МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) __біотехнології та екологічного контролю__
Кафедра _____біотехнології і мікробіології_____

«До захисту в ЕК»	**«До захисту допущено»**
Декан факультету	Завідувач кафедри
_____ _Наталія ГРЕГІРЧАК_	_____ _Віктор СТАБНІКОВ_
(підпис) (ім'я та прізвище)	(підпис) (ім'я та прізвище)
«___» ____червня_____ 2024 р.	«___» ___червня_____ 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності _____162 «Біотехнології та біоінженерія»_____
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми____«Біотехнології: фармацевтична,_____
_____промислова, харчова, природоохоронна»__
на тему: **« Одержання білка одноклітинних *Methylococcus capsulatus*»**

Виконав: здобувач__IV__ курсу, групи__1___

_____ОЛЕКСІЄНКО Софія Валеріївна_____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна_____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти_____ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

_____ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент __Маргарита ЛОМБЕРГ_____ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач_____
(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) __Біотехнології та екологічного контролю_____
Кафедра _____біотехнології і мікробіології_____
Освітній ступінь____бакалавр_____
Спеціальність____162 «Біотехнології та біоінженерія»_____
(код і назва)
Освітньо-професійна програма __«Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»_____
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри _біотехнології і__мікробіології_____

_____Віктор СТАБНІКОВ_
“_01_**”** __березня__2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

_____ ОЛЕКСІЄНКО Софії Валеріївні _____
(прізвище, ім’я, по батькові)
1. Тема роботи «Одержання білка одноклітинних *Methylococcus capsulatus*»

керівник роботи__ КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна, кандидат технічних наук, доц.,
(прізвище, ім’я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-кс
2. Строк подання здобувачем роботи __28 травня 2024 р._____
3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Methylococcus capsulatus* NCIMB 11132, цільовий продукт: білок одноклітинних організмів.
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
_____ РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми. 8. Післяферментаційні процеси виробництва білка. РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 10.Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.
5. Перелік графічного матеріалу
Технологічна схема– 1 аркуш (А1). Апаратурна схема – 1 аркуш формату (А2).

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання___01.03.2024 р._____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.03.24 – 08.03.24	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	09.03.24 – 15.03.24	
3	Техніко-економічне обґрунтування.	16.03.24 – 21.03.24	
4	Біосинтез цільового продукту.	22.03.24 – 30.03.24	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	01.04.24 – 10.04.24	
6	Специфікація обладнання	11.04.24 - 19.04.24	
7	Опис технологічної схеми	22.04.24 – 26.04.24	
7	Післяферментаційні процеси виробництва білка	22.04.24 – 26.04.24	
8	Контроль виробництва	29.04.24 – 10.05.24	
9	Перспективи впровадження системи екологізації виробництва	13.05.24 – 17.05.24	
10	Графічна частина	20.05.24 - 24.05.24	
11	Оформлення кваліфікаційної роботи	25.05.24 – 28.05.24	

Здобувач _____ ___Софія_ОЛЕКСІЄНКО_____
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____ __Вікторія КРАСІНЬКО _____
(підпис) (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена отриманню та технологічному процесу біотехнологічного виробництва білка одноклітинних мікроорганізмів метилотрофної бактерії *Methylococcus capsulatus* NCIMB 11132, що вирощується із гетеротрофними бактеріями (ацетогеннами) *Alcaligenes acidovorans*, *Aneurinibacillus danicus* і *Brevibacillus sp.* Після проведення аналізу інформації, представленої у доступній літературі щодо потенційних продуцентів цільового продукту було обрано саме штам *M. capsulatus* NCIMB 11132, що вирощується у змішаній культурі. Вибір зумовлений тим, що синтез біомаси змішаною культурою був вищим у майже 4 рази, ніж відповідний показник для метилотрофної монокультури.

Технологічна схема розробленого процесу біосинтезу білка одноклітинних мікроорганізмів включає в себе допоміжні роботи (підготовка титрувальних 6 %-их розчинів (сульфатної кислоти (H_2SO_4) та натрію гідроксиду (NaOH)), підготовка розчину мікроелементів та підготовка поживних середовищ (приготування і стерилізацію) для вирощування гетеротрофних мікроорганізмів, отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу. Технологічний процес складається із наступних етапів: підготовки гетеротрофних культур, вирощування інокуляту у посівних апаратах об'ємами 10, 30 і 100 л та виробничого біосинтезу у газовому біореакторі об'ємом 300 л із коефіцієнтом заповнення 0,5.

Дипломна робота складається зі вступу, десяти розділів, списку використаної літератури з 30 найменувань. Загальний обсяг роботи – 108 сторінок, 2 рисунка, 10 таблиць.

Ключові слова: біомаса, мікробний білок, безперервне культивування, *Methylococcus capsulatus* NCIMB 11132, змішана культура, метилотрофи.

ABSTRACT

The thesis is devoted to the production and technological process of biotechnological production of protein by unicellular microorganisms of the methylotrophic bacterium *Methylococcus capsulatus* NCIMB 11132 grown with heterotrophic bacteria (acetogenic) *Alcaligenes acidovorans, Aneurinibacillus danicus* and *Brevibacillus sp*. After analysing the information presented in the available literature on the potential producers of the target product, the strain *M. capsulatus* NCIMB 11132, grown in mixed culture, was chosen. The choice was due to the fact that the biomass synthesis by the mixed culture was almost 4 times higher than the corresponding indicator for methylotrophic monoculture.

The technological scheme of the developed process of protein biosynthesis of unicellular microorganisms includes auxiliary works (preparation of titration solutions of 6 % (sulfuric acid (H2SO4) and sodium hydroxide (NaOH)), preparation of microelements solution and preparation of culture media (preparation and sterilisation) for growing heterotrophic microorganisms, obtaining seed material and production biosynthesis. The technological process consists of the following stages: preparation of heterotrophic cultures, inoculum cultivation in 10, 30 and 100 litre sowing apparatus and production biosynthesis in a 300 litre gas bioreactor with a filling factor of 0.5.

The thesis consists of an introduction, ten chapters, and a list of 30 references. The total volume of the work is 108 pages, 2 figures, 10 tables.

Keywords: biomass, microbial protein, continuous cultivation, *Methylococcus capsulatus* NCIMB 11132, mixed culture, methylotrophs.

ЗМІСТ

ВСТУП.....9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ.....11
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....17
2.1. Обгрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....17
2.3 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....28
2.4.Таксономічний статус біологічного агенту.....29
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....31
3.1. Потреба у цільовому продукті.....31
3.2. Обрахунок річної потужності виробництва білка одноклітинних організмів.....33
3.3. Розрахунок необхідної кількості циклів для виробництва білку і геометричного об'єму газового біореактору.....35
3.4. Розрахунок потрібної кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....36
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....40
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....43
5.1. Вибір умов і способу культивування.....43
5.2. Вибір типу газового ферментера......48
5.3. Обгрунтування вибору та опис стадій санітарної підготовки виробництва білка.....52
5.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу і виробничого процесу.....61
5.5. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу одноклітинного білка *M. capsulatus* NCIMB 11132.....61
5.5. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках та інокуляторі на 10 л.....63

5.6. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту у посівних апаратах на 30 і 100 л 64
5.7. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у газовому біореакторі на 300 л 64
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ 66
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА 69
РОЗДІЛ 8. ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНІ ПРОЦЕСИ ВИРОБНИЦТВА БІЛКА 81
8.1. Обгрунтування стадій виділення і очищення мікробного білка 81
8.1.1. Виділення клітин 82
8.1.2. Концентрування 85
8.1.3. Висушування 86
9.1.4. Стабілізація 88
8.1.5. Фасування та пакування мікробного білка 89
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА 91
9.1. Мікробіологічний контроль 91
9.2. Визначення концентрації біомаси метилотрофних бактерій 94
9.3. Визначення концентрації біомаси гетеротрофних бактерій 94
9.4. Визначення концентрації джерела вуглецю (газова суміш) 95
9.5. Визначення концентрації джерела азоту (калію нітрату) 96
9.6. Визначення концентрації білку одноклітинних організмів 97
9.7. Методи ідентифікації білка 98
9.8. Визначення показників якості 99
9.9. Частка жиру та ліпідхих залишків у кінцевому продукті 100
9.10. Оцінка біологічної дії 104
9.11. Карта постадійного контролю 105
РОЗДІЛ 10. ПЕРСПЕКТИВИ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА 112
10.1 Системи знешкодження рідких відходів 112
10.1.1 Розрахунки орієнтовного об'єму стічних вод 112
10.1.2. Визначаємо середні витрати стічних вод від промислового підприємства. 113
10.1.3. Система очищення стічних вод. 114

10.2. Системи знешкодження газоподібних відходів 115
10.3. Системи знешкодження твердих відходів 116
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 117

ВСТУП

Агропромисловий комплекс має значний потенціал для виробництва біопалив, який досі залишається невикористаним у повній мірі. Виробництво біопалив із біомаси та відходів рослинницької і тваринницької продукції, харчових відходів дозволяє не лише зменшити емісію парникових газів за рахунок застосування безвідходних технологій виробництва енергії з біогазу, а й вирішити ряд інших питань щодо забезпечення енергетичної незалежності та автономізації виробництва, забезпечення продовольчої безпеки, екологічної безпеки і відновлення родючості ґрунтів України [1].

