість миттів для 69 резервуарів становить: $69 \times 11 = 759$ разів на рік.

На підприємствах харчової, фармацевтичної промисловості зазвичай застосовують систему СІР (Cleaning-In-Place) — технологію миття та дезінфекції обладнання без його розбирання. Для таких систем характерна кратність промивання 1,5–2 [24-25]. Заповнення резервуару робочим миючим розчином приймається на рівні приблизно 20 % від його місткості, оскільки повне заповнення або на половину є економічно нерентабельним.

Враховуючи середню місткість резервуару 2 000 м³, об'єм готового миючого розчину на один резервуар розраховується за формулою:

$$100\% - 2000$$

$$20\% - X$$

$$X = 20 \cdot 2000 / 100 = 400 \text{ м}^3$$

Враховуючи систему СІР об'єм готового миючого розчину становить: $400 \cdot 2 = 800 \text{ м}^3$.

Для визначення кількості ЕКЛІН-Н на один резервуар враховуються його робоча концентрація та об'єм готового миючого розчину:

$$V_{\text{ЕКЛІН-Н}} = 800 \times 0,03 = 24 \text{ м}^3.$$

Відповідно, об'єм води у готовому миючому розчині становить:

$$V_{\text{вода}} = 800 - 24 = 776 \text{ м}^3$$

Визначимо річну потребу миючого розчину, виходячи з загальної кількості миттів та об'єму готового розчину на один резервуар.

$$800 \times 759 = 607\,200$$

Згідно із складом, загальний вміст поверхнево-активних речовин у мийному розчині «ЕКЛІН-Н» становить до 9 % [18], однак ми умовно беремо 3 %, оскільки планується заміна синтетичних ПАР на мікробні, що є більш екологічно безпечним рішенням. Тоді кількість ПАР у миючому розчині на рік складе:

$$607\,200 \times 0,03 = 18\,216 \text{ кг}$$

Результати аналізу та розрахунків представлені у зведеній табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Узагальнені дані про річну потребу компанії Kernel у поверхнево-активних речовинах для мийного засобу ЕКЛІН-Н

Загальний обсяг переробленої олії за 2024 р, млн/ тонн	1,477			
Місткість усіх резервуарів для перевалки олії, тонн	«ТрансГрейн Термінал – олія»	«ОйлЕкспор тТермінал»	«Рені-Ойл»	
	73 600	47 000	15 000	Всього: 135 600
Кількість циклів наповнення резервуарів	11			
Кількість всіх резервуарів	«ТрансГрейн Термінал – олія»	«ОйлЕкспор тТермінал»	«Рені-Ойл»	
	37	24	8	Всього: 69
Кількість разів миття резервуарів на рік	759			
Концентрація засобу, %	3			
Кількість засобу на 10 л розчину, м ³	0,3			
Обсяг води на один резервуар, тонн	776			
Готового мийного розчину на один резервуар, м ³	800			
Кількість миючого засобу на рік, м ³	607 200			
Кількість ПАР в миючому засобі на рік, кг	18 216			

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Перспективним підходом розвитку сучасної промисловості є заміна синтетичних ПАР на мікробні. На глобальному рівні виробництво мікробних ПАР

обмежене через високу вартість, що зумовлена їхнім походженням як вторинних метаболітів, а також значними витратами на живильне середовище, екстракцію та очищення [4].

В Європі промислове виробництво мікробних ПАР здійснюється лише в окремих країнах, тоді як в Україні воно наразі відсутнє й перебуває на стадії наукових досліджень та розробок.

Пропонується налагодити промисловий випуск ПАР для задоволення приблизно 1 % від загальної потреби. Тоді річний обсяг виробництва складе:

$$18\,216 * 1 / 100 = 182,2 \text{ кг/рік}$$

Біологічний агент, що був обраний *Rhodococcus ruber* МР4 синтезує поверхнево активні речовини у концентрації 6,7 г/л (кг/м³) [1]. Об'єм культуральної рідини (X), потрібної для отримання 182,2 кг ПАР, становить:

$$6,7 \text{ кг} - 1 \text{ м}^3$$

$$182,2 \text{ кг} - X$$

$$X = (182,2 * 1) / 6,7 = 27,2 \text{ м}^3$$

При виділенні відбувається 20% втрат цільового продукту. У цьому разі потрібно одержати відповідну кількість культуральної рідини (V_{кр}):

$$27,2 \text{ м}^3 - 80 \%$$

$$V_{\text{кр}} - 100\%$$

$$V_{\text{кр}} = (27,2 \times 100) / 80 = 34 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для здобутку річної потреби поверхнево-активних речовин (згідно п.3.2.) потрібно одержати 34 м³ культуральної рідини (V_{кр}). Розрахуємо, який об'єм культуральної рідини слід забезпечити за один цикл ферментації. При дотриманні

умови, що кількість робочого періоду на рік дорівнює 250 днів, добовий об'єм культуральної рідини становить:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{тр}} = 34/250 = 0,136 \text{ м}^3$$

Цикл роботи ферментера $T_{\text{цф}}$:

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{к}} + T_{\text{пр}} = 72 + 6,5 = 78,5$$

Підготовка ферментера - $T_{\text{пр}}$ включає: миття та огляд апарату - 1,5 год, перевірку на герметичність - 0,5 год, підігрів апарату - 0,5 год, стерилізацію - 1 год, охолодження ферментера - 0,5 год, завантаження середовища - 1,5 год, засів - 0,5 год та вивантаження культуральної рідини - 0,5 год.

Період одного циклу ферментації включає час культивування виробничого ферментера (72 год) та підготовчі операції (6,5 год), тобто загалом 78,5 год.

З урахуванням коефіцієнта запасу ($K_1 = 1,1$) кількість культуральної рідини, яку можна продукувати за один цикл дорівнює:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \times V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \times 0,136 \times 78,5) / 24 = 0,49 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

Після визначення об'єму культуральної рідини за один цикл та з урахуванням коефіцієнта заповнення K_s , розраховуємо геометричний об'єм ферментера, беручи до уваги, його коефіцієнт заповнення ($K_s = 0,6$):

$$V_{\text{гф}} = V_{\text{цк}} / K_s = 0,49/0,6 = 0,82 \text{ м}^3$$

Згідно з таблицею, ферментер за найближчим геометричним об'ємом становить : $V_{\text{гф}} = 1 \text{ м}^3$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Процес біосинтезу у ферментері здійснюється при коефіцієнті заповнення в 0,6, при умові об'єму ферментера в 1 м^3 .

Для визначення робочого об'єму ферментера ($V_{\text{роб}}$) застосовують формулу:
 $V_{\text{роб}} = V_{\text{г.ф}} \times K_{\text{зап}}$, де:

- $V_{\text{г.ф}}$. – об'єм ферментера геометричний;

- Кзап – 0,6 к-нт заповнення.

$$V_{роб} = 1 \times 0,6 = 0,6 \text{ м}^3 \text{ або } 600\text{л}$$

Так, як доза посівного матеріалу складає 10 % від поживного об'єму середовища. Таким чином, для отримання 0,6 м³ культуральної рідини необхідно:

$$V_{роб.1} = 0,6 \times 0,1 = 0,06 \text{ м}^3 \text{ або } 60 \text{ л посівного матеріалу}$$

Зазначену кількість посівного матеріалу можна забезпечити шляхом культивування штаму у інокуляторі об'ємом 0,1 м³ або 100л.

Для забезпечення 0,06 м³ культуральної рідини необхідно:

$$V_{роб.2} = 0,06 \times 0,1 = 0,006 \text{ м}^3 \text{ або } 6 \text{ л посівного матеріалу}$$

Для отримання зазначеної кількості інокуляту використовують ферментер об'ємом 10 дм³ або 10 л.

0,006 м³ культуральної рідини можна добути з використанням:

$$V_{роб.3} = 0,006 \times 0,1 = 0,0006 \text{ м}^3 \text{ або } 0,6 \text{ дм}^3 \text{ (600мл) посівного матеріалу}$$

Даний обсяг інокуляту можна здобути культивуванням бактерій усередині колб на качалці.

Висновки стосовно обсягів та кількості стадій підготовки посівного матеріалу подано у таблиці (див в табл. 3.2.)

Таблиця 3.2

Результати розрахунку об'ємів ферментаційного обладнання для підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу

Об'єм ферментера, л	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, л	Об'єм посівного матеріалу (10%), л	Конденсат (10%), л	Об'єм підготовки поживного середовища, л
1000	0,6	600	60	60	480
100	0,6	60	6	6	48
10	0,6	6	0,6	0,6	4,8

Виходячи із цього, процес отримання посівного матеріалу для виробничого біосинтезу ПАР у ферментері об'ємом 1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 передбачає три послідовні етапи.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Рід *Rhodococcus* є грампозитивним, нерухомим, облигатно-аеробним, каталазопозитивним, неендоспоровим організмом з окислювальним метаболізмом, що загалом здатний споживати велику кількість органічних сполук як єдині джерела вуглецю й енергії [26].

Rhodococcus ruber МР₄ є ефективним продуцентом поверхнево-активних речовин (ПАР) при культивуванні в мінімальному сольовому середовищі (MSM) з додаванням 2% глюкози та 0,1 г/л дріжджового екстракту, досягаючи концентрації ПАР 6,7 г/л після 168 год інкубації [1]. Він є аеробом, отже, потрібне активне насичення повітрям для процесу біосинтезу.

Зважаючи на те, що сприятливий температурний режим для культивування штаму *R. ruber* МР₄ становить 28-30 °С, а оптимальний рН – це нейтральний, приблизно 6.8-7.2, існує ймовірність проникнення сторонніх мезофільних і нейтрофільних мікроорганізмів. Це обумовлює необхідність дотримання стерильних умов під час біосинтезу, які не завжди вдається забезпечити при поверхневому культивуванні. Асептичні умови реалізуються шляхом стерилізації обладнання та комунікацій, повітря, поживного середовища, необхідних для забезпечення росту *R. ruber* МР₄ та синтезу ним поверхнево-активних речовин.

Крім того, у літературі немає відомостей про синтез мікробних ПАР при поверхневому культивуванні продуцентів, а згідно статті [1] культивування *R. ruber* МР₄ для біосинтезу ПАР здійснюють у рідкому середовищі, тому оптимальним у цьому випадку буде використання методу глибинного культивування.

Оскільки ПАР є вторинними метаболітами, синтез яких найбільший під час стаціонарної фази росту, тому доцільним є періодичне культивування.

Rhodococcus ruber МР₄ потребує постійного доступу до кисню, тому ферментер

					НУХТ БТЕК 05.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Козлова В.А.			РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пирог Т.П					34	78
Реценз.						34		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

повинен бути обладнаний ефективною системою для подачі повітря. В основному подача стерильного кисню відбувається безпосередньо через барботер. Для контролю поданого повітря ферментер оснащений датчиками розчиненого кисню.

Для гарантування розчинення кисню в усьому об'ємі середовища та для посилення масообміну ферментер слід оснащувати лопатевою або турбінною мішалкою, що забезпечує рівномірне перемішування середовища. Також потрібен ферментер з регульованою швидкістю перемішування від 100 об/хв, що дозволить оптимізувати масоперенос кисню на різних стадіях біосинтезу.

Так, як температура 28-30 °C є найсприятливішою для росту *R. ruber* MP4 ферментер обладнується сорочкою для терморегуляції та датчиком температури для її стабільного контролю.

Також ферментер забезпечується датчиком рН для автоматичного контролю кислотно-лужного балансу.