Традиційно гній безпосередньо використовується як добриво в сільському господарстві, що може спричинити екологічні проблеми, забруднення води та забруднення. Природне розкладання гною призводить до викидів метану та вуглекислого газу під час зберігання. Таке окиснення сприяє пом’якшенню запахів, пов’язаних зі зберіганням і розкладанням гною, і видаляє патогени, які можуть становити значний ризик для здоров’я людей і тварин [2].

Біомаса вирізняється тим, що, відмінно від інших джерел енергії, вона є універсальним ресурсом, придатним як для виробництва електроенергії та теплової енергії, так і для вироблення біопалива для транспортних потреб. У сучасний час скорочення використання природного газу є однією з найактуальніших тем для економіки України. Таким чином, пошук альтернативних джерел енергії та впровадження енергозберігаючих технологій стає нагальним завданням. Використання відновлюваних джерел енергії, зокрема біомаси, має важливе значення для України, оскільки це сприяє зменшенню залежності від імпортованих енергоносіїв і підвищує енергетичну безпеку країни [3].

Тому **актуальним** є пошук та подальша розробка шляхів перетворення відходів тваринницького комплексу в одне із джерел відновлювальної енергії – біогаз.

Новизною ж даної роботи є використання змішаної культури *M. capsulatus* (Bath) NCIMB 11132 з гетеротрофними бактеріями (ацетогеннами) *Alcaligenes acidovorans*, *Aneurinibacillus danicus* і *Brevibacillus* sp., які у процесі росту на газовій суміші (метан+вуглекислий газ+повітря) здатні синтезувати мікробний білок.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ

Білок одноклітинних організмів (БОО) або мікробний білок отримують на основі культивування мікроорганізмів. Його отримують з інактивованих клітин мікроорганізмів, таких як дріжджі, бактерії, гриби та водорості. Одноклітинний мікробний білок служить харчовою або кормовою добавкою і може бути альтернативою звичайним джерелам білка. БОО містить високий вміст білка з усіма незамінними амінокислотами.

Білок одноклітинних організмів має ряд переваг у порівнянні з традиційними джерелами білка, такими як м'ясо, риба або рослини. Він містить не лише всі незамінні амінокислоти, але також багатий на вітаміни, мінерали і біологічно активні речовини, що сприяють зміцненню імунної системи та поліпшенню загального стану здоров'я. Завдяки високій біодоступності, мікробний білок легко засвоюється організмом, що робить його цінним джерелом харчування для людей з різними дієтичними потребами, включаючи вегетаріанців і веганів.

Культивування мікроорганізмів для отримання білка є екологічно чистим і ефективним методом виробництва харчових продуктів. Воно вимагає значно менше води, землі та енергії порівняно з традиційним тваринництвом, що допомагає зменшити вплив на довкілля та зменшити викиди парникових газів. Мікроорганізми можуть культивуватися на різних субстратах, включаючи відходи агропромислового комплексу, що додатково сприяє зменшенню відходів і підвищенню стійкості виробничих процесів.

Крім того, технології виробництва мікробного білка постійно розвиваються, що дозволяє отримувати продукти з покращеними харчовими і органолептичними властивостями. Це відкриває нові можливості для створення інноваційних продуктів харчування, таких як м'ясні аналоги, білкові батончики та спортивні добавки.

Використання БОО може відігравати ключову роль у вирішенні глобальних проблем продовольчої безпеки, забезпечуючи доступне та поживне джерело білка для зростаючого населення планети. З огляду на всі ці переваги, білок одноклітинних організмів має великий потенціал для подальшого розвитку та впровадження у харчову промисловість та тваринництво [7].

Вміст білка в інактивованих клітинах становить щонайменше 40% сирого протеїну на основі сухої ваги. Порівняно з іншими джерелами білків, такими як соя та рибне борошно, БОО показує переваги з точки зору коротшого часу виробництва, незалежності від погодних умов та нижчої вартості виробництва. Таким чином, БОО було визнано одним із потенційних рішень для вирішення глобальної нестачі продовольства через зростання населення.

Виробництво мікробного білку має низькі вимоги до типу джерел вуглецю, і як джерела вуглецю, такі як відходи молочних продуктів, безсумнівно, є найбільш економічно доцільним для виробництва. Виробництво БОО може бути здійснене за допомогою ферментації, яка є високоефективним процесом, що дозволяє швидко і стабільно отримувати великі обсяги продукту.

Основна характеристика, яка майже ніколи не згадується в літературі, стосується саме використання БОО для споживання людиною. Профіль смаку та аромату продукту БОО, призначеного для їжі, в ідеалі має бути приємним або принаймні нейтральним. Наприклад, рибний запах БОО мікроводоростей може обмежити його використання в багатьох харчових продуктах, якщо подальша обробка не проводиться. Розробка методів обробки, таких як дегідратація,

ферментація або додавання ароматизаторів, може допомогти покращити органолептичні властивості БОО.

Крім того, різні відходи в принципі придатні для виробництва БОО кормів, але споживачі не завжди можуть бути готові прийняти їх для виробництва їжі. Важливо проводити освітні кампанії, що підвищують обізнаність про безпечність та користь мікробного білка для здоров'я людини. Ця робота може сприяти зміні ставлення споживачів та підвищенню прийняття продуктів на основі БОО [8].

Мікробний білок також може бути збагачений додатковими поживними речовинами, такими як омега-3 жирні кислоти, вітаміни групи В та мікроелементи, що робить його ще більш корисним для здоров'я людини. Використання БОО у функціональних продуктах харчування може стати важливим кроком у розвитку індустрії здорового харчування та профілактики захворювань.

Таким чином, впровадження БОО у харчову промисловість потребує комплексного підходу, включаючи вдосконалення технологій виробництва, покращення смакових якостей продукту та активну просвітницьку роботу серед споживачів. Це дозволить максимально реалізувати потенціал мікробного білка як стійкого та поживного джерела білка для зростаючого населення планети [9].

Одним із найвідоміших комерційних видів грибкових SCP отримано з *Fusarium venenatum*, який використовується для виробництва м’ясної альтернативи Quorn™, яка була запущена в 1985 році компанією Marlow Foods у Великобританії. *Fusarium venenatum* — це вид грибка, який характеризується високим вмістом білка та здатністю до ферментації в умовах контрольованого середовища. Процес виробництва Quorn™ включає вирощування Fusarium venenatum в біореакторах, де грибок забезпечується глюкозою, вітамінами і мінералами, необхідними для його росту. Після ферментації грибкові міцели збираються, обробляються і формуються у вигляді продуктів, що нагадують

текстуру і смак м'яса. Quorn™ став популярним замінником м’яса завдяки високому вмісту білка, низькому вмісту насичених жирів і холестерину, а також екологічно чистому процесу виробництва [10].

Пивні дріжджі (*Saccharomyces cerevisiae*), які є побічним продуктом пивоварної промисловості, традиційно використовуються для виробництва дріжджових екстрактів, а також солоних дріжджових спредів Marmite®, Cenovis® і Vegemite®. Після завершення процесу бродіння у пивоварінні, дріжджі збираються та піддаються автолізу, що означає розщеплення клітин дріжджів власними ферментами. У результаті цього процесу утворюються дріжджові екстракти, багаті на білок, вітаміни групи В, зокрема В12, та інші корисні речовини.

Marmite® є популярним у Великобританії дріжджовим спредом, який має густу консистенцію та інтенсивний смак. Cenovis® — аналогічний продукт, популярний у Швейцарії, а Vegemite® — відомий австралійський спред. Ці продукти широко використовуються як добавки до їжі для збагачення раціону білком і вітамінами, а також як інгредієнти в різних рецептах.

Виробництво дріжджових екстрактів є ефективним способом утилізації побічних продуктів пивоваріння, зменшуючи відходи і забезпечуючи доступ до високоякісного джерела білка та поживних речовин. Вони є важливими компонентами вегетаріанської та веганської дієт, а також популярними серед людей, які шукають альтернативні джерела білка і вітамінів [11].

Розчинність мікробного білка залежить від кількох основних факторів. Один із них - це полярність розчинника. Полярні розчинники, такі як вода, ефективно розчиняють мікробні білки завдяки здатності утворювати водневі зв'язки та електростатичні взаємодії з полярними групами білкових молекул. У той час як неполярні розчинники, наприклад, гексан, не підходять для розчинення білків через відсутність сильних взаємодій з полярними групами білкових молекул.

Інший важливий фактор - іонна сила. Додавання солей у розчин може змінювати розчинність білків. Низькі концентрації солей можуть підвищувати розчинність білка, завдяки ефекту "екранизації" зарядів, тоді як високі концентрації можуть спричинити випадання білка, що є наслідком ефекту "осолення".

pH середовища також сильно впливає на заряд білкових молекул. Розчинність білків мінімальна при ізоелектричній точці (pI) білка, де сумарний заряд молекули дорівнює нулю. Зміщення pH від ізоелектричної точки може підвищувати розчинність через надання білковій молекулі заряду, що покращує її взаємодію з водними молекулами [12].

Температура впливає на структуру білка та його розчинність. Зазвичай, підвищення температури збільшує розчинність білка, але надмірне нагрівання може призвести до денатурації білка і втрати його розчинності.

Процес розчинення мікробного білка починається з екстракції білка. Після культивування мікроорганізмів, наприклад, дріжджів або бактерій, клітини збирають і піддають лізису (руйнуванню клітинної стінки) для вивільнення внутрішньоклітинних білків. Це може бути здійснено хімічними, механічними або ферментативними методами.