У процесі культивування ймовірно утворення піни в наслідок аерації та інтенсивного перемішування. Для запобігання цього у ферментері встановлюють механічний піногасника, принцип дії якого це розбивання піни шляхом обертання мішалки у верхній частині апарата, також використовуються датчики рівня піни, які активують піногасник у разі необхідності.

Нам потрібен ферментер, що найкраще підходить для ферментації у великих масштабах, тому, з огляду на всі наявні показники, оптимальним варіантом буде ферментер від компанії SYSBIOTECH (Австрія) [<https://en.sysbiotech.at/industrial-scale-bioreactor-500-1000l/>]. Ця компанія надає широкий асортимент обладнання для біообробки та послуг автоматизації для досліджень, розробок і промислового виробництва. Вони спеціалізуються на обладнанні для ферментації та культивування клітин.

Тому ця компанія пропонує ферментер промислового масштабу 500-1000л виготовлений з нержавіючої сталі марки 316L, який має повністю асептичну конструкцію, оснащений автоматичною подачею повітря до 2 vvm; системою контролю температури; датчиками рН, рO₂, OD, піни, мембранним датчиком тиску. Крім цього, забезпечує через трубопроводи подачу чистого повітря, чистої пари,

охолоджувальної води. Також має паропостачання установки, загальний злив, дренаж для біовідходів, зворот охолоджуючої води та ручне або автоматичне регулювання швидкості відповідно до кількості розчиненого кисню.

З огляду на це, він є універсальним рішенням для промислової ферментації.

4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Однією з головних умов культивування *Rhodococcus ruber* МР₄ – це інтенсивна подача повітря. Таким чином, в технологічній схемі потрібно включити стадії підготовки аераційного повітря.

Підготовка аераційного повітря планується в окремому приміщенні, через значні витрати повітря.

Стадії підготовки аераційного повітря:

- Атмосферне повітря збирається шляхом застосування вертикальної трубки із повітрязабірником на висоті 2–3 м від найвищої точки будівлі ($H \approx 12$ м: висота виробничого ферментера – 3,2 м [27], висота поверху – 6 м із косим дахом будівлі – (+3 м) 9 м).
- На наступному етапі повітря фільтрується через плоскі тканинні фільтри грубого очищення для видалення пилу з частками $\delta > 50$ мкм.
- Після попереднього очищення повітря стискається за допомогою компресорів або турбоповітродувок, при цьому його температура підвищується до 120–200 °С.
- Після стиснення повітря охолоджується у водяних теплообмінниках до температури «точки роси», що забезпечує конденсацію вологи [28].
- Далі повітря потрапляє у ресивер, де відділяється конденсована волога та пари мастильних речовин, що потрапили із компресора.
- Згодом повітря підігрівається у відповідних теплообмінниках паром до 45–50 °С для стабілізації тиску та температури.
- Після стабілізації параметрів повітря проходить через головні фільтри, розташовані поблизу ферментаційних відділень, досягаючи ступеня очищення $E \approx 95\%$ [28].

- На останньому етапі повітря подається через трубопроводи (колектори) до індивідуальних фільтрів, встановлених безпосередньо на ферментері, де ступінь очищення досягає $E \approx 99,99\%$.

Відпрацьоване повітря через колектори надходить на головні фільтри для остаточного очищення та знешкодження.

4.3. Обґрунтування способу підготовки і стерилізації поживного середовища для культивування *Rhodococcus ruber* МР₄

Відповідно до розрахунків, наведених у розділі 1, процес біосинтезу поверхнево-активних речовин здійснюється у ферментері об'ємом 1 м³, який містить 480 л поживного середовища. Інокулянт одержують поетапно: у колбах на качалці, в інокуляторі об'ємом 10 л та інокуляторі об'ємом 100 л (див. табл. 3.2).

У процесі виробничого біосинтезу ПАР *R. ruber* МР₄ застосовується середовище відповідного складу (г/л) [1]:

- Глюкоза – 20
- Дріжджовий екстракт – 0,1
- NaCl – 30
- Na₂HPO₄ – 3
- KH₂PO₄ – 2
- NH₄NO₃ – 1
- MgSO₄·7H₂O – 0,7
- Розчин мікроелементів в (г/л)- FeCl₃ – 0,03, CaCl₂ – 0,02, ZnSO₄·7H₂O – 0,01, CuSO₄·5H₂O – 0,0005, MnSO₄·H₂O – 0,0005.
- рН середовища 7,2.

Оскільки для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках використовують невеликий об'єм поживного середовища, то стерилізація буде здійснюватися в автоклаві, а для наступних стадій отримання інокуляту та проведення виробничого біосинтезу підготовка компонентів середовища відбуватиметься безпосередньо в апаратах при рН 4,0–4,5.

Для забезпечення коректного проведення процесу розрахунків вмісту мікроелементів буде проведено на кожній стадії вирощування посівного матеріалу, а також на стадії виробничого біосинтезу. Аналіз даних наведених в табл. 4.1 дозволяє зробити висновок, що для 0,6 та 6 л будемо готувати запасний розчин мікроелементів, для решти мікроелементи можна вносити у композиції з іншими солями. Для 6 л використовуємо запасний розчин, тому що наважки $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ та $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ дорівнюють 3мг, та їх не можна зважити на технічних вагах, на яких зважуються компоненти від 10 мг.

Таблиця 4.1

Розрахунок вмісту мікроелементів в різних об'ємах поживного середовища

Мікроелементи	Концентрація, мг/ л	Об'єм середовища, л			
		0,6	6	60	600
FeCl_3	30	18 мг	180 мг	1,8 г	18 г
CaCl_2	20	12 мг	120мг	1,2 г	12 г
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10	6 мг	60мг	600 мг	6 г
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,50	0,3мг	3мг	30 мг	0,3 г
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,50	0,3мг	3 мг	30 мг	0,3 г

Крім цього, окремо буде виконано розрахунок кількості та способів приготування розчинів глюкози, дріжджового екстракту та титрувальних агентів (NaOH 6 %, HCl 6 %) на 4 етапах виробництва. Глюкоза та дріжджовий екстракт є термолабільні, тому з метою унеможливлення їх можливої контамінації під час зберігання вони готуються у вигляді максимально концентрованих розчинів. З даних наведених в табл. 4.2 зробимо такий висновок, що приготування розчину термолабільних компонентів здійснюється разом, також розчин 6% хлоридної кислоти готуємо у збірнику на 2 л один для всіх, бо він є нестерильним.

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища

	Вміст, г		HCl (6%)	NaOH (6%)
--	----------	--	-------------------	--------------------

Об'єм середовища, л	дріжджового екстракту	глюкози	Особливість приготування розчину термолабільних компонентів	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,6	0,06	12	у колбі на 100 мл	-	-	-	-
6	0,6	120	у колбі на 500 мл	12	у збірнику 2 л	12	у колбі на 50 мл
60	6	1,2 кг	в реакторі на 5 л	120		120	у колбі на 250 мл
600	60	12кг	в реакторі на 50 л	1,2 л		1,2 л	у реакторі на 2 л

Розрахунок об'єму води для приготування розчину термолабільних компонентів композиції А

Вміст глюкози у композиції А повинен бути 40%. Отже, для приготування композиції А для виробничого біосинтезу потрібно певна кількість води (табл. 4.2):

40г глюкози – 60 мл води

12000 г глюкози – х мл води

$x = (12000 \cdot 60)/40 = 18000$ мл, або 18 л (об'єм композиції становить 30 л).

Для приготування композиції А для інокулятора 100 л необхідно води:

40г глюкози – 60 мл води

1200 г глюкози – х мл води

$x = (1200 \cdot 60)/40 = 1800$ мл або 1,8 л (об'єм композиції становить 3 л).

Для приготування композиції А для інокулятора 10 л необхідно води:

40г глюкози – 60 мл води

120 г глюкози – х мл води

$x = (120 \cdot 60)/40 = 180$ мл (об'єм композиції становить 300 мл).

Для приготування композиції А для колб необхідно води:

40г глюкози – 60 мл води

12 г глюкози – х мл води

$x = (12 \cdot 60)/40 = 18$ мл (об'єм композиції становить 30 мл).

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

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо проводити в автоклаві, так як його об'єм всього 600 мл. Аналіз складу поживного середовища для вирощування *R. ruber* MP₄ дозволяє розділити його на три композиції, згідно режиму стерилізації компонентів:

Композиція А: Дріжджовий екстракт, глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: NH₄NO₃, NaCl, MgSO₄·7H₂O (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: Na₂HPO₄, KH₂PO₄ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Дріжджовий екстракт та глюкоза є термолабільними, тому потребують м'якого режиму стерилізації. Солі стерилізують при стандартній для них температурі, а фосфати - окремо, щоб уникнути утворення нерозчинних фосфатів магнію та кальцію. Стерилізацію композицій А Б і В проводять в автоклаві.

Розчин мікроелементів готують окремо з розрахунком використання в двох стадіях підготовки посівного матеріалу та стерилізують в автоклаві при 131 °С упродовж 40 хв.

Розрахунок компонентів необхідної кількості для приготування 600 мл середовища, потрібного для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 4.3 Конденсат не утворюється, оскільки стерилізація відбувається в автоклаві.

Таблиця 4.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 600 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, мл
Дріжджовий екстракт	0,1	0,06	А	30
глюкоза	20	12		
Вода	-	30 мл		
NH ₄ NO ₃	1	0,6	Б	420
NaCl	30	18		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,7	0,42		
Вода	-	420 мл		

Na ₂ HPO ₄	3	1,8	В	150
KH ₂ PO ₄	2	1,2		
Вода	-	150 мл		
Усього				600

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

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

На даній стадії необхідно 6 л поживного середовища, а об'єм води для підготовки композицій становить 4,8 л (див. табл. 3.2). При об'єму середовища 6 л утворюються такі композиції поживного середовища:

Композиція А: Дріжджовий екстракт, глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: NH₄NO₃, NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4,0–4,5). Стерилізація композиції Б здійснюється у посівному апараті, адже вимоги до її стерилізації жорсткіші, ніж до композиції А. Солі розчиняють в окремому реакторі, звідки їх потім переміщують у посівний апарат, де відбувається стерилізація.

Окремо готують розчин мікроелементів з розрахунком використання в двох стадіях підготовки посівного матеріалу його стерилізують в автоклаві при 131 °С упродовж 40 хв.

Розрахунок компонентів необхідних для приготування 6 л середовища, потрібного нам для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л наведено у табл. 4.4 При цьому потрібно врахувати об'єм інокуляту (600 мл) та конденсат (10%), що також становить 600 мл.

Таблиця 4.4

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу інокуляторі об'ємом 10 л (Кз = 0,6)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий екстракт	0,1	0,6		
глюкоза	20	120		

Вода	-	0,3 л	А	0,3
NH ₄ NO ₃	1	6	Б	4,5
NaCl	30	180		
Na ₂ HPO ₄	3	18		
KH ₂ PO ₄	2	12		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,7	4,2		
Вода	-	4,5 л		
Усього				4,8 л

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

Для цієї стадії необхідно 60 л поживного середовища, а об'єм води для підготовки композицій становить 48 л (див. табл. 3.2). Утворюються такі композиції поживного середовища при стерилізації 60 л поживного середовища:

Композиція А: Дріжджовий екстракт, глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: NH₄NO₃, NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, FeCl₃, CaCl₂, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, MnSO₄·H₂O (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4,0 – 4,5). Мікроелементи можна вводити до складу композицій з іншими солями починаючи із 60л поживного середовища.

Розрахунок компонентів необхідної кількості для приготування 60 л середовища, потрібного для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л наведено у табл. 4.5 При цьому потрібно врахувати об'єм інокуляту (6 л) та конденсат (10%), що також становить 6 л.

Таблиця 4.5

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу інокуляторі об'ємом 100 л (Кз = 0,6)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 60л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий екстракт	0,1	6	А	3
Глюкоза	20	1200		
Вода	-	3 л		
NH ₄ NO ₃	1	60		
NaCl	30	1800		
Na ₂ HPO ₄	3	180		

KH ₂ PO ₄	2	120	Б	45
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,7	42		
FeCl ₃	30	1,8		
CaCl ₂	20	1,2		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10	600		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,50	30		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,50	30		
Вода	-	45 л		
Усього				48 л

4.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³

Для цієї стадії передбачено 600 л поживного середовища, а об'єм води для підготовки композицій становить 480 л (див. табл. 3.2).

Середовище ділять на такі композиції:

Композиція А: Дріжджовий екстракт, глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: NH₄NO₃, NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, FeCl₃, CaCl₂, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, MnSO₄·H₂O (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4,0 – 4,5). Стерилізація композиції Б здійснюється у ферментері, однак солі розчиняють в окремому реакторі, звідки їх далі спрямовують у ферментер.

Розрахунок компонентів потрібної кількості для приготування 600 л середовища, необхідного для виробництва посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1 м³ наведений у табл. 4.6. При цьому потрібно врахувати об'єм інокуляту (60 л) та конденсат (10%), що також становить 60 л.

Таблиця 4.6

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу інокуляторі об'ємом 1 м³ (Кз = 0,6)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 600 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий екстракт	0,1	60	А	30
Глюкоза	20	12000		
Вода	-	30 л		
NH ₄ NO ₃	1	600		
NaCl,	30	18000		

Na ₂ HPO ₄	3	1800	Б	450
KH ₂ PO ₄	2	1200		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,7	420		
FeCl ₃	30	18		
CaCl ₂	20	12		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10	6		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,50	0,3		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,50	0,3		
Вода	-	450 л		
Усього				

4.4. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для регуляції рН у процесі біосинтезу цільового продукту

Згідно статті (Yalaoui-Guellal, D., Brahmi, F., Touati, A., De Champs, C., Banat, M. I., & Madania, K. (2017). Production of biosurfactants by hydrocarbons degrading bacteria isolated from Soummam watershed sediments of Bejaia in Algeria. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 37(1), 189–195. <https://doi.org/10.1002/ep.12653>), відсутні чіткі дані щодо зміни динаміки рН протягом культивування *Rhodococcus ruber* MP4 і необхідності його регуляції, тому підготовка титрувальних розчинів не передбачена.

4.5. Обґрунтування вибору піногасника

У процесі культивування *Rhodococcus ruber* MP4 можливе утворення піни через інтенсивне перемішування та безперервної аерації. Щоб запобігти для цього встановлюють у ферментері механічний піногасника, принцип дії якого це розбивання піни шляхом обертання мішалки у верхній частині обладнання [29], за потреби також використовуються датчики рівня піни, які активують піногасник.

* * *

Отже, для реалізації технологічного процесу біосинтезу поверхнево-активних речовин штамом *R. ruber* MP4 необхідно **передбачити такі допоміжні заходи:**

- підготовка аераційного повітря, а також очистка відпрацьованого;
- приготування запасного розчину мікроелементів для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках та інокуляторі об'ємом - 10 л;

- приготування 6% розчину хлоридної кислоти для підкислення композиції Б перед стерилізацією у посівних апаратах та виробничому ферментері;
- приготування та стерилізація 6% розчинів їдкого натру для нейтралізації середовища у посівних апаратах та виробничому ферментері перед внесенням посівного матеріалу.

Окрім цього, необхідно передбачити таке обладнання:

- реактор-змішувач об'ємом 2 л, для приготування 6%-го розчину хлоридної кислоти (*табл. 4.2*);
- реактор об'ємом 2 л для приготування і стерилізації 6%-го розчину їдкого натру (*табл. 4.2*);
- реактор об'ємом 5 л для приготування та стерилізації композиції А для вирощування інокуляту в посівному апараті 100 л (*табл. 4.2*);
- реактор об'ємом 50 л для приготування та стерилізації композиції А для виробничого біосинтезу у ферментері 1м³ (*табл. 4.2*);
- реактор-змішувач об'ємом 6 л для приготування композиції Б для вирощування для вирощування інокуляту в посівному апараті 10 л;
- реактор-змішувач об'ємом 60 л для приготування композиції Б для вирощування для вирощування інокуляту в посівному апараті 100 л;
- реактор-змішувач об'ємом 600 л для приготування композиції Б для виробничого біосинтезу.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображено на апаратурній схемі (див. графічна частина), представлена в табл. 5.1.

Таблиця 5.1.

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus ruber* MP4

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
P-1	Реактор-змішувач для приготування 6% розчину хлоридної кислоти	1	Реактор-змішувач об'ємом 2 л. Матеріал: нержавіюча сталь AISI-304, AISI-316. Оснащений перемішуючим пристроєм із швидкістю перемішування 40-100 об/хв. Виробник виготовляє апарат необхідного об'єму за індивідуальним замовленням. Виробник: Dushka-UA (Україна) https://www.dushka-ua.com/reactor/
P-2	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 10л. Габарити: 420 х 350 х 450 мм. Матеріал: кислотостійка або корозійностійка сталь. Оснащений сорочкою, з пристроєм для перемішування (100 об/хв) з потужністю (0,75 кВт), робоча температура (від -30 до +300 °С.) Виробник: ТОВ «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна) https://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanic_heskim_perem_ustroystvom_ua.php
H-3	Насос	1	Відцентровий насос OEM 0511A. Продуктивність (1 л/хв), потужність (1,1 Вт), напір (1,05 м). Матеріал: поліпропілен. Виробник: Aurora Pro Scientific (США) https://www.auroraprosci.com/Centrifugal-Pump/OEM-Mini-DC-Brushless-Water-Pump-ASP0511A-USB
ІН-4	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 10 л. Модель: BIOSTAT Cplus, габарити: 1900 × 1020 × 750 мм. співвідношення висота:ширина 2:1/3:1. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304 / 316L. Оснащений перемішувальним пристроєм швидкість обертання (20-1500об/хв) з потужністю двигуна (800 Вт), температурний діапазон (0-150 °С), тиск (від -0,5 до +2 бар).

НУХТ БТЕК 05.01.05 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Козлова В.А.		
Перевір.		Пирог Т.П		
Реценз.				
Н. Контр.				
Зав. каф.		Стабніков В.П.		

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ
ОБЛАДНАННЯ

Літ.	Арк.	Аркушів
------	------	---------

46

78

Кафедра БТМ

46

			<p>Виробник: Sartorius (Німеччина) https://sartorius.com.ua/fermenteri-i-bioreaktori/sterilizuyemi-na-misczi-fermenteri-bioreaktori-cip/biostat-cplus/</p>
P-5	Реактор для приготування та стерилізації композиції А	1	<p>Реактор об'ємом 5 л. Модель: S-5L, габарити: 500 × 365 × 1300 мм. Матеріал: боросилікатне скло 3.3, опорна рама – нержавіюча сталь 304. Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою із швидкістю перемішування (0–600 об/хв). Температурний режим (від –80 до +200 °С), робочий тиск (-0,1 МПа та звичайний тиск), потужність двигуна (90 Вт). Виробник: WollenLab (Китай). https://rotaryevaporator.en.made-in-china.com/product/mCFxzQwlrZWK/China-S-5L-Lab-Using-Equipment-5L-Small-Jacketed-Glass-Reactor.html</p>
P-6	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	<p>Реактор-змішувач об'ємом 60 л. Габарити: 1000 x 930 x 2600. Матеріал: кислотостійка або корозійностійка сталь. Оснащений сорочкою, перемішувальним пристроєм(100 об/хв) з потужністю (0,75 кВт), робоча температура (від -30 до +300 °С.) Виробник: ТОВ «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна) https://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanic_heskim_perem_ustroystvom_ua.php</p>
H-7	Насос	1	<p>Відцентровий насос OEM ASP4502. Продуктивність (4-6 л/хв), потужність (3-12 Вт), напір (0,5- 3 м), Матеріал: поліпропілен. Виробник: Aurora Pro Scientific (США) https://www.auroraprosci.com/Centrifugal-Pump/OEM-Mini-DC-Brushless-Water-Pump-4502</p>
ІН-8	Інокулятор	1	<p>Інокулятор об'ємом 100 л. Модель: BLBIO-100SJ, габаритні розміри не знайдено у відкритих джерелах. Співвідношенні діаметра та висоти 1:2,2-2,5. Матеріал: нержавіюча сталь 316/304. Оснащений перемішувальним пристроєм швидкість перемішування (50–1000 та 50-400 об/хв), тиск (у резервуарі до 0,3 МПа та у сорочці до 0,35 МПа). Виробник: Bailun Biotechnology (Китай) https://bailunbio.en.made-in-china.com/product/wxmruYBEIzRo/China-100L-Stainless-Steel-Fermenter-Stirred-Tank-Bioreactor.html</p>
P-9	Реактор для приготування та стерилізації композиції А	1	<p>Реактор об'ємом 50 л. Модель: LGR-50L, габарити: 870 × 560 × 2270 мм. Матеріал: боросилікатне скло GG3.</p>

			<p>Оснащений перемішувальним пристроєм швидкість обертання (0-450 об/хв) з потужністю двигуна (120 Вт), температура (від -80°C до 250 °C) ступінь вакууму (0,098 МПа). Забезпечений сорочкою для нагрівання / охолодження. Виробник: LABOAO (Китай) https://www.laboao.com/products/jacketed-glass-reactor/50l-jacketed-glass-reactor?utm</p>
P-10	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	<p>Змішувач об'ємом 600 л, габарити: 1000 × 800 мм. Матеріал: нержавіюча сталь. Оснащений перемішувальним пристроєм з потужністю (0,75 кВт), робоча температура (100 °C), швидкість перемішування (0-36 об/хв), максимальний тиск (0,09 Мпа). Виробник: Wenzhou Kinding Machinery Co., Ltd (Китай) http://www.kindingmachinery.com/productdetail/r174efsw.html</p>
H-11	Насос	1	<p>Насос відцентровий LEO 3.0 (775334). Продуктивність (20 л/хв), потужність (0,55 кВт), напір (37 м). Виробник: LEO (Aquatica) (Китай) https://skvagina.com.ua/ua/poverhnostniy-nasos/775334.html</p>
P-12	Реактор для приготування і стерилізації 6% розчину їдкого натру	1	<p>Реактор об'ємом 2 л. Модель: BSF-2L, габарити 450 × 450 × 1410 мм. Матеріал: нержавіюча сталь SUS304/316L. Оснащений сорочкою для нагріву або охолодження середовища, перемішувальним пристроєм з потужністю (120 Вт), Температурний режим (від -120 до +260 °C), швидкість перемішування (0-460 об/хв), максимальний вакуум (-0,098 МПа). Виробник: Nanbei Instrument (Китай) https://www.nanbeinstrument.com/glass-reactor/stainless-steel-reactor/2l-double-layer-stainless-steel-reactor.html</p>
ФР-13	Виробничий ферментер	1	<p>Промисловий біореактор 1 м³. Оскільки у відкритих джерелах відсутні дані щодо габаритних розмірів на основі співвідношення Н:D=1,5–2:1, рекомендованого виробником і наведеного в методичних вказівках до курсового проекту (додаток 4) [27], можна припустити, що орієнтовна висота становить близько 3200 мм, а діаметр — приблизно 1100 мм. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L (для змочених частин) та AISI 304 (для деталей, що не контактують з середовищем). Оснащений перемішувальним пристроєм із діапазоном швидкості (10–600 об/хв.) Робочий тиск (</p>

			<p>посудина 0,3 МПа та сорочка 0,4 МПа), температура (посудина 143 °С та сорочка 151°С). Виробник: SysBiotech (Австрія) https://en.sysbiotech.at/industrial-scale-bioreactor-500-10001/</p>
Н-14	Насос	1	<p>Пневматичний мембранний насос SEKO DUOTEK (AF000030PHTTPT1). Продуктивність (35 л/хв), максимальний напір (5 м), максимальний тиск (7 бар). Виробник: SEKO S.P.A. (Італія) https://dosingtech.com.ua/uk/product/pnevmatichni-j-membrannij-nasos-seko-duotek-af000030phtpt1-pp-hytrel-ptfe-ptfe-35-l-hv/</p>

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCLUS RUBER* MP4

Технологічна схема біосинтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) з використанням *Rhodococcus ruber* MP4 передбачає як допоміжні, так і основні роботи технологічного процесу.