Після лізису клітин отриману суміш піддають очищенню для видалення небілкових компонентів. Цей етап може включати центрифугування, фільтрацію та діаліз. Очищення також може включати хроматографічні методи, такі як іонообмінна або гель-фільтраційна хроматографія, для досягнення високої чистоти білка.

Отриманий білковий розчин може бути концентрований шляхом ультрафільтрації або осмотичного випаровування. Остаточна форма продукту може бути у вигляді порошку, який отримують шляхом сушіння, наприклад, розпилювальним або ліофілізаційним методом [12].

Розчинення мікробного білка у воді або іншому харчовому розчиннику залежить від його кінцевої форми та процесу підготовки. Наприклад, порошковий білок може легко розчинятися у воді, якщо він добре очищений і не містить денатурованих фракцій.

Для використання у харчових продуктах або кормах мікробний білок повинен бути добре розчинним у водних системах, щоб забезпечити однорідність суміші та біодоступність поживних речовин. Розчинність також впливає на текстуру і смакові властивості кінцевого продукту. Тому важливо контролювати умови розчинення, такі як pH, температура та іонну силу розчину [13].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Мікроорганізми-продуценти білків відзначаються дуже високою інтенсивністю накопичення біомаси, яка в 500-5000 разів вище, ніж у рослин або тварин. Мікробні клітини здатні накопичувати дуже великі кількості білка (дріжджі - до 60 %, бактерії - до 75 % за масою). Коливання вмісту білка у сухій речовині біомаси мікроорганізмів може складати від 19 до 90 % (табл 2.1) [14].

Таблиця 2.1.

Вміст речовин у сухій клітинній біомасі (у відсотках)

Склад	**Гриби**	**Водорості**	**Дріжджі**	**Бактерії**
Білки	30-45	40-60	45-55	50-65
Жири	2-8	7-20	2-6	1-3
Зола	9-14	8-10	5-10	3-7
Нуклеїнові кислоти	7-10	3-8	6-12	8-12

Мікроорганізми як продуценти білків мають кілька переваг:

Швидкість розмноження: Мікроорганізми, такі як дріжджі і бактерії, мають дуже короткий час розмноження. Це означає, що їх можна швидко вирощувати в великих кількостях. Це особливо важливо в промислових процесах, де великі обсяги білків потрібні для виробництва ліків, ферментів або інших продуктів.

- Високий вихід білка: Мікроорганізми можуть накопичувати великі кількості білка відносно до своєї сухої речовини. Це означає, що вони ефективно використовують ресурси для синтезу білка і можуть забезпечувати високу вихідну продуктивність.

- Легкість культивування: Більшість мікроорганізмів легко культивувати в лабораторних умовах. Вони можуть рости на простих поживних середовищах і не потребують складних умов або дорогих ресурсів для збереження їх життєздатності.

- Генетичні модифікації: Мікроорганізми можуть бути генетично модифіковані для покращення їх продуктивності, вмісту білка або інших властивостей. Це дозволяє створювати спеціалізовані штами, які ефективно виробляють білки заданого типу або зокрема змінені властивості.

- Економічність: Виробництво білків мікроорганізмами може бути економічно вигідним.

- Масштабованість: Виробництво білків з використанням мікроорганізмів може бути легко масштабоване від лабораторного масштабу до промислового рівня. Це означає, що виробництво може бути збільшене для задоволення великого попиту на білки без суттєвих змін у технології або витратах.

- Гнучкість вибору джерела: Мікроорганізми можуть бути використані для виробництва білків з різних джерел. Наприклад, вони можуть синтезувати білки, що походять з рослин, тварин або навіть інших мікроорганізмів. Це дає можливість вибирати оптимальні джерела білків для конкретних потреб [15].

- Виробництво складних білків: Мікроорганізми можуть бути програмовані для виробництва складних білкових структур, включаючи глікопротеїни та інші похідні білки. Це особливо важливо в фармацевтичній і медичній галузях, де складні білки мають велике значення для розробки ліків та терапевтичних препаратів.

- Біологічна сумісність: Мікроорганізми, які виробляють білки, можуть бути біологічно сумісними з організмами, включаючи людину. Це спрощує процеси клінічних випробувань і дозволяє швидше впровадження білкових продуктів у медицину.

Види бактерій, які використовують для росту газоподібні одновуглецеві субстрати, включають аеробні та анаеробні бактерії, що окиснюють водень, і метанотрофи.

Існує кілька видів бактерій, які можуть використовувати газоподібні одновуглецеві субстрати для свого росту. Декілька таких видів бактерій включають:

- Аеробні бактерії, що окиснюють водень: Ці бактерії використовують молекулярний водень (H_2) як джерело енергії. Вони здатні до аеробного дихання і споживають кисень для окиснення водню. Результатом цього процесу є утворення води (H_2O).
- Анаеробні бактерії, що окиснюють водень: Ці бактерії також використовують молекулярний водень як джерело енергії, але вони функціонують у відсутності кисню. Вони здатні до анаеробного дихання і використовують альтернативні електрон-акцептори, такі як нітрати або сульфати, для окиснення водню [5].
- Метанотрофи: Це бактерії, які споживають метан (CH4) як джерело вуглецю і енергії. Вони використовують спеціальні ферменти, відомі як метанмонооксигенази, для окиснення метану. Цей процес є важливим у природних екосистемах, таких як болота і морські днища.
- Використання цих бактерій для росту на газоподібних одновуглецевих субстратах може мати практичне значення. Наприклад, аеробні та анаеробні бактерії, що окиснюють водень, можуть бути використані для очищення стічних вод або виробництва водню як відновлюваного джерела енергії.

Метанотрофи використовуються для обробки відходів та виробництва біопалива з метану.

Загалом, ці бактерії, які використовують газоподібні одновуглецеві субстрати, мають велике значення в біотехнології та екології. Ось кілька додаткових аспектів, пов'язаних з цими бактеріями:

- Біогазове виробництво: Анаеробні бактерії, що окиснюють водень, та метанотрофи є ключовими гравцями в процесі біогазового виробництва. Вони використовуються для перетворення органічних матеріалів, таких як стічні води, компости або сільськогосподарські відходи, у біогаз, що складається переважно з метану та вуглекислого газу. Біогаз може бути використаний як джерело енергії для опалення, електропостачання або виробництва палива для транспорту [6].

- Біоремедіація: Деякі з цих бактерій можуть бути використані для біоремедіації, тобто очищення забруднених середовищ від токсичних речовин. Наприклад, деякі анаеробні бактерії можуть біологічно перетворювати хлорорганічні сполуки, такі як трихлорметан або трихлоретилен, на менш токсичні продукти.

- Біопалива: Використання метанотрофів для виробництва біопалив на основі метану є об'єктом активних досліджень. Ці бактерії можуть ефективно використовувати метан як джерело вуглецю для синтезу цінних органічних сполук, таких як біопластики або хімічні речовини.

- Біологічний цикл вуглецю: Метанотрофи мають важливу роль в природному циклі вуглецю. Вони споживають метан, який виробляється різними процесами, включаючи природні джерела, такі як болота, рисові поля, склади відходів, а також антропогенні джерела, такі як енергетичні та промислові установки. Цей процес допомагає контролювати концентрацію метану в атмосфері і зменшує його вплив на глобальне потепління.

- Біологічне рециклювання: Мікроорганізми, які використовують газоподібні одновуглецеві субстрати, також грають важливу роль у біологічному рециклюванні. Вони розкладають органічні сполуки, які містять вуглець, на більш прості речовини, що можуть бути використані іншими організмами для росту і розвитку. Цей процес допомагає підтримувати баланс вуглецю в екосистемах і забезпечує доступність поживних речовин для інших організмів.

В цілому, мікроорганізми, які використовують газоподібні одновуглецеві субстрати, відіграють важливу роль у біотехнології, екології та збереженні природних ресурсів. Їх здатність до використання газів як джерела енергії і вуглецю робить їх цінними інструментами для розв'язання проблем, пов'язаних зі збереженням енергії, очищенням середовища та сталим розвитком [6].

Тому глобальний попит на харчовий білок зростає в прогресії, як просте джерело одноклітинних білків з *Methylococcus capsulatus (Bath),* котрі можуть стати потенційною заміною рибного борошна та інших кормів для тварин. Покращення концентрації біомаси за допомогою статистичної оптимізації під час синергічної ферментації зі змішаним консорціумом трьох гетеротрофних бактерій *Alcaligenes acidovorans, Aneurinibacillus danicus і Brevibacillus sp.* може підвищити доцільність промислового процесу. Ці комбіновані стратегії призвели до збільшення біомаси на 265% з кінцевою концентрацією клітин 10,3 г/л, порівняно з 2,8 г/л при культивуванні з підживленням протягом 48 годин. Гетеротрофні бактерії не росли на даному середовищі або метані, але збільшували концентрацію біомаси при додаванні до культур *M. capsulatus* (Bath), очищали окислені побічні продукти природного газу, а також метаболічні побічні продукти облігатного метилотрофа, таким чином вносячи певну стабільність у загальний процес, максимізуючи швидкість росту та врожайність. Таким чином, важливо, щоб середовище для цього процесу було

оптимізоване як змішана культура, оскільки присутність гетеротрофних бактерій має вирішальне значення для її промислового застосування [5].

Таблиця 2.2.