Допоміжні роботи (ДР) складаються з:

- підготовка стерильного аераційного повітря;
- приготування та стерилізації титрувальних агентів (6% HCl і 6% NaOH);
- приготування та стерилізації запасного розчину мікроелементів;
- підготовка і стерилізація поживних середовищ.

Основний технологічний процес (ТП) складається з:

- підготовки посівного матеріалу;
- виробничого біосинтезу ПАР.

Технологічну та апаратурну схеми біосинтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) представлено у графічній частині.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря збирають через трубку розташовану вертикально з повітрязабірником котрий знаходиться у найвищій точці на висоті 12 м (див. підрозділ 4.2.).

ДР 1.2. Очистка повітря від пилу

Повітря (від ДР 1.1) очищують від пилу за допомогою пласких тканинних фільтрів грубого очищення, що забезпечує рівень очищення сягає до 90%. На цьому етапі знижується рівень контамінації завдяки затриманню частини мікроорганізмів, що містяться у пилових частинках розміром понад 50 мкм.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Стискання повітря (від ДР 1.2) проводять у компресорі або турбоповітро-

					НУХТ БТЕК 05.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Козлова В.А.				РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО- АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>RHODOCOCCLUS</i> <i>RUBER</i> MP4	Лім.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Пирог Т.П						50	78
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

дувках до 0,35-0,5 МПа, внаслідок чого його температура зростає до 120-200°C.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення від вологи

Отримане стиснене повітря після компресії (від ДР 1.3), надходить у теплообмінник-охолоджувач, де за допомогою охолодженої води, як теплоносія охолоджується до температури «точки роси» 25-40°C, що забезпечує конденсацію вологи. Для відокремлення зайвої вологості та парів мастила, що потрапили разом із потоком від компресора, повітря подають до ресиверу. Вологість повітря зменшується до 60-70%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

До теплообмінника-нагрівача надходить охолоджене повітря (від ДР 1.4), де нагрівається до 45–50 °С за допомогою пари низького тиску для стабілізації температури та тиску.

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Повітря, яке було нагріте (від ДР 1.5) проходить через головні фільтри, які розташовані поблизу ферментаційних відділень досягаючи ступеня очищення $E \approx 95\%$.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 1.6) постачається через трубопроводи (колектори) до індивідуальних фільтрів кожного з посівних апаратів та ферментера (до ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 6.1), де досягається кінцевий ступінь очищення $E \approx 99,99\%$.

ДР 2. Приготування розчинів кислот і лугу

ДР 2.1. Приготування 6% розчину HCl

ДР 2.1.1. Приготування 6% розчину HCl для підкислення композицій середовища перед стерилізацією в посівному апараті об'ємом 10 л, 100 л, 1 м³

Щоб приготувати 1332 мл 6%-го розчину HCl (див. табл. 4.2) у реактор (Р-1) об'ємом 2 л, спочатку вносять 1110 мл питної води, після чого, за умови постійного перемішування, додають 222 мл 36%-ї HCl, відміряної мірним циліндром. Важливо дотримуватись саме такого порядку змішування рідин, щоб уникнути інтенсивної екзотермічної реакції.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення середовища для вирощування Rhodococcus ruber M4

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 10 л

Для приготування 25 мл 6%-го розчину NaOH (див. табл 4.2) на технічних терезах зважують 1,5 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу об'ємом 50 мл та вносять 25 мл дистильованої води за допомогою мірного циліндра на 25 мл. Суміш ретельно перемішують до моменту повного розчинення компоненту і закупорюють ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію готового розчину проводять в автоклаві за температурою 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 100 л

Для приготування 120 мл 6%-го розчину натрій гідроксиду (NaOH) (див. табл 4.2), на технічних терезах зважують 7,2 г кристалічного їдкого натру. Підготовлену наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл та вносять 113 мл дистильованої води шляхом застосування мірного циліндра на 200 мл. Суміш ретельно перемішують до моменту повного розчинення компоненту і закупорюють ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію готового розчину проводять в автоклаві при температурі 131 °С (0,15 МПа) впродовж 40 хв..

ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в ферментері об'ємом 1 м³

Щоб приготувати 1200 мл 6%-го розчину NaOH (див. табл 4.2) на технічних терезах зважують 72 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у реактор (Р-12) об'ємом 2 л, і додають 1128 мл питної води шляхом застосування мірного циліндра. Далі подають пару у сорочку реактора до досягнення 40 °С і вмикають мішалку для повного розчинення лугу. Стерилізують за температури 131°С (0,15 МПа) на протязі 40 хв.

ДР 3. Приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів

ДР 3.1. Приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів для вирощування інокуляту у колбах на качалках та в посівному апараті об'ємом 10 л

FeCl_3 – 3 г, CaCl_2 – 2 г, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1 г, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,05 г, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,05 г зважують на технічних терезах. Отримані наважки вносять у колбу об'ємом 250 мл, додають 100 мл дистильованої води, яку відміряють за допомогою мірного циліндра об'ємом 100 мл. Колбу герметизують ватно-марлевым корком, та поступово перемішують, закінчують стерилізацією в автоклаві при температурі 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 0,06 г дріжджового екстракту і 12 г глюкози. Отримані наважки розміщують у колбу об'ємом 100 мл, після чого додають 30 мл дистильованої води використовуючи мірний циліндр на 50 мл та перемішують. Колби закривають ватно-марлевими корками та стерилізують в автоклаві за температури 112 °С на протязі 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 0,6 г NH_4NO_3 , 18 г NaCl і 0,42 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Підготовлені порції поміщують у колбу об'ємом 1 л, додають 420 мл дистильованої води мірним циліндром на 500 мл та ретельно перемішують. Колбу герметизують ватно-марлевым корком та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С впродовж 40 хв.

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 1,8 г Na_2HPO_4 і 1,2 г KH_2PO_4 . Наважки поміщують у колбу об'ємом 300 мл, вливають 150 мл дистильованої води, остаточно перемішують. Колбу затуляють ватно-марлевым корком та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С на протязі 40 хв.

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 0,6 г дріжджового екстракту 120 г глюкози. Отримані наважки переміщують у колби на 500 мл, після чого вливають 300 мл дистильованої води. Колби затуляють ватно-марлевими корками та стерилізують в автоклаві за температури 112 °С впродовж 30 хв.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Технічними терезами потрібно зважити 6 г NH_4NO_3 ; 180 г NaCl ; 18 г Na_2HPO_4 12 г KH_2PO_4 і 4,2 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Усі наважки переміщують у реактор-змішувач (Р-2) об'ємом 6 л та додають 4,5 л питної води використовуючи лічильник води. Згодом в сорочку реактора подають пару до температури 40 °С та для досягнення повного розчинення солей вмикають перемішуючий пристрій. Отриманий розчин перекачують насосом (Н-3) в інокулятор (ІН-4) об'ємом 10 л та з реактора (Р-1) необхідно додати 6 %-й розчин HCl (від ДР 2.1.1) до рН 4–4,5. Після чого стерилізують при температурі 131 °С на протязі 40 хв.

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

В реактор (Р-5) об'ємом 5 л вносять 6 г дріжджового екстракту і 1,2 кг глюкози, зважені на технічних вагах, використовуючи лічильник води додають 3 л питної води, після у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С та вмикають мішалку для забезпечення повного розчинення всіх компонентів. Після чого при 112 °С, 30 хв стерилізують.

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Технічними терезами необхідно зважити 60 г NH_4NO_3 ; 1,8 кг NaCl ; 180 г Na_2HPO_4 120 г KH_2PO_4 і 42 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Усі наважки розміщують у реакторі-змішувачі (Р-6) об'ємом 60 л та подають 45 л води питної використовуючи при цьому лічильник води. Потім в сорочку реактора подають пару до досягнення температури 40 °С та вмикають мішалку до повного розчинення компонентів. Розчин, який було отримано, перекачують насосом (Н-7) у заздалегідь простерилізований інокулятор (ІН-8) об'ємом 100 л та подають з реактора (Р-1) 6 %-й розчин HCl (від ДР 2.1.1) до

одержання рН 4-4,5, після чого за температури 131 °С упродовж 40 хв проводять стерилізацію.

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу поверхнево-активних речовин у ферментері об'ємом 1 м³

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

В реактор (Р-9) об'ємом 50 л через ваговий дозатор подають 60 г дріжджового екстракту і 12 кг глюкози. Далі, через лічильник води, додають 30 л питної води, потім у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С та вмикають мішалку для забезпечення повного розчинення всіх компонентів і стерилізують 30 хв, при 112 °С.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Використовуючи ваговий дозатор у реактор-змішувач (Р-10) об'ємом 600 л вносять 600 г NH₄NO₃; 18 кг NaCl; 1,8 кг Na₂HPO₄; 1,2 кг KH₂PO₄ і 420 г MgSO₄·7H₂O, також за допомогою лічильника води необхідно додати 450 л питної води. Потім подають пару в сорочку реактора до досягнення 40 °С, а тоді вмикають перемішуючий пристрій для забезпечення повного розчинення солей. Розчин, що утворився, перекачують насосом (Н-11) у ферментер (ФР-13) об'ємом 1 м³ та додають з реактора (Р-1) 6 %-й розчин HCl (від ДР 2.1.1), який коригує рН до 4–4,5, після чого виконують стерилізацію при температурі 131 °С на протязі 40 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Rhodococcus ruber* МР₄ зберігають у пробірках на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА) за температури 2-4 °С. Пересіви на свіже поживне середовище вионують раз на 3 місяці. Всі роботи з колекційною культурою вимагають абсолютної стерильності.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Для одержання ізольованих колоній колекційну культуру пересівають на чашки Петрі з МПА, за допомогою методу виснажливого штриха. Культивування

відбувається в термостаті, підтримуючи температуру 28–30 °С протягом трьох діб (72 год).

ТП 5.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах

Ізольовані колонії *Rhodococcus ruber* МР₄, виділені на чашках Петрі (від ТП 5.2) пересівають в пробірки зі скошеним МПА використовуючи стерильну петлю. Для кожної пробірки беруть окрему ізольовану колонію. В пробірки пересівають ізольовані колонії, що розташовані на відстані щонайменше 1 см. Культивування здійснюється протягом 48 год. при температурі 28–30 °С.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

У стерильних умовах у колбу об'ємом 1 л зі асептичною композицією А (від ДР 4.1.1) додають простерилізовані композиції Б та В (від ДР 4.1.2 та ДР 4.1.3), а також 0,6 мл запасного розчину мікроелементів (від ДР 3.1). Отриману суміш ретельно перемішують та розливають по 150 мл у чотири стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл. В робочу культуру із *Rhodococcus ruber* МР₄ (від ТП 5.3), яка знаходиться в пробірці додають 5 мл фізіологічного розчину та суспендують клітини, після чого за допомогою стерильної піпетки відбирають бактеріальну суспензію і вносять її до качалочних колб із поживним середовищем. Колби закривають ватно-марлевими пробками. Для засіву кожної колби використовується окрема пробірка із клітинною суспензією. Культивування проводять на качалках зі швидкістю 150 об/хв при температурі 28–30 °С упродовж 48 год. Мікробіологічний контроль та визначення концентрації біомаси, яка становить 0,6–0,8 г/л здійснюють після завершення культивування.

ТП 5.5. Вирощування в інокуляторі об'ємом 10 л

До стерилізованої в автоклаві композиції А (300 мл) (від ДР 4.2.1) додають 6 мл запасного розчину мікроелементів (від ДР 3.1). Отриману суміш вводять через засівну колбу в інокулятор (ІН-4) об'ємом 10 л із композицією Б (від ДР 4.2.2). Крім того, вносять 6%-ий розчин NaOH (від ДР 2.2.1), за допомогою засівної колби, до досягнення рівня рН 6,8–7,0. Після нейтралізації середовища таким самим способом вносять посівний матеріал (від ТП 5.4). Протягом 24 год. при температурі 28–30 °С

проводиться культивування з підтримкою концентрації розчиненого кисню (pO_2) на рівні 20–30 % від насичення повітрям, яка забезпечується швидкістю перемішування та витратами аераційного повітря. Крім того, кожні 4 год. відбираються зразки для проведення мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 0,6–0,8 г/л.

ТП 5.6. Вирощування в інокуляторі об'ємом 100 л

Самоплином подається композиція А (від ДР 4.3.1) з реактора (Р-5) об'ємом 5 л до інокулятора (ІН-8) об'ємом 100 л з композицією Б (від ДР 4.3.2), згодом вмикають перемішуючий пристрій і коригують 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.2) рН до значення 6,8–7,0. З інокулятора (ІН-4) об'ємом 10 л посівний матеріал (від ТП 5.5) подають самоплином. Культивування триває 24 год. при температурі 28–30 °С з підтриманням рівня розчиненого кисню (pO_2) у межах 20–30 % від насичення повітря. Стабільність pO_2 досягається регулюванням швидкості мішалки та інтенсивності аерації стерильним повітрям. Кожні 3–4 год. беруть проби для мікробіологічного контролю й встановлення концентрації біомаси, яка має бути 0,6–0,8 г/л.

ТП 6. Біосинтез поверхнево-активних речовин у ферментері об'ємом 1 м³

ТП 6.1. Вирощування культури в ферментері об'ємом 1 м³

У виробничий ферментер (ФР-13) об'ємом 1 м³ з композицією Б (від ДР 4.4.2), самоплином додають композицію А з реактора (Р-9) об'ємом 50 л (від ДР 4.4.1). Після цього вмикається система перемішування та з реактора (Р-12) подається 6%-ий розчин NaOH (від ДР 2.2.3) коригуючи рН до значення 6,8–7,0.

Посівний матеріал з інокулятора (ІН-8) об'ємом 100 л (від ТП 5.6) подається через трубу перетискування. Культивування відбувається упродовж 72 год., при температурі 28–30 °С, підтримуючи концентрацію розчиненого кисню (pO_2) на рівні 20–30 % від насичення повітря. Для стабілізації pO_2 на цьому рівні здійснюється регулювання швидкості перемішування та інтенсивності аерації. Протягом всього процесу культивування, з періодичністю у 4 год., виконують відбір проб культуральної рідини з метою мікробіологічного контролю та аналізу на вміст ПАР і біомаси. Наприкінці процесу культивування концентрація біомаси становить 1,3–1,7 г/л, а ПАР – 6,7 г/л.

РОЗДІЛ 7. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Виділення та очищення поверхнево-активних речовин є одним із ключових етапів біотехнологічного процесу. Науковий інтерес до цих процесів зумовлений як потребою у високочистих препаратах для аналітичних досліджень, так і вимогами промислового виробництва, де контроль складу ПАР суттєво впливає на якість готового продукту. Чим вищий рівень очищення ПАР, тим ширшими є можливості їх практичного застосування та тим більшою є їх комерційна цінність. З урахуванням того, що виробництво відбувається у ферментері 1 м³ методи виділення та очищення мають бути технологічно ефективними, відтворюваними та економічно доцільними для промислового виробництва. Очищені поверхнево-активні речовини планується використовувати як біоактивні компоненти в миючих засобах, зокрема для очищення олійних резервуарів компаній по переробці рослинних олій, що зумовлює підвищені вимоги до їх чистоти.

7.1. Обґрунтування методів виділення поверхнево-активних речовин

Поверхнево-активні речовини характеризуються амфифільною будовою, високою поверхневою активністю та здатністю утворювати міцели, що значно ускладнює їх виділення з культуральних рідин. Вибір методу визначається природою ПАР, вимогами до чистоти продукту та екологічними аспектами процесу.

Один із найбільш поширених способів первинного виділення ПАР із культуральної рідини – це кислотне осадження. Метод ґрунтується на зниженні показника рН, унаслідок чого зменшується розчинність ПАР та відбувається їх агрегація. Як правило, підкислення проводять до значень рН 3–4 із використанням розчинів соляної, сірчаної, ортофосфорної, азотної або оцтової кислот. Після цього зразки інкубують за температури 100 °С протягом 25 хвилин, охолоджують до

					НУХТ БТЕК 05.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Козлова В.А.			РОЗДІЛ 7. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пирог Т.П.					58	78
Реценз.						58		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

кімнатної температури, центрифугують для розділення фаз і відокремлюють супернатант декантацією [30]. Кислотне осадження характеризується простотою реалізації та низькою вартістю, що робить його привабливим для промислового використання. Водночас цей метод має обмежену селективність і потребує подальших стадій очищення для отримання продукту високої чистоти.

Екстракція органічними розчинниками є традиційним і широко застосовуваним методом виділення ПАР, особливо гліколіпідів і ліпопептидів. Принцип методу базується на різній розчинності компонентів культуральної рідини у водній та органічній фазах. Для екстракції застосовують як окремі розчинники, так і їх суміші, зокрема етанол, трет-бутилметиловий ефір, етилацетат, гексан, ізопропанол, хлороформ і метанол [31-32].

У роботі [32] дослідження показують, що найвищий вихід клітинно-зв'язаних трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин було досягнуто під час екстракції з відокремленої біомаси із застосуванням сумішей хлороформ–ізопропанол та хлороформ–метанол у співвідношенні 2:1. Водночас за результатами тонкошарової хроматографії було встановлено, що етанол проявляє вищу селективність щодо трегалозоліпідів, а враховуючи, що вартість етанолу є на 30–45 % нижчою порівняно з іншими розчинниками він є перспективним варіантом [32]. Метод забезпечує відносно високий ступінь виділення ПАР і дозволяє досягати чистоти на рівні 55–70 % [33].

Окрім традиційних підходів, автор у своїй роботі вказує, що були запропоновані методи виділення позаклітинних трегалозоліпідних ПАР із використанням сорбентів, зокрема натрій альгінату та багаточарових магніточутливих композитних адсорбентів, створених на основі оксидів перехідних металів, а саме CuO, CoO, MnO [32]. Застосування їх забезпечує ефективну сорбцію ПАР, після чого адсорбовані сполуки відокремлюють шляхом центрифугування або за допомогою зовнішнього магнітного поля, а після екстрагуються етанолом. Найвищу селективність щодо трегалозоліпідів продемонстрував композит на основі оксиду міді [32].

Також для виділення ПАР із водних розчинів застосовують метод пінної фракціонації, який ґрунтується на селективній адсорбції молекул ПАР на межі поділу фаз газ–рідина. Завдяки амфіфільній природі поверхнево-активні речовини спонтанно мігрують з об'єму рідини до міжфазної поверхні. Суть методу полягає у барботуванні газу через розчин, що містить ПАР [34]. У процесі диспергування газу утворюються дрібні бульбашки, поверхня яких слугує місцем адсорбції поверхнево-активних молекул. Насичені ПАР бульбашки підіймаються вгору, утворюючи стабілізовану піну, збагачену цільовими сполуками. У міру підйому піни в колоні відбувається її дренажування, тобто стікання міжплівкової рідини вниз під дією гравітаційних і капілярних сил. Це призводить до зменшення рідкої фази в піні та підвищення концентрації адсорбованих поверхнево-активних речовин у поверхневих шарах. У результаті на верхівці колони формується піна з високим вмістом ПАР. Метод пінної фракціонації характеризується високою селективністю, низькими енерговитратами та відсутністю потреби в органічних розчинниках. За оптимальних умов ступінь вилучення поверхнево-активних речовин може перевищувати 90%, а коефіцієнт збагачення досягати значних значень, що робить цей метод доцільним для використання у біотехнологічних процесах [34].

7.2. Обґрунтування методів очищення поверхнево-активних речовин

Для очищення поверхнево-активних речовин (ПАР) широко застосовують сучасні мембранні методи, зокрема ультрафільтрацію, нанофільтрацію та мікрофільтрацію [35]. Ці методи ґрунтуються на різниці тиску по обидва боки напівпроникної мембрани та дозволяють розділяти молекули за розміром, відокремлюючи ПАР від інших компонентів суміші за їх розміром, а саме ліпідних похідних, таких як вільні жирні кислоти, моно- та діацилгліцерини [31,35]. Мембранні методи зазвичай використовують на завершальних етапах очищення, оскільки вони забезпечують високий вихід ПАР (90–95 %) та ступінь чистоти (78–95 %) [33].

Для видалення органічних розчинників з екстрагованих ПАР у роботі [32] застосовують упарювання екстрактів при низькому тиску приблизно 5 мм рт.ст. та температурі 60 °С з подальшим сушінням при 80 °С протягом 30 хв.

ПАР, як правило, виробляються мікроорганізмами разом з іншими молекулами, які можуть екстрагуватися разом з ними залежно від обраного методу виділення. Це створює необхідність додаткового очищення, де хроматографія виступає одним із перспективних варіантів. Під час хроматографії суміш компонентів рухається через стаціонарну фазу за допомогою рухомої фази, що дозволяє розділити компоненти. Розділення здійснюється завдяки неоднаковій здатності компонентів до розподілу між рухомою та стаціонарною фазами [35]. Найчастіше застосовують колонкову хроматографію, тонкошарову хроматографію та хроматографію з оберненою фазою.

Тонкошарова хроматографія дозволяє розділяти компоненти суміші залежно від властивостей ПАР. Розчинник переміщує сполуки з дна пластини вгору, причому їх рух залежить від фізичних та хімічних характеристик компонентів: деякі підіймаються разом із розчинником, інші залишаються на стартовій лінії. Після завершення процесу виявлення здійснюють під ультрафіолетовим світлом або хімічною обробкою [35]. Але слід зазначити, що тонкошарова хроматографія є суто лабораторним методом і не застосовується в промислових масштабах.