Характеристика продуцента одноклітинного білку *Methylococcus capsulatus за* різних умов

Біологічний агент	**Склад поживного середовища:**	**Концентрація біомаси, г/л**	**Тривалість культивування, год**	**Особливості процесу біосинтезу**	**Використана література**
	Компоненти				
Methylococcus capsulatus (Bath) NCIMB 11132 з гетеротрофними бактеріями (ацетогеннами) Alcaligenes acidovorans, Aneurinibacillus danicus і Brevibacillus sp.	Газова суміш CH4: Повітря: CO_2 -9:9:2 $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ – 1; KNO_3 - 1; $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ – 0,15; $CuSO_4 \times 5\ H_2O$ – 2,5 ; $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$ – 0,717; KH_2PO_4 – 0,272.	10,3	48	t = 32 °C pH=7,0 500 об/хв	Enhanced Production of Single Cell Protein from M. capsulatus (Bath) Growing in Mixed Culture. [Електронний ресурс] // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 6(3):894. DOI:10.15414/jmbfs.2016/17.6.3.894-899

Закінчення таблиці 2.2

Methylococcus capsulatus (Bath) NCIMB 11132	Газова суміш CH4: Повітря: CO2 -9:9:2 $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ – 1; KNO_3 - 1; $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ – 0,15; $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$ – 0,717; KH_2PO_4 – 0,272.	2,8	При періодичному культивуванні з підживленням протягом 48 годин.	t = 32 °C pH=7,0 500 об/хв	Enhanced Production of Single Cell Protein from M. capsulatus (Bath) Growing in Mixed Culture. [Електронний ресурс] // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 6(3):894. DOI:10.15414/jmbfs.2016/17.6.3.894-899

Примітки:

1. FeNaEDTA (Етилендіамінтетраоцтова кислота, (HOOCCH?)?N(CH?)?N(CH?COOH)? - 0,05 мг/л; Na2EDTA* Ч 2 H2O –0,5 мг/л; FeSO4 Ч 7 H2O – 0,2 мг/л; H3BO3 – 0,03 мг/л; CoCl2 Ч 6H2O - 0,02 мг/л; 0,02; ZnSO4 Ч 7 H2O – 0,01 мг/л; MnCl2 Ч 4 H2O - 0,003 мг/л; NaMoO4 Ч 2 H2O -0,003 мг/л; NiCl2 Ч 6 H2O – 0,002 мг/л;

2. FeNaEDTA (Етилендіамінтетраоцтова кислота, (HOOCCH?)?N(CH?)?N(CH?COOH)? - 0,05 мг/л; Na_2EDTA^* Ч 2 H_2O –0,5 мг/л; $FeSO_4$ Ч 7 H_2O – 0,2 мг/л; H_3BO_3 – 0,03 мг/л; $CoCl_2$ Ч 6H_2O - 0,02 мг/л; 0,02; $ZnSO_4$ Ч 7 H_2O – 0,01 мг/л; $MnCl_2$ Ч 4 H_2O - 0,003 мг/л; $NaMoO_4$ Ч 2 H_2O -0,003 мг/л; $NiCl_2$ Ч 6 H_2O – 0,002 мг/л; $CuSO_4$ Ч 5 H_2O – 0,25 мг/л.

Висновок: Культивування штаму *Methylococcus capsulatus* (Bath) NCIMB 11132 з гетеротрофними бактеріями та *Methylococcus capsulatus* (Bath) NCIMB є найбільш презентативним з економічної точки зору.

По-перше, час культивування даних штаму однаковий та становить 48 годин,

По-друге, середовище для культивування також аналогічне.

По-третє, перший продуцент має найнижчу продуктивність по біомасі, що є найважливішим параметром при масовому отриманні одноклітинних білків.

З урахуванням цих факторів, можна стверджувати, що *Methylococcus capsulatus* (Bath) NCIMB 11132 з гетеротрофними бактеріями є найменш вигідним варіантом для планованого виробництва білка одноклітинних організмів.

Таблиця 2.3

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів одноклітинного білку

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л/ об'єму середовища	Джерело інформації (1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11 12,13,)*
Methylococcus capsulatus (Bath) NCIMB 11132 з гетеротрофними бактеріями (ацетогеннами) Alcaligenes acidovorans, Aneurinibacillus danicus і Brevibacillus sp.	CH4: Повітря: CO2 - 9:9:2	н/п	н/п	н/п
	MgSO4 × 7 H2O – 1	28	0,028	1
	KNO_3 - 1	116	0,116	2
	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$ – 0,15	60	0,009	3
	$CuSO_4 \times 5\ H_2O$ – 2,5	200	0,5	4
	$Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$ – 0,717	42	0,03	5
	KH_2PO_4 – 0,272	101	0,028	6
	Вартість 1 л/об'єму середовища – 0,71			
Methylococcus capsulatus (Bath) NCIMB 11132	CH4: Повітря: CO2 - 9:9:2	н/п	н/п	н/п
	MgSO4 × 7 H2O – 1	116	0,028	2
	KNO_3 - 1	60	0,116	3
	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$ – 0,15	200	0,009	4
	$CuSO_4 \times 5\ H_2O$ – 2,5	42	0,5	5
	$Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$ – 0,717	101	0,03	6
	KH_2PO_4 – 0,272	116	0,028	2
	Вартість 1 л/об'єму середовища –0,71			

Примітка. * - Ціни наведено станом на червень 2023 р.

1. Посилання

Висновок: Оскільки компоненти поживного середовища аналогічні, а також С (Карбон) та N (Нітроген) подаються в надлишку з періодичним оновленням, тому дацільність порівнюванння на даному етапі залишається схожоою до попередньої таблиці (2.1)

Таблиця 2.4

Біологічний агент	**Концентрація біомаси, г/л**	**Тривалість культивування, год**	**Кількість утвореної біомаси за годину, г/год**	**Вартість середовища, грн/л**	**Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г**
Methylococcus capsulatus (Bath) NCIMB 11132 *з гетеротрофними бактеріями (ацетогеннами) Alcaligenes acidovorans, Aneurinibacillus danicus і Brevibacillus sp.*	10,3	48	0,22	0,71	0,069
Methylococcus capsulatus (Bath) NCIMB 11132	2,8	48	0,06	0,71	0,25

Умовна вартість 1 г одноклітинного білка на подібних субстратах

Висновок: Ураховуючи дані з попередніх таблиць можна стверджувати, що доцільніше використовувати *Methylococcus capsulatus* (Bath) NCIMB 11132 з гетеротрофними бактеріями, оскільки даний продуцент має більші показники концентрації біомаси та меншу умовну вартість за 1 г цільового продукту [5] .

2.3 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Methylococcus capsulatus було виділено з гарячого джерела. Це грамнегативні коки, нерухомі. Не утворюють спор. Облігатний метанотроф. Клітини містять стопки везикулярних дисків, що є типовим розташуванням внутрішньоцитоплазматичної мембрани в метанотрофах типу I [16].

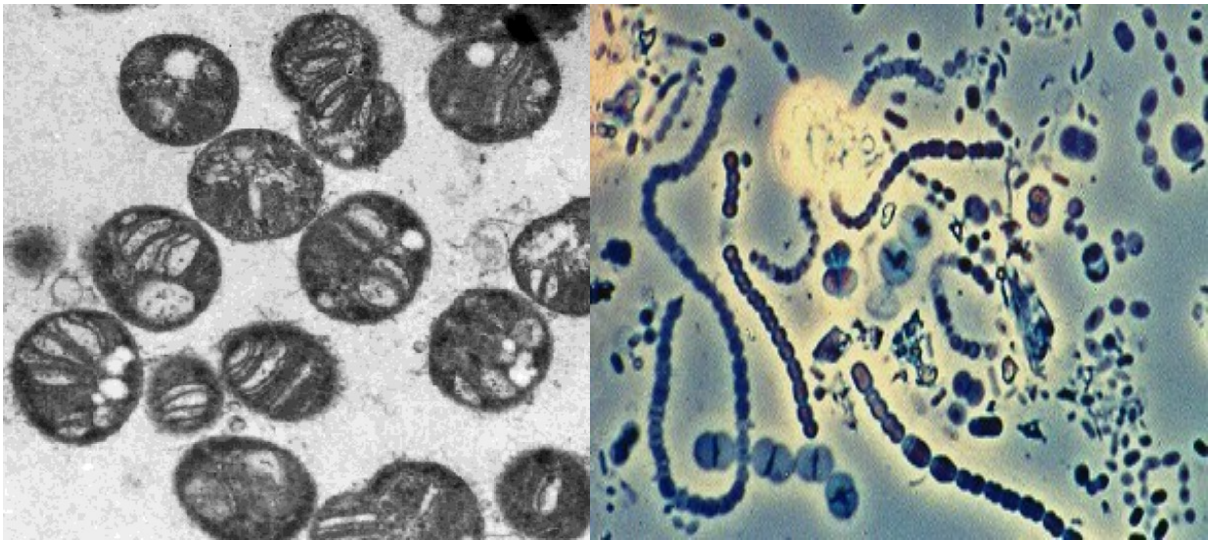

Рис. 2.1 та 2.2. *Methylococcus capsulatus* у світловому мікроскопі при збільшенні ×90.

2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки

По відношенню до кисню *Methylococcus capsulatus* є облігатним аеробом, але може рости в умовах, в яких мало доступного молекулярного кисню.

По відношенню до температури – термофіл, здатний до росту при температурах від 15 до 48°C (оптимум 30–45°C).

Росте в середовищах, при значеннях pH між pH 5,5 і 8,5. Оптимум pH 6,5–7,0 - нейтрофіл.