Колонкова хроматографія ефективна для розділення складних сумішей ПАР за молекулярною масою, розміром та взаємодією зі стаціонарною фазою. В якості стаціонарних фаз зазвичай застосовують силікагель або сефадекс, тоді як рухома фаза складається з сумішей розчинників різної полярності [31,35].

Також ефективним методом для очищення ПАР є діаліз. Під час діалізу відбувається очищення чутливих сполук, це дозволяє відокремити ПАР від інших речовин, які можуть екстрагуватися разом із ними, наприклад, солей. При діалізі молекули рухаються через напівпроникну мембрану під дією градієнта концентрації, де їх переміщення зумовлене розміром [35]. Таким чином, домішки, що містяться в сирих ПАР, проходять крізь мембрану, забезпечуючи очищення цільових сполук.

7.3. Обґрунтування стадій виділення та очищення поверхнево-активних речовин *Rhodococcus ruber* MP4

Згідно з основною статтею (Yalaoui-Guellal D., Brahmi F., Touati A., De Champs C., Banat M.I., Madania K. Production of Biosurfactants by Hydrocarbons degrading bacteria isolated from Soummam watershed Sediments of Bejaia in Algeria. *Environ. Prog. Sustain. Energy*. 2017, 37(1):189-195.doi: 10.1002/ep.12653.) процес виділення й очищення поверхнево-активних речовин передбачав попереднє вилучення бактеріальних клітин із культуральної рідини шляхом центрифугування при швидкості 12 000 об/хв упродовж 20 хв за температури 48 °С, але застосування таких режимів у промисловій практиці є обмеженим через складність забезпечення відповідного обладнання. У зв'язку з цим у даній роботі для подальшої реалізації процесу обрано більш технологічно доцільний режим центрифугування — при 6 000 об/хв протягом 30 хв, що є реалістичним для промислових умов і водночас забезпечує ефективне відокремлення біомаси від культуральної рідини.

Поверхнево-активні речовини осаджували з безклітинного субстрату шляхом регулювання рН до 3,0 за допомогою 6 N HCl з подальшою інкубацією при 48 °С протягом ночі. Після завершення осадження утворений осад ПАР відокремлювали від надосадової рідини методом центрифугування при 20 000 об/хв протягом 20 хвилин за температури 48 °С.

Отриманий осад неочищених ПАР розчиняли у питній воді з метою переведення продукту у водорозчинну форму, придатну для подальшого концентрування та практичного використання. Це дозволяє одержати однорідний водний розчин поверхнево-активних речовин, який можна легко дозувати та застосовувати, зокрема для миття технологічних цистерн.

Для підвищення концентрації активної речовини водний розчин ПАР піддають вакуумному випарюванню на роторному випарнику. У процесі випарювання леткий розчинник видаляється, що спричиняє концентрування нелетких речовин у залишку

[36]. В результаті утворюється концентрат ПАР, який безпосередньо перед використанням можна розводити водою до необхідної робочої концентрації.

Узагальнену схему основного методу виділення поверхнево-активних речовин *Rhodococcus ruber* MP4 наведено на рис 7.1.

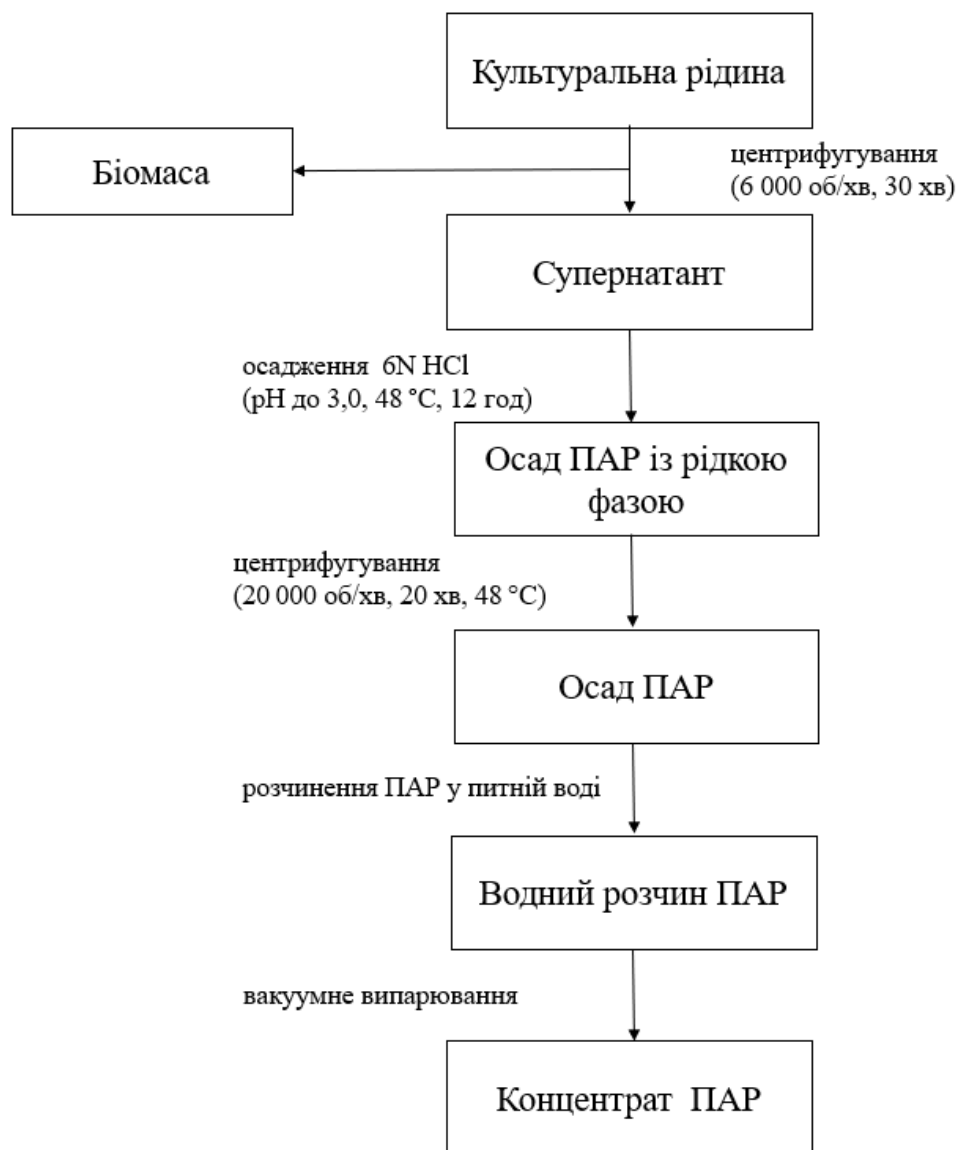


Рис.7.1 Узагальнена схема основного методу виділення поверхнево-активних речовин

Крім того, як альтернативний підхід до виділення ПАР *Rhodococcus ruber* MP4 пропоную використання методу пінної фракціонації. Цей метод відносно простий у виконанні та дозволяє зберегти біологічну активність ПАР, що є особливо важливим для їх подальшого використання у різних галузях. Оскільки *Rhodococcus ruber* MP4 є

строгим аеробом, його культивування потребує інтенсивного насичення повітрям, що сприяє утворенню значної кількості піни. Завдяки амфифільним властивостям поверхнево-активні речовини накопичуються на межі поділу фаз газ–рідина та концентруються у пінній фазі [34], що дає змогу виділяти їх під час післяферментаційної обробки культуральної рідини.

Після пінної фракціонації отриману піну, збагачену ПАР, деформують механічно або шляхом зниження тиску, що дозволяє звільнити поверхнево-активні речовини у вигляді водного розчину [37]. Для підвищення концентрації ПАР водний розчин піддають вакуумному випарюванню на роторному випарнику, у результаті чого отримують концентрат, придатний для подальшого використання у біотехнологічних або промислових процесах.

Головним обмеженням даного методу є потреба спеціалізованого обладнання, що може підвищувати фінансові витрати, хоча при цьому досягається високий рівень очищення.

На рис 7.2 наведено узагальнену схему альтернативного методу виділення поверхнево-активних речовин.

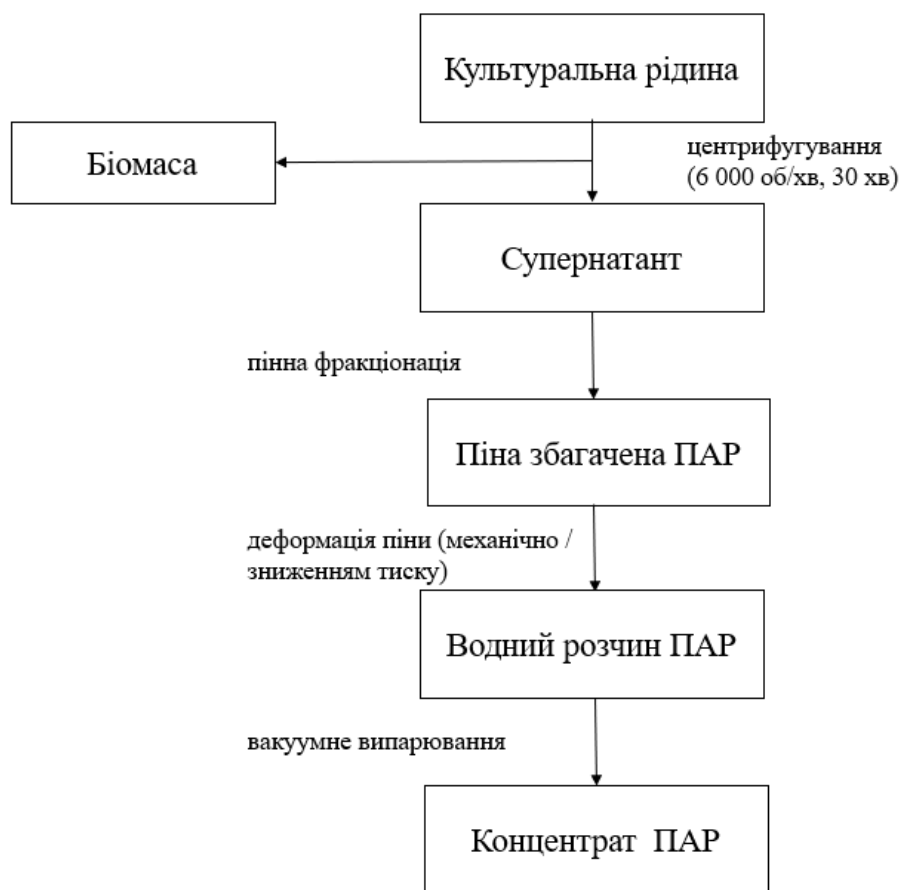


Рис.7.2 Узагальнена схема альтернативного методу виділення поверхнево-активних речовин

Проаналізувавши вище зазначені дослідження та літературу, можна констатувати, що кожен метод володіє своїми перевагами та недоліками, а підбір конкретного способу залежить від поставлених цілей, технічних можливостей підприємства та бажаного ступеня очищення продукту. Часто доцільно комбінувати декілька методів, що дозволяє підвищити ефективність виділення ПАР та зберегти їхні функціональні властивості для подальшого застосування.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Отримання поверхнево-активних речовин (ПАР) шляхом культивування бактерій *Rhodococcus ruber* MP4 відбувається в асептичних умовах. З огляду на це, задля гарантії відсутності сторонньої мікробіоти, на всіх стадіях виробничого процесу проводиться мікробіологічний контроль. У процесі культивування штаму, здійснюється відбір проб культуральної рідини для мікробіологічного аналізу поживних середовищ, посівного матеріалу та для визначення концентрації біомаси, цільового продукту, азотовмісних (NH_4NO_3) і вуглецевих (глюкоза) джерел живлення у середовищі. Ці дії потрібно робити кожні 4 години.