За типом живлення *Methylococcus capsulatus* є хемоорганогетеротрофом, метанотрофом типу I. Метанотрофи — мікроорганізми, що можуть використовувати газ метан як єдине джерело вуглецю і енергії. Вони вимагають

одно-вуглецевих сполук і кисню для виживання, комбінуючи обидва для синтезу формальдегіду, який потім використовується для отримання органічних сполук. Окрім метану, *M. capsulatus* здатний окислювати деякі органічні водневі сполуки, такі як метанол. Є фіксаторами атмосферного азоту та облігатними утилізаторами сполук С1 для фіксації енергії та вуглецю [17].

2.4.Таксономічний статус біологічного агенту

Бактерії класифікують за способами їх за морфолого-культуральними(форма клітини, наявність джгутиків, рухливість утворення спор) та фізіолого-біохімічним ознаками(синтез певних ферментів споживання певних субстратів, джерел біогенних елементів) а також за генетичними ознаками найменш змінених генів.

Класифікація бактерій є більш консервативною ніж у грибів, оскільки мало разів змінювалася Єдина класифікація бактерій наведена у «Визначнику Берги», більш пізні видання –основана на морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних ознаках , більш пізні видання на цих та на філогенетичних ознаках(підходах)

Перша комплексна класифікація базувалися лише на морфолого-фізіологічних бактерій і була викладена у першому виданні Визначника бактерій Берги у 1923р , наступні видання враховували й належність видів до певних місць існування та їх адаптацію до цих умов заносили стосовно нових відкритих мікроорганізмів за вищезазначеним підходом до 1986 р до 9 видання визначника Бергі.[18].

Філогенетична класифікація бактерій Берги, що спиралася на морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Methylococcus capsulatus* : [19].

Домен – *Bacteria*

Тип – *Proteobacteria*

Клас – *Gammaproteobacteria*

Порядок – *Methylococcales*

Родина – *Methylococcaceae*

Рід – *Methylococcus*

Повний геном *M. capsulatus (Bath)* складається з 3 304 561 пар основ з 63,6% вмістом Г-Ц. Загальна кількість CDS (передбачувана кодуюча послідовність) становить 3120 із середнім розміром 962 пари основ. Кількість оперонів рРНК (16S-23S-5S) у геномі *M. capsulatus (Bath)* становить 2, кількість генів тРНК — 46, а кількість генів sRNA — 3. 1766 білків відомої функції та ролі та 109 білків з відомою функцією, але невідомою рольовою категорією, було виявлено, що виконує функції, подібні до *M. capsulatus (Bath)* [19].

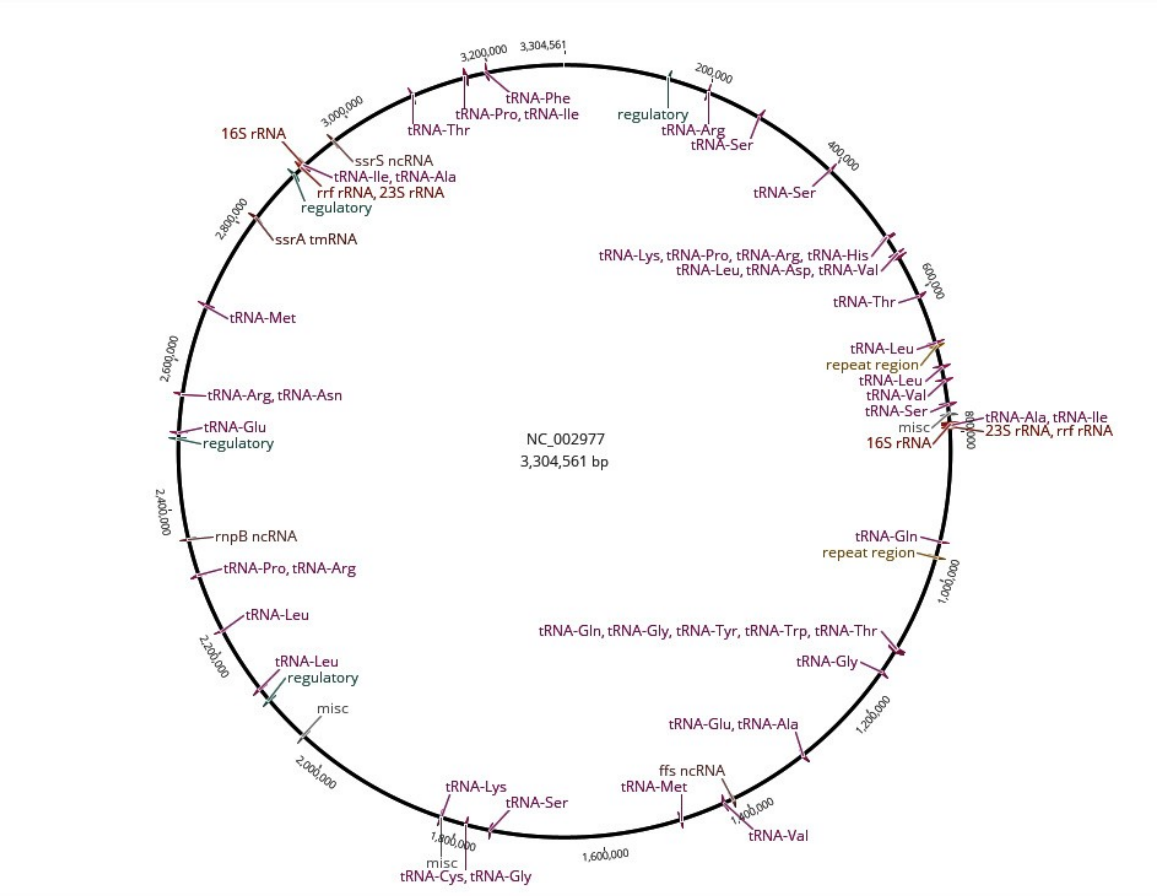

Рис. 2.3. Геном Methylococcus capsulatus.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Однією з найбільших екологічних проблем промислових ферм є утворення великої кількості гною або посліду. В Україні наразі немає жорстких вимог до того, як ферми будуть утилізувати відходи. Гній або послід може накопичуватися та зберігатися у спеціальних сховищах (з можливим подальшим компостуванням, або вельмикультивуванням частини фракції при розділенні на фракції), піддаватися анаеробній біологічній обробці для одержання біогазу, фізико-хімічній або механіко-біологічній обробці [20].

Сучасним підходом у боротьбі із надмірністю промислових відходів є їх переробка у біогаз – газ, утворюваний за допомогою бактерій, склад якого схожий на природний газ: до 98% метану разом із сірководнем, вуглекислим газом, водою тощо. Таким чином розкладання біомаси (відходів) відбувається під впливом трьох основних видів бактерій: гідролітичних, кислотоутворюючих і метаноокиснювальних [21]. Сировиною-брагою для нього можуть бути технічні культури (ріпак, верба), гній тварин, будь-який жом – буряковий, ягідний, овочевий, а також солома або очерет [22].

Біогаз має ряд переваг перед природним газу, а саме:

- виготовляється з біологічної сировини, тому його виробництво та спалювання є етапами природного кругообігу вуглецю, який не призводить до накопичення природного газу в атмосфері та парниковий ефект;

- природний газ видобувається з надр землі і не є компонентом атмосфери, тому її горіння призводить до накопичення вуглекислого газу [23].

Створення енергогенерації, що працює на біогазі, – доволі новий напрям для України. До 2012 року в країні було лише сім біогазових комплексів, встановлених на полігонах твердих побутових відходів. Проте, у 2013 році перші біогазові комплекси почали вводити в експлуатацію й сільського підприємства [24].

Відкриття першої черги біогазового комплексу на території Теофіпольського цукрового заводу в Хмельницькій області відбулося у грудні 2017 року. Другу чергу ввели в експлуатацію у червні 2018 року, вона працювала в тестовому режимі й ось нарешті вийшла на проектну потужність – 15,6 МВт. Відкриття біогазової установки позитивно вплинуло на соціально-економічний розвиток району. Завдяки реалізації таких проектів сьогодні район посідає 2-ге місце у Хмельницькій області. Наразі це – перша в Україні й найбільша у світі станція з виробництва біогазу, яка працює за технологією високонавантажених реакторів [25].

Зброджування гною або посліду дасть змогу частково вирішити проблеми з відходами тваринництва, а саме зменшити ризик забруднення ґрунтів та води, зменшити викиди в атмосферу та вплив на зміни клімату. Біогаз, отриманий зброджуванням відходів тваринництва, може використовуватися для виробництва електроенергії та тепла, замінювати викопні енергоносії, такі, як вугілля, природний газ і нафта, використання яких спричиняє велику кількість парникових викидів [26].

Біогаз також можна розглядати як економічний субстрат для культивування метанотрофних мікроорганізмів, зокрема для одержання мікробного білка. У проектованому нами виробництві основна маса утвореного біогазу в обраному тваринницькому комплексі буде використовуватися для

енергетичних потреб самого господарства і лише невелика, а саме близько 0,1% – на потреби культивування.

3.2. Обрахунок річної потужності виробництва білка одноклітинних організмів

У табл. 3.1 представлено узагальнену інформацію щодо біогазових установок, працюючих на території України, зокрема біля відомих тваринницьких комплексів [27].

Таблиця 3.1

Робочі біогазові установки в Україні

Підприємство	**Рік запуску**	**Поголів'я**	**Види сировини**	**Об'єм сировини, т/добу**	**Встановлена електрична потужність, кВт$_e$**	**Постачальник технології**
Свиноферма комбінату «Запоріжсталь», м. Запоріжжя	1993	8000-12000	Гній свиней	20-22	–	Bigadan Ltd, Данія
Свиноферма корпорації «Агро-Овен», с. Оленівка, Дніпропетр. обл.	2003	15000	Гній свиней, жирові відходи забою птиці	80	180	BTG, Нідерланди
С/г компанія «Еліта», с. Терезине, Київська обл.	2009	1000	Гній ВРХ та свиней (90:10 за СР)	60	250	LIPP, Німеччина

Закінчення таблиці 3.1

Ферма ВРХ «УМК», с. В.Крупіль, Київська обл.	2009	4000+ 2000	Гній ВРХ	400	625+330	Зорг, Україна
Птахофабрика МХП «ОрільЛідер», с. Єлізаветовка, Дніпропетр. обл.	2012	–	Послід та силос	140 посліду та 80 силосу	5000	NVT, Нідерланди
Свинокомплекс Даноша, с. Копанки, ІваноФранківська обл.	2013	–	Гній свиней та відходи с/г	4000	1000	–

Як видно із даних табл. 1.1, переважна частина тваринницьких комплексів забезпечена біогазовими установками саме імпортного походження, лише ферма «УМК» користується послугами українського постачальника. Зважаючи на цю інформацію, можемо запропонувати сільсько-господарській компанії «Еліта» Київської області впровадити технологію окиснення метану та вуглекислого газу, що утворюються при переробці відходів у метантенку, у білок одноклітинних організмів за використання *M. capsulatus* NCIMB 11132.

Відомо, що при переробці 1 т сировини (відходів тваринницького комплексу) утворюється 350-400 м^3 біогазу [28]. Основний компонент біогазу – метан – складає близько 70 % [9] від встановленого об’єму, тобто 245 – 280 м^3.

Отже, із 60 т на добу відходів (господарства «Еліта) утвориться 14 700 м^3 (на рік 5 365 500 м^3) метану. Велику частину такого об'єму метану можна використати з метою поповнення саме енергетичних потреб самого підприємства, а частину – для виробництва білка одноклітинних організмів змішаною культурою. За використання *M. capsulatus* (Bath) NCIMB 11132 з гетеротрофними бактеріями (ацетогеннами) *Alcaligenes acidovorans*, *Aneurinibacillus danicus* і *Brevibacillus* sp. можна синтезувати білок, що накопичується у біомасі концентрацією 10,3 г/л [29].

За даними статті [10] із 9 частин метану можна одержати 10,3 г/л біомаси, тому із 1 частини буде 1,14 г/л. Пропонуємо, що із 5000 м^3 утворюваного метану за рік можна отримати таку кількість культурального середовища:

$5000 \cdot 1{,}14 = 5700$ л

Слід врахувати, що неминучим є утворення втрат при виділенні такого білку, що складають 30 %. Тому кількість культурального середовища становитиме:

$5700 \cdot 1{,}3 = 7410$ л

3.3. Розрахунок необхідної кількості циклів для виробництва білку і геометричного об'єму газового біореактору

Обрахуємо, який об'єм культурального середовища потрібно отримати за цикл біосинтезу, аби у подальшому розрахувати кількість стадій підготовки посівного матеріалу. Обираємо, що виробництво буде працювати протягом 130 трудоднів, тоді об'єм культурального середовища за добу складатиме:

$$V_д = V_{гп} / T_{тр} = 7410 / 130 = 57 \text{ л}$$

Кількість культурального середовища за цикл буде становити:

$$V_{цк} = (К_1 \cdot V_д \cdot T_{цф})/24 = (1{,}2 \cdot 57 \cdot 56) / 24 = 159{,}6 \text{ л/цикл},$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає в себе тривалість виробничого біосинтезу (48 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год). $К_1$ –

коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($К_1$ = 1,1 – 1,5).

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

Визначивши об'єм КС за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення $К_з$, визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$V_г = V_{цк} / К_з = 159,6/0,5 = 319,2$ л.

Зважаючи на дані щодо розмірів стандартних ферментерів, найближчим за геометричним об'ємом є газовий біореактор $V_ф$ = 300 л.

Наступним кроком уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$К_з = 146,3/300 = 0,53$ – значення задовольняє діапазон, встановлений для аеробних мікроорганізмів .

3.4. Розрахунок потрібної кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Як попередньо зазначалося, за один виробничий цикл отримують 159,6 л культурального середовища.

При отриманні культурального середовища слід враховувати втрати цього середовища через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15 відсотків.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-Е_ф) = 159,6/0,9 = 177,3$ л,

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

Отже, робочий об'єм ферментера перед біосинтезом дорівнює 177,3 л. За попередньо обраного коефіцієнта заповнення 0,5 геометричний об'єм ферментера складатиме: $V_ф = 177,3/0,5 = 354,6$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф}$ = 300 л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $К_{з1} = 177,3/300 = 0,59$.

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 35 % від об'єму поживного середовища, оскільки частка *M. capsulatus* складає 10 %, а *A. acidovaorans* становить 10% і по 7,5% *Brevibacillus sp.* і *A. danicus* [7]. Тоді об'єм поживного середовища для біосинтезу у виробничому ферментері буде становити:

$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+X_ф) = 177,3/(1+0,35) = 131,3$ л,

де $X_ф = 0,35$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Тому кількість посівного матеріалу становить: $V_{пм1} = V_{роб.1} – V_{пс1} = 177,3 – 131,3 = 46$ л.

Також слід передбачити, що під час одержання 46 л інокуляту в посівному апараті 10 % культурального середовища буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тому об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$V_{роб.2} = V_{пм1}/(1-E_{па}) = 46/0,9 = 51,1$ л.

Обрахований об'єм інокуляту 51,1 л за коефіцієнта заповнення 0,5 можна одержати в посівному апараті об'ємом: $V_{па2} = 51,1/0,5 = 102,2$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{с.па1} = 100$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $К_{з.2} = 51,1/100 = 0,51$.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 35% від об'єму поживного середовища. Тоді об'єм поживного середовища для одержання інокуляту у посівному апараті буде становити:

$V_{пс2} = V_{роб.2}/(1+X_{па}) = 51,1/(1+0,35) = 37,8$ л,

де $X_ф = 0,35$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Звідси випливає, що кількість посівного матеріалу: $V_{пм2} = V_{роб.2} – V_{пс2} = 51,1 – 37,8 = 13,3$ л.

З урахуванням втрат 10% культурального середовища через колектор відпрацьованого повітря, об'єми поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті будуть наступними:

$V_{роб.3} = V_{пм2}/0,9 = 13,3/0,9 = 14,78$ л.

Об'єм інокуляту 13,3 л за коефіцієнта заповнення 0,5 можна отримати в інокуляторі об'ємом: $V_{ін1} = 13,3/0,6 = 26,6$ л. Обираємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{с.ін1} = 30$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $К_{з.3} = 14,78/30 = 0,5$.

Кількість посівного матеріалу становить 35 % від об'єму поживного середовища. Тоді об'єм поживного середовища в інокуляторі буде складати:

$V_{пс3} = V_{роб.3}/(1+X_{ін}) = 14,78/(1+0,35) = 10,95$ л,

де $X_{ін} = 0,35$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Звідси кількість посівного матеріалу: $V_{пм3} = V_{роб.3} – V_{пс3} = 14,78 – 10,95 = 3,83$ л.

З урахуванням того, що під час одержання 3,83 л посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культурального середовища буде втрачено через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме:

$V_{роб.4} = V_{пм3}/0,9 = 3,83/0,9 = 4,26$ л.

Об'єм інокуляту 4,26 л за коефіцієнта заповнення 0,5 можна отримати в інокуляторі об'ємом: $V_{ін2} = 4,26/0,5 = 8,52$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{с.ін2} = 10$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $К_{з.4} = 4,26/10 = 0,43$.

На посівний матеріал припадає 35 % від об'єму поживного середовища. Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$V_{пс4} = V_{роб.4}/(1+X_{ін}) = 4,26 /(1+0,35) = 3,15$ л,

де $X_{ін} = 0,35$ – встановлена доза посівного матеріалу для інокулятора.

Звідси кількість посівного матеріалу: $V_{пм4} = V_{роб.4} – V_{пс4} = 4,26 – 3,15 = 1,11$ л.

Для одержання посівного матеріалу $V_{пм4} = 1,11$ л для засіву малого інокулятора можна культивуванням бактерій у колбах на качалці. Для цього

обираємо качалочні колби об’ємом $V_{колб}$ = 750 мл з коефіцієнтом заповнення $К_{зк}$ = 0,2.

Тоді кількість колб становить:

$N_{колб} = V_{пм4}/(V_{колб}*К_{зк}) = 1110/(750*0,2) = 7,4 \approx 8$ колб

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу мікробного білку бактеріальним консорціумом *M. capsulatus* (Bath) NCIMB 11132 з гетеротрофними бактеріями (ацетогеннами) *A. acidovorans*, *A. danicus* і *Brevibacillus* sp. необхідно встановити газовий біоректор для біосинтезу об’ємом 300 л, посівний апарат об’ємом 100 л, інокулятори по 30 та 10 л та підготувати 8 качалочних колб.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Катаболізм ростового субстрату у *Methylococcus capsulatus*

Methylococcus capsulatus здатні використовувати метан як єдине джерело вуглецю і енергії. Під час росту на метані відновлювальні еквіваленти для дихального ланцюга можуть бути отримані тільки окисненням метану CH_4 до CO_2, оскільки в цих умовах не утворюється ацетил-КоА, необхідний для окиснення в ЦТК.