8.1. Мікробіологічний контроль

Першочерговим завданням мікробіологічного контролю є гарантування стерильності технологічного процесу. Це одна із основних вимог для виробництва кінцевого продукту відповідної якості.

Мікробіологічний контроль проводять з метою:

Перевірки стерильності:

- 6-% розчину NaOH;
- запасного розчину мікроелементів;
- композицій поживних середовищ, призначених для вирощування інокуляту та проведення біосинтезу поверхнево-активних-речовин.

Виявлення сторонньої мікробіоти:

- у посівному матеріалі *Rhodococcus ruber* MP4;
- у культуральній рідині під час біосинтезу поверхнево-активних речовин.

Здійснюється такий контроль двома основними способами: висіванням зразків на агаризоване середовище у чашках Петрі та мікроскопічним аналізом проб.

					НУХТ БТЕК 05.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Козлова В.А.			РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Лім.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пирог Т.П					66	78
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						
					66			

8.1.1. Висів на агаризовані поживні середовища

Застосування прямого висіву на агаризовані поживні середовища дає можливість перевіряти як стерильність поживних середовищ, так і наявність або відсутність сторонньої мікрофлори.

Перевірка стерильності середовищ:

Контроль здійснюють шляхом висівання проби стерильного поживного середовища на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) та глюкозо-картопляним агаром (ГКА) з метою виявлення бактерій, або сусло-агаром (СА) — для грибів [30]. Із проби відбирають 0,1 мл стерильною піпеткою, наносять на поверхню середовища та рівномірно розподіляють стерильною петлею. Чашки інкубують при температурі 30–32 °С і через 6–8 годин перевіряють результати. Ознаки росту мікроорганізмів бути не повинні [38].

Перевірка мікробіологічної чистоти біологічного агента:

Прямим висівом культуральну рідину розсіюють стерильною бактеріологічною петлею на чашки Петрі із м'ясо-пептонним агаром (МПА) та глюкозо– картопляним агаром (ГКА) для виявлення бактерій, а також з сусло–агаром (СА) для виявлення грибів та дріжджів. Чашки з м'ясо-пептонним агаром інкубують при температурі 28–30 °С (2–3 доби). Після здійснюють візуальний контроль на предмет присутності сторонньої мікробіоти [38]. У випадку відсутності контамінації сторонніми мікроорганізмами на чашках Петрі з агаризованим середовищем після інкубації, буде можливим спостерігати колонії *R. ruber* помаранчево-червоного кольору розміром до 5 мм діаметром. Зображення з колоніями *R. Ruber* зображено нижче (рис. 8.1 та рис. 8.2).



Рис. 8.1 Ріст *Rhodococcus ruber* на Середовищі 535 за температури 28°C [39]

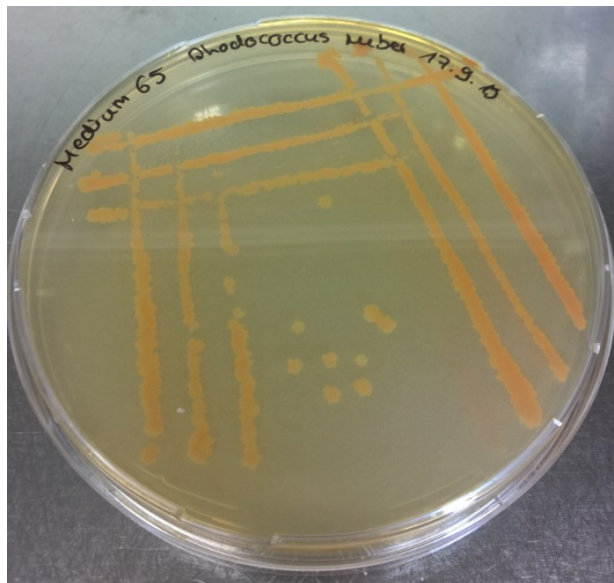


Рис. 8.2 Ріст *Rhodococcus ruber* на Середовищі 65 за температури 28°C [41]

Склад середовища 535:

- триптиказний соєвий бульйон (BBL 11768, Oxoid CM129 або Merck 5459) – 30,0 г
- агар – 15,0 г
- дистильована вода – 1000 мл

pH 7,3 та автоклавувати при 121°C протягом 15 хв [40].

Склад середовища 65:

- глюкоза – 4,0 г

- дріжджовий екстракт – 4,0 г
- солодовий екстракт – 10,0 г
- CaCO₃ – 2,0 г
- агар – 20,0 г
- дистильована вода – 1000 мл

Перед додаванням агару потрібно довести рН до 7,2. Та, якщо використовується рідке середовище, потрібно видалити CaCO₃ [42].

8.1.2. Мікроскопіювання

Мікроскопування проводили у світловому мікроскопі з імерсійною системою. Для підготовки препарату на чисте знежирене предметне скло, дотримуючись асептичних умов, стерильною петлею наносили невелику краплю культуральної рідини. Мікроорганізми, які містяться в краплі розподіляють по склу бактеріальною петлею, формуючи мазок діаметром 1 см. Згодом мазок висушують при кімнатній температурі доки волога повністю випарується [43]. Далі на повністю сухий препарат скляною паличкою наносять 1–2 краплі імерсійної олії. Після закінчення роботи за допомогою вати, змоченої етиловим спиртом, видаляють залишки олії з імерсійного об'єктива [44].

У разі відсутності сторонньої мікробіоти у зразку, під час мікроскопування можна спостерігати клітини *R. Ruber* MP4 розташовані парами або невеликими ланцюжками і в експоненційній фазі росту вони мають паличкоподібну форму, а саме товсті короткі палички, тоді як у стаціонарній фазі набувають кокоподібної форми. Клітини розміром 0,5–2,0×0,5–1,0 мкм, грампозитивні, нерухомі, неутворюючі спори, червоного кольору. [39, 45].

У зв'язку з тим, що зображення *Rhodococcus ruber* під світловим мікроскопом не було знайдено, тому нижче наведено фото представника роду *Rhodococcus* (рис. 8.3).

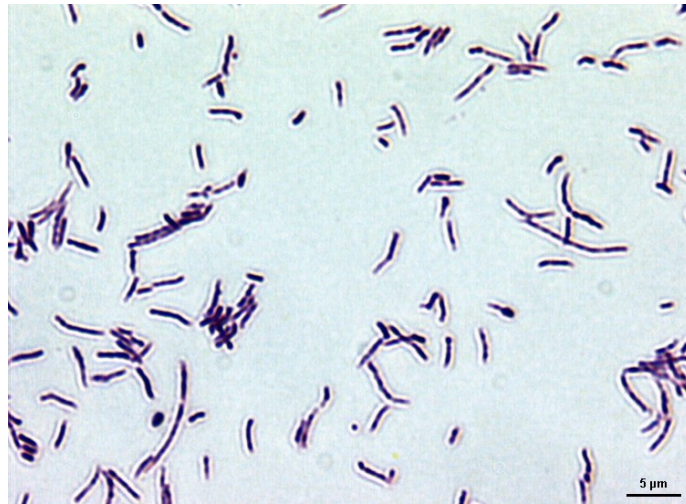


Рис. 8.3 Зображення *Rhodococcus erythropolis* під світловим мікроскопом [46]

8.2. Показники росту і синтезу поверхнево-активних речовин

8.2.1. Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси оцінювали непрямим методом, вимірюючи оптичну густину гомогенної суспензії та перераховуючи на абсолютно суху біомасу за допомогою калібрувального графіка. Культуральну рідину розводять дистильованою водою до показника оптичної густини 0,2 - 0,8, яку вимірюють при довжині хвилі $\lambda = 540$ нм та довжині світлового потоку 5 мм [43].

8.2.2. Визначення концентрації поверхнево-активних речовин *Rhodococcus ruber* MP4

Визначення концентрації поверхнево-активних речовин (ПАР) здійснювали ваговим методом як описано у статті [1]. Культуральну рідину центрифугували при 12 000 об/хв впродовж 20 хвилин, надалі піддавали екстракції сумішшю хлороформу та метанолу у співвідношенні 2:1 (v/v). Після цього розчинники видаляли випарюванням на роторному випарнику до постійної маси. Отриманий залишок переносили у попередньо зважену чашку Петрі, висушували при температурі 100 °C впродовж 30 хв у сушильній шафі. Маса ПАР розраховувалась за наступною формулою [1]:

$W_b = W_{pb} - W_p$, де

W_b — маса сухих ПАР;

W_{pb} — маса чашки Петрі із залишками ПАР після висушування;

W_p — маса порожньої чашки Петрі;

Отримані результати виражали у грамах на літр (г/л) культуральної рідини.

8.2.3. Визначення концентрації джерела Карбону (глюкоза) у середовищі

Концентрацію глюкози в культуральному середовищі можливо визначити методом глюкозооксидази з використанням комерційного набору «Novokarb».

Цей метод базується на ферментативному окисненні глюкози з використанням ферменту глюкозооксидази. Глюкозооксидаза каталізує перенесення двох атомів Гідрогену з першого атома Карбону глюкози на розчинений у рідкому реагенті кисень. У процесі реакції утворюється перекис водню в еквімолярній кількості. Таким чином, концентрація утвореного перекису водню точно відповідає визначеній концентрації глюкози.

Після додавання проби до робочого розчину при температурі 37 ± 2 °C протягом 20 хв утворювалася забарвлена сполука. Оптичну щільність кінцевого продукту визначають використовуючи фотоелектричний фотометр КФК3-01-"ЗОМЗ" при довжині хвилі світла 510 нм і виражали в одиницях концентрації за калібрувальною кривою [47].

8.2.4. Визначення концентрації джерела Нітрогену (нітрат) у середовищі

Концентрацію NaNO_3 можливо визначити за допомогою іонної хроматографії.

Для цього використовували іонний хроматограф Dionex ICS-90 (виробництво Dionex, Каліфорнія, США). Для хроматографічного розділення використовували аніон-обмінну колонку IonPac AS19 (4 мм × 250 мм), а термостатування проводили при кімнатній температурі (25 ± 2 °C), що забезпечувало стабільність умов для точних вимірювань. Детекція здійснювалася за допомогою кондуктометричного детектора, налаштованого на високочутливий режим, що гарантувало високу точність

результатів. Рухома фаза складалася з 4,5 мМ розчину КОН із швидкістю потоку 1 мл/хв⁻¹, а об'єм проби дорівнював 10 мкл [48].

Цей метод є простим, але при цьому гарантує високу чутливість, швидкість та точність при аналізі концентрації нітратів.

8.2.5. Визначення концентрації джерела Нітрогену (амоній) у середовищі

У супернатанті концентрацію амонію можна визначити методом Несслера [49]. Для цього амоній у пробі реагує із реактивом Несслера (розчин калійного тетраїодомеркурату (II) в лужному середовищі), що призводить до утворення жовтого або бурого кольору залежно від кількості амонію .

Реакція ґрунтується на утворенні комплексу між іонами амонію та компонентами реактиву, де концентрація амонію у пробі прямо пропорційна інтенсивності забарвлення.

Бактеріальну культуру центрифугують при 13 000 об/хв при кімнатній температурі протягом 10 хв. Після цього, 0,5 мл супернатанту переноситься у пробірку, до супернатанту додають одну краплю реактиву Несслера і перемішують. При наявності амонію з'являється жовте забарвлення, а за високої концентрації формується бурий осад. Інтенсивність забарвлення аналізують візуально або порівнюють з еталонною шкалою.

Крім цього, напівкількісне визначення концентрації амонію можна провести за допомогою набору Visocolor Alpha Ammonia Detection Kit, що забезпечує більш точну градацію кольору та кількісне визначення концентрації амонію [49].

ЛИТЕРАТУРНИ ДЖЕРЕЛА

1. Yalaoui-Guellal D., Brahmi F., Touati A., De Champs C., Banat M.I., Madania K. Production of Biosurfactants by Hydrocarbons degrading bacteria isolated from Soummam watershed Sediments of Bejaia in Algeria. *Environ. Prog. Sustain. Energy*. 2017, 37(1):189-195. doi: 10.1002/ep.12653.
2. Habib S., Ahmad S.A., Wan Johari W.L., AbdShukor M.Y., Alias S.A., Smykla J., Saruni N.H., Abdul Razak N.S., Yasid N.A. Production of Lipopeptide Biosurfactant by a Hydrocarbon-Degrading Antarctic Rhodococcus. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(17):6138. doi: 10.3390/ijms21176138.
3. Dias M.A.M., Nitschke M.. Bacterial-derived surfactants: an update on general aspects and forthcoming applications. *Braz J Microbiol.* 2023(1):103-123. doi: 10.1007/s42770-023-00905-7.
4. Moldes A.B., Rodríguez-López L., Rincón-Fontán M., López-Prieto A., Vecino X., Cruz J.M. Synthetic and Bio-Derived Surfactants Versus Microbial Biosurfactants in the Cosmetic Industry: An Overview. *Int J Mol Sci.* 2021,22(5):2371. doi: 10.3390/ijms22052371.
5. Dini S., Bekhit A.E.A., Roohinejad S., Vale J.M., Agyei D. The Physicochemical and Functional Properties of Biosurfactants:A Review. *Molecules.*2024, 29(11):2544. doi: 10.3390/molecules29112544.
6. Sharma N., Lavania M., Lal B. Biosurfactant: A Next-Generation Tool for Sustainable Remediation of Organic Pollutants. *Front Microbiol.* 2021, 12:821531. doi: 10.3389/fmicb.2021.821531.
7. Twigg M.S, Baccile N., Banat I.M., Déziel E., Marchant R., Roelants S., Van Bogaert I.N.A. Microbial biosurfactant research: time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development. *Microb Biotech.* 2021,14(1):147-170. doi: 10.1111/1751-7915.13704.
8. Cappelletti M., Presentato A., Piacenza E., Firrincieli A., Turner R.J., Zannoni D. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds. *Appl Microbiol.* 2020, 104(20):8567-8594. doi:10.1007/s00253-020-10861-z

9. Kuyukina M., Ivshina I. Production of Trehalolipid Biosurfactants by *Rhodococcus*. *Biol. of Rhodococcus* 2019, 271-298. doi: 10.1007/978-3-030-11461-9_10
10. Пирог Т.П., Гейченко Б.С., Шевчук Т.А., Мучник Ф.В. Біосинтез поверхнево-активних речовин актинобактеріями роду *Rhodococcus*. *Мікробіол. журн.*, 2020, 82(2):67-81.
doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj82.02.067>
11. Hsu C.Y., Mahmoud Z., Abdul-Reda H.U., Abduvalieva D., Alsultany F., Kianfar E. Biosurfactants: Properties, Applications and Emerging Trends. *Sou.Afric. Jour. of Chem.Eng.* 2025, 53(4):21-39. doi:[10.1016/j.sajce.2025.04.002](https://doi.org/10.1016/j.sajce.2025.04.002)
12. Andreolli M., Villanova V., Zanzoni S., D'Onofrio M., Vallini G., Secchi N., Lampis S. Characterization of trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine strain *Rhodococcus sp.* SP1d and its potential for environmental applications. *Microb. Cell Fact.* 2023, 22(1):126. doi: 10.1186/s12934-023-02128-9.
13. Habib S., Ahmad S.A., Wan Johari W.L., Abd Shukor M.Y., Alias S.A., Smykla J., Saruni N.H., Abdul Razak N.S., Yasid N.A. Production of Lipopeptide Biosurfactant by a Hydrocarbon-Degrading Antarctic *Rhodococcus*. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(17):6138. doi: 10.3390/ijms21176138.
14. Ibrahim S., Abdul Khalil K., Zahri KNM., Gomez-Fuentes C., Convey P., Zulkharnain A., Sabri S., Alias S.A., González-Rocha G., Ahmad S.A. Biosurfactant Production and Growth Kinetics Studies of the Waste Canola Oil-Degrading Bacterium *Rhodococcus erythropolis* AQ5-07 from Antarctica. *Molecules.* 2020, 25(17):3878. doi: 10.3390/molecules25173878.
15. Роль поверхнево-активних речовин у розщепленні жиру та олії [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.chemicalproductsokc.com/the-role-of-surfactants-in-breaking-down-grease-and-oil/>
16. Річний звіт Kernel за 2024 [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.kernel.ua/wp-content/uploads/2024/10/FY2024_Kernel_Annual_Report_.pdf
17. ISO 22000 [Електронний ресурс] – режим доступу:

18. ЕКЛІН-Н [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://cleanstore.com.ua/ua/p1148162267-nejtralnoe-moyuschee-sredstvo.html>
19. Державний реєстр дезінфекційних засобів та миючих засобів [Електронний ресурс] – режим доступу: https://data.gov.ua/dataset/reestr_dezzasobiv_moz
20. Стаття про Kernel [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://elevatorist.com/kompanii/119-kernel-grupp>
21. Логістичні рішення Kernel, офіційний сайт [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kernel.ua/ua/logistics-services/>
22. Стаття про ТрансГрейнТермінал-олія [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://elevatorist.com/kompanii/670-transgreynterminal-oliya>
23. Рекомендовані методи зберігання та транспортування харчових олій та жирів [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://pdfcoffee.com/recommended-practices-for-storage-and-transport-of-edible-oils-and-fats-pdf-free.html>
24. Система очищення СІР для біофармацевтичних процесів [Електронний ресурс] – режим доступу: https://vdoc.pub/documents/clean-in-place-for-the-biopharmaceutical-processes-6t46f8sqc0t0?utm_source
25. Система очищення СІР для молочної промисловості [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://viravix.com/ua/sip-mijka-dlya-molochnoyi-promislovosti/>
26. Majidzadeh M., Fatahi-Bafghi M. Current taxonomy of *Rhodococcus* species and their role in infections. *E.J.C.Microb.Inf.Dis.* 2018, 37(11):2045-2062. doi: 10.1007/s10096-018-3364-x.
27. Основи проєктування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проєкту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. –79 с. Шифр 69.191-2022

28. Карлаш, Ю.В. Основи проєктування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: навч. посібник / Ю. В. Карлаш, В. О. Красінько ; Нац. ун-т харч. технол. – Київ : НУХТ, 2022. – 373 с.
29. Гуляєв В.М. Устаткування виробництва [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів вищої освіти зі спеціальності 162 –Біотехнології та біоінженерія – Кам'янське: ДДТУ, 2019. – 58 с.
30. Pokynbroda T., Karpenko I., Midyana H., Karpenko O. Isolation of Surfactants Synthesized by the Pseudomonas Bacteria and Study of Their Properties. *Innov. Biosys. and Bioengin.* 2019, 3(2):70-76. doi:10.20535/ibb.2019.3.2.165838
31. Nascimento M.F., Keković P., Ribeiro I.A.C., Faria N.T., Ferreira F.C. Novel Organic Solvent Nanofiltration Approaches for Microb. Biosurf. Downstr. Proces.. *Membr.(Basel)*. 2023, 13(1):81. doi: 10.3390/membranes13010081.
32. Корецька Н.І. Біотехнологія поверхнево-активних продуктів штаму *Rhodococcus Erythropolis* AU-1, властивості та застосування. Автореф. дис. канд. техн. наук. Київ, 2020. 26 с.
33. Venkataraman S., Rajendran, D.S., Kumar P., Vo D.V., Vinoth K.V. Extraction, purification and applications of biosurfactants based on microbial-derived glycolipids and lipopeptides: a review. *Environm. Chem. Lett.* 2021, 20(5):1-22. doi:10.1007/s10311-021-01336-2
34. Sochacki M., Michorczyk P., Vogt O. Foam Fractionation as an Efficient Method for the Separation and Recovery of Surfactants and Surface-Inactive Agents: State of the Art. *ACS Omega*. 2024, 10(1):55-75. doi: 10.1021/acsomega.4c08413.
35. Methods of Purification and Characterization of Biosurfactants: An Overview *Journ. of Advan. in Bio. & Biotech.* 2023, 26(5):35-53. doi:10.9734/jabb/2023/v26i5635
36. Випарювання. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://buklib.net/books/36204/>
37. Очищення методом пінного фракціонування. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://stud.com.ua/177691/ekologiya/ochischennya_metodom_pinnogo_fraktsionuvannya_pinnoyi_separatsiyeyu

38. Красінько, В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс] : конспект лекцій для здобувачів освіт. ступ. "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія" ден. і заоч. форм навч. / В. О. Красінько ; Нац. ун-т харч. технол. – Київ: НУХТ – 2019. – 252 с.
39. *Rhodococcus ruber* is a microaerophile, spore-forming, mesophilic bacterium of the family Nocardiaceae. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://bacdiver.dsmz.de/strain/10927#ref19568>
40. Склад середовища 535 [Електронний ресурс] – режим доступу: [DSMZ_Medium535.pdf](https://www.dsmz.de/medien/535/DSMZ_Medium535.pdf)
41. The Preparations At The KIT [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://zkm.de/en/the-preparations-at-the-kit>
42. Склад середовища 65 [Електронний ресурс] – режим доступу: [1060](#)
43. Пирог Т.П., Ключка Л.В., Ковшар І.Д. «Загальна мікробіологія і вірусологія. Модуль 2. Фізіологія росту та метаболізм мікроорганізмів» [Електронний ресурс]: методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної і заочної форм здобуття освіти . К.: НУХТ. – 2025. – 127 с. Шифр. 69.274.
44. Основи мікроскопічної техніки [Електронний ресурс] – режим доступу: http://plantphysiol-bio.univer.kharkov.ua/materials/Lab_protocols_radiophys.pdf
45. *Rhodococcus ruber* [Електронний ресурс] – режим доступу: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Rhodococcus_ruber
46. *Rhodococcus erythropolis* [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/rhodo.htm>
47. Digel I., Akimbekov N., Rogachev E., Pogorelova N. Bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* on glucose and sucrose: biosynthesis and structural

properties. *Cellulose* , 2023, 30:11439–11453. doi: <https://doi.org/10.1007/s10570-023-05592-z>

48. Wu T., Jiang J., He N., Jin M., Ma K., Long X. High-Performance Production of Biosurfactant Rhamnolipid with Nitrogen Feeding. *Jour. of Surfact. and Deterg.* 2019, 22(2) 395-402. doi: 10.1002/jsde.12256.
49. Yu S., Kyaw E., Lynn T. M., Latt Z., Mon W.W., Nwe M., Aung A., Sev T. The correlation of carbon source and ammonium accumulation in culture broth by nitrogen-fixing bacterial isolates. *Jour. of Scien. and Innov.Res.* 2017, 6(2):63-67. doi: 10.31254/jsir.2017.6205.