Анаболічний (конструктивний) метаболізм метанотрофів розходиться з енергетичним метаболізмом на рівні формальдегіду.

В аеробних умовах метанотрофи об'єднують кисень і метан з утворенням формальдегіду , який потім включається в органічні сполуки через сериновий шлях або шлях рибулози монофосфату (RuMP) і вуглекислий газ, який вивільняється. Метанотрофи типу I є частиною *Gammaproteobacteria* і використовують шлях RuMP для асиміляції вуглецю [19].

Рибулозомонофосфатний цикл. Інша назва цього циклу гексулозофосфатний цикл. Основними реакціями циклу є конденсація рибулозо-5-фосфату та формальдегіду під дією ключового ферменту гексулозофосфатсинтази і ізомеризація продукту реакції у фруктозо-6-фосфат. Акцептор (рибулозо-5-фосфат) регенерується під дією ферментів транкетолази та трансальдолази. У результаті функціонування циклу три молекули формальдегіду перетворюються в молекулу диоксиацетонфосфату, який може використовуватись для конструктивного метаболізму.

Суттєвою особливістю метаболізму метанокислюючих бактерій з гексулозофосфатним шляхом є дефект у циклі Кребса – відсутність 2-оксоглутаратдегідрогенази. У зв'язку з цим цикл Кребса відіграє винятково біосинтетичну роль, а анаплеротичною реакцією, в якій синтезуються С4 дикарбонові кислоти, є карбоксилювання фосфоенолпірувату. Вуглеводи синтезуються шляхом глюконеогенезу [30].

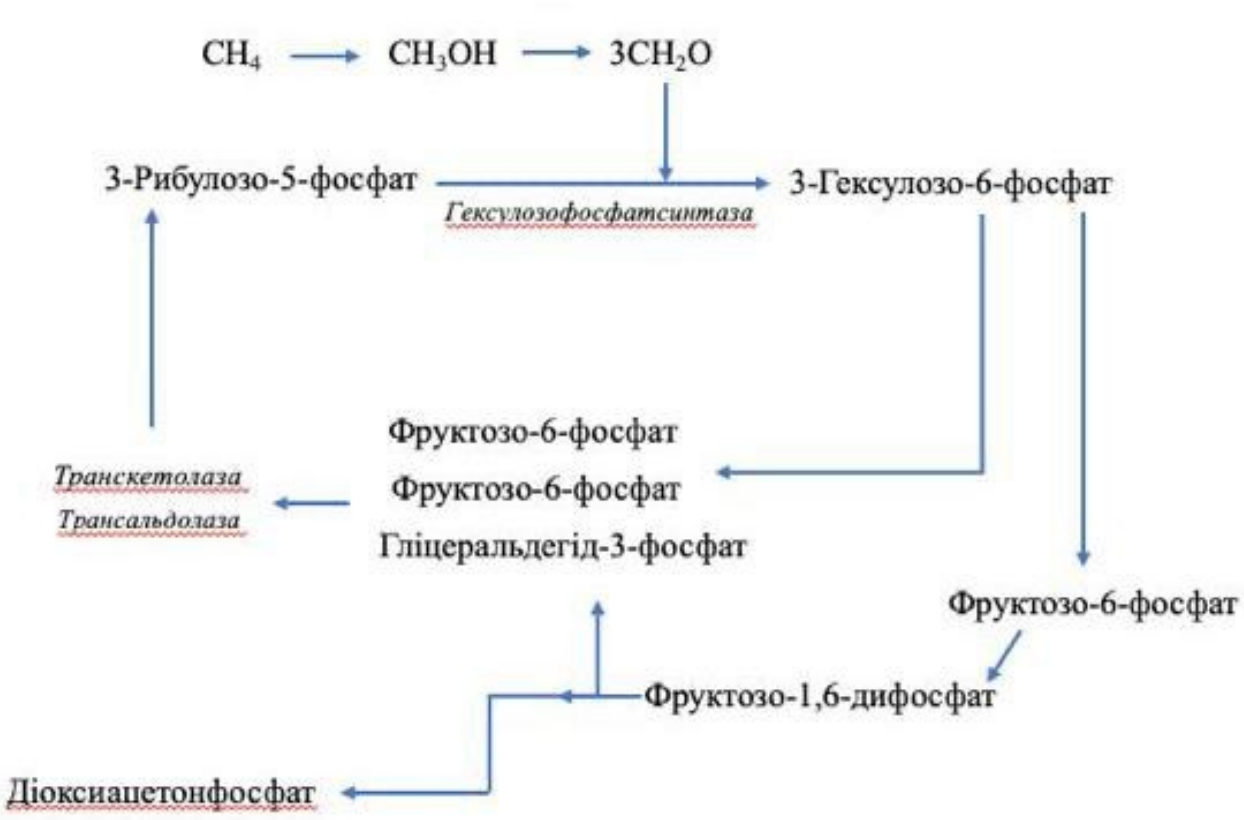

Рис. 4.1. Перетворення метану в формальдегід і рибулозомонофосфатний цикл фіксації формальдегіду

Метанотрофи унікальні тим, що володіють метан-монооксигеназами (ММО), які каталізують перший етап окислення метану. Відомо, що *M. capsulatus* генерує мембранно-зв'язану форму, рММО, і розчинну форму,

sMMO, і ці два ферменти були добре вивчені, оскільки їхня здатність здійснювати окислення метану.

Methylococcus capsulatus (Bath) здатний експресувати два різних типи метан-монооксигеназ: розчинну форму метан-монооксигенази (sMMO) і дисперсну або мембранно-зв'язану форму (pMMO). На експресію цих ферментів сильно впливає позаклітинна концентрація міді; коли M. capsulatus (Bath) вирощують у присутності низьких рівнів міді, sMMO є активним, тоді як pMMO є переважно активним при високих рівнях. Обидва ферменти потребують зовнішнього донора електронів, щоб розірвати зв'язок C-H у метані. Хоча донором електронів для sMMO є NADH, нативний відновник для pMMO ще не з'ясований через труднощі з очищенням ферменту. і перевірити його активність in vitro.

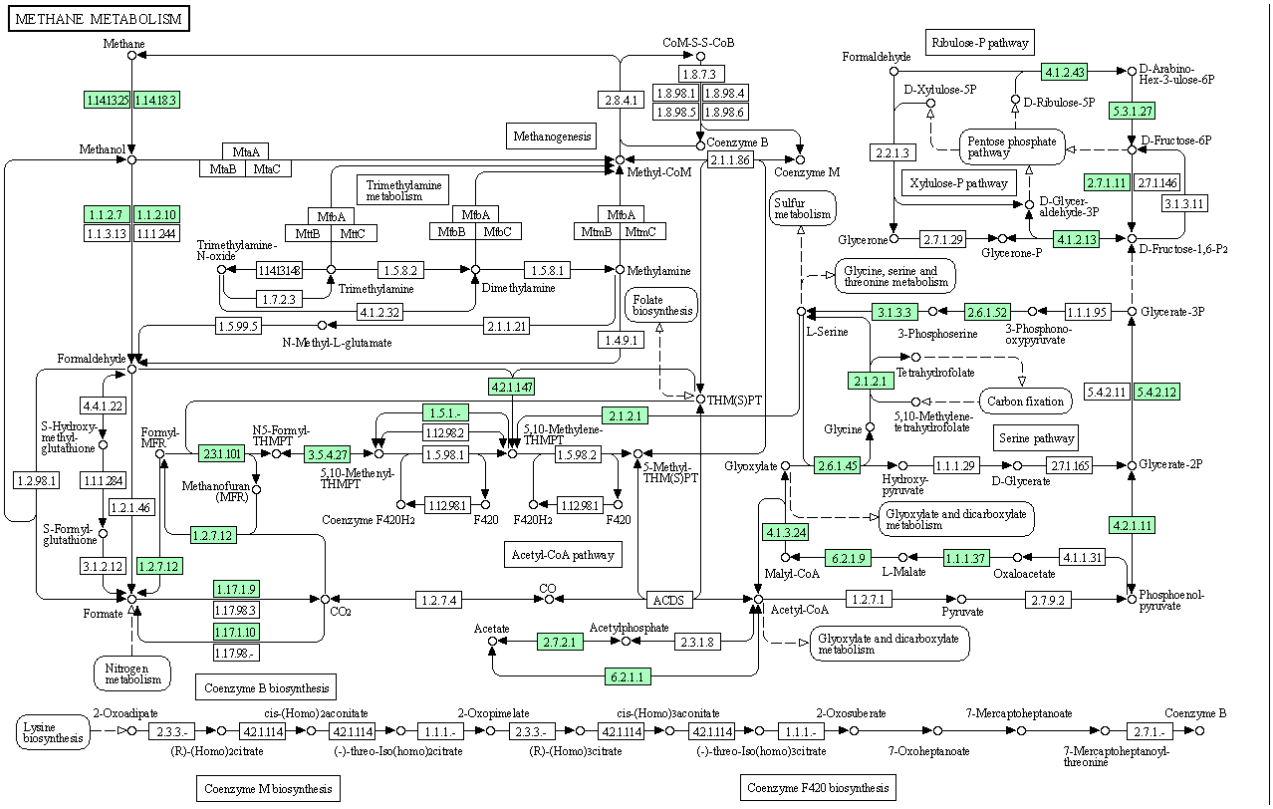

Рис. 4.4. Метаболізм метану *Methylococcus capsulatus* [19 ,30].

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Вибір умов і способу культивування

Культивування мікроорганізмів у газовому біореакторі з надлишком карбоно- та нітрогеномісного середовища є ефективним методом виробництва біологічних продуктів. Основною особливістю цього процесу є контрольоване оточення, в якому мікроорганізми ростуть і розмножуються. Особливості культивування мікроорганізмів у газовому біореакторі включають наступне:

- Регульовані умови: Газові біореактори забезпечують можливість контролювати температуру, рівень кисню, pH-середовище, концентрацію поживних речовин та інші фактори, які впливають на ріст та метаболізм мікроорганізмів. Це дозволяє оптимізувати умови для максимального виробництва бажаного продукту.

- Висока масштабованість: Газові біореактори можуть мати різний об'єм, починаючи від кількох літрів і до десятків кубометрів. Це дає можливість масштабувати процес виробництва в залежності від потреб. Великі біореактори часто використовуються в промисловому масштабі для виробництва комерційних біологічних продуктів.

- Аеробні та анаеробні процеси: Газові біореактори можуть бути налаштовані як для аеробних (з киснем) так і для анаеробних (без кисню) процесів. Це дозволяє вирощувати широкий спектр мікроорганізмів, які потребують різних умов для свого росту та метаболізму [31].

Отже, особливості культивування мікроорганізмів у газовому біореакторі можна розглядати з кількох аспектів:

Контрольоване середовище: Газові біореактори забезпечують можливість створювати та підтримувати оптимальні умови для росту і розмноження мікроорганізмів. Різні параметри, такі як температура, pH-середовище, концентрація кисню або інших газів, тиск, а також концентрація поживних речовин, можуть бути точно контрольовані та налаштовані для задоволення потреб культур.

- Масштабованість: Газові біореактори можуть мати різний об'єм, від невеликих лабораторних масштабів до великих промислових систем. Масштабованість є важливою особливістю, оскільки дозволяє збільшувати обсяг виробництва в залежності від потреб. Великі біореактори використовуються в промисловості для виробництва різноманітних біологічних продуктів, таких як ферменти, біологічно активні речовини, антитіла тощо.

- Режими аерації: Газові біореактори можуть бути налаштовані для проведення як аеробних, так і анаеробних процесів. У аеробних умовах мікроорганізми використовують кисень для свого росту та метаболізму, тоді як у анаеробних умовах вони працюють без доступу до кисню. Це дозволяє культивувати широкий спектр мікроорганізмів, включаючи ті, що здатні до ферментації та інших анаеробних процесів.

- Використання носія: У газовому біореакторі мікроорганізми часто ростуть на носію або матеріалі, який надає їм опору та поверхню для прикріплення. Цей носій може бути наприклад пластиковими матеріалами, сіткою, губкою або пластинами. Використання носія дозволяє збільшити поверхню доступу для росту мікроорганізмів, що забезпечує більшу густину мікробної суспензії в біореакторі і збільшує продуктивність процесу. Наприклад, у виробництві бактеріальних біоплівок, підкладка допомагає стабілізувати ріст бактерій і забезпечує їх ефективну функціональність [32].

- Контроль незапланованих реакцій: Газові біореактори дозволяють здійснювати контроль над незапланованими реакціями та уникати небажаних

процесів. Наприклад, в процесах ферментації може відбуватися непередбачуване нагрівання через виділення тепла. У газовому біореакторі можуть бути встановлені системи охолодження або контрольованого введення холодного газу для підтримки оптимальної температури.

- Керованість та автоматизація: Газові біореактори можуть бути повністю автоматизованими та керованими за допомогою комп'ютерних систем. Це дозволяє точно контролювати всі параметри процесу, від дозування поживних речовин до моніторингу росту мікроорганізмів. Керованість та автоматизація забезпечують стабільність та ефективність виробництва.

- Енергоефективність: Газові біореактори можуть бути більш енергоефективними порівняно з іншими методами культивування мікроорганізмів, такими як ферментери або планшетні культури. Це пов'язано з можливістю контролювати аерацію, використання ефективних систем змішування та оптимізації енергетичних процесів в біореакторі. Енергоефективність допомагає знижувати витрати на енергію та екологічний вплив процесу.

- Гнучкість та адаптивність: Газові біореактори є гнучкими та адаптивними до різних типів мікроорганізмів та процесів. Вони можуть бути налаштовані для різних видів культур, включаючи бактерії, гриби, дріжджі та водорості. Крім того, газові біореактори можуть бути використані для різних типів процесів, таких як виробництво ферментів, біологічно активних речовин, біопалива або водню. Це дає можливість адаптувати процес до конкретних потреб та вимог [27].

Methylococcus capsulatus - це метанотрофний бактеріальний вид, який володіє здатністю окислювати метан для свого росту та метаболізму. Вирощування *Methylococcus capsulatus* у газовому біореакторі може мати деякі особливості, які варто враховувати:

- Постачання метану: *Methylococcus capsulatus* є метанотрофом, тому для його культивування важливо забезпечити постійне постачання метану в біореактор. Це може здійснюватися шляхом забезпечення відповідних умов газообміну у біореакторі, таких як аерація або нагнітання газу.

- Наявність кисню: *Methylococcus capsulatus* є мезофільними організмами, що означає, що вони вимагають наявності кисню для свого росту. Газовий біореактор повинен бути налаштований таким чином, щоб забезпечити достатнє аерацію та достатню концентрацію кисню для *Methylococcus capsulatus*.

- Регулювання pH: pH-рівень середовища також має значення для культивування *Methylococcus capsulatus*. Зазвичай оптимальний pH для цього виду лежить в діапазоні 6,5-7,5. Газовий біореактор має бути здатним контролювати та підтримувати потрібний pH-рівень шляхом додавання лужних або кислих розчинів.

- Поживні речовини: Для ефективного росту *Methylococcus capsulatus* необхідні поживні речовини, такі як мінеральні солі та вуглеводи. Газовий біореактор повинен забезпечити наявність необхідних поживних речовин шляхом додавання відповідних розчинів або субстратів.

- Температура: *Methylococcus capsulatus* має оптимальний діапазон температур для свого росту, який зазвичай коливається від 25 до 40 градусів Цельсія. Газовий біореактор повинен бути здатним підтримувати стабільну температуру в межах цього діапазону шляхом використання системи регулювання та контролю температури.

- Система змішування: Забезпечення ефективного змішування реакційної суміші є важливим аспектом культивування *Methylococcus capsulatus* у газовому біореакторі. Це допомагає забезпечити розподіл метану та кисню, поживних речовин і забезпечити однорідність умов для росту мікроорганізмів. Газовий біореактор може мати механічні системи змішування, такі як пропелери або

ротори, або використовувати повітряні струмені або газову аерацію для забезпечення змішування.

- Моніторинг та контроль: У газовому біореакторі важливо мати систему моніторингу та контролю параметрів, таких як рівень кисню, pH, температура та інші, для підтримки оптимальних умов для росту *Methylococcus capsulatus*. Це може включати в себе використання датчиків та автоматичних регуляторів, які дозволяють стежити за параметрами та виконувати необхідні корекції [28].

- Стерильність: Забезпечення стерильних умов є важливим аспектом вирощування *Methylococcus capsulatus* у газовому біореакторі. Це допомагає запобігати контамінації культури небажаними мікроорганізмами та забезпечує чистоту процесу. Газовий біореактор повинен бути конструйований та обладнаний таким чином, щоб забезпечити стерильність. Це може включати в себе використання автоклавування для стерилізації реактору та всіх використовуваних пристроїв та матеріалів перед початком культивування. Крім того, можуть використовуватися фільтри для газу та рідини, що входять і виходять з біореактора, щоб запобігти потенційній контамінації.

- Моніторинг росту: Важливо проводити моніторинг росту *Methylococcus capsulatus* у газовому біореакторі для визначення його фізіологічних параметрів та оцінки продуктивності. Це може включати в себе вимірювання концентрації бактерій, споживання метану, вироблення біомаси або виробництва біопродуктів. Методи моніторингу можуть варіюватися в залежності від конкретних цілей і вимог дослідження.

- Оптимізація параметрів: В процесі вирощування *Methylococcus capsulatus* у газовому біореакторі може виникати необхідність оптимізувати різні параметри, такі як рівень кисню, pH, температура, постачання поживних речовин та інші. Це може включати настройку режимів аерації, регулювання pH за допомогою буферів або кислот, оптимізацію температурного режиму та інші корекції [6-8].

5.2. Вибір типу газового ферментера.

Газові ферментери, також відомі як газові біореактори, є контейнерами або системами, які використовуються для культивування мікроорганізмів або клітин у присутності газової фази. Існують різні типи газових ферментерів, які можуть варіюватися за конструкцією, формою та способом подачі газів. Деякі типи газових ферментерів включають:

- Потокові реактори: Це тип газового ферментера, де культура переміщується через реактор за допомогою потоку газу або рідини. Вони можуть бути вертикальними або горизонтальними, а гази і рідини можуть бути змішані з використанням пропелерів або інших змішувальних пристроїв.

- Шарові ферментери: Це тип газового ферментера, який має форму сфери або циліндра з нижнім входом газу та верхнім виходом газу. Вони можуть мати систему змішування, таку як пропелери або спеціальні системи змішування для забезпечення рівномірного розподілу газу.

- Пузирчасті ферментери: Цей тип газового ферментера використовує подачу газу у вигляді пузирів через нижнє дно ферментера. Пузирчасті струмені газу забезпечують змішування та доставку газу до культури, що сприяє ефективному обміну газів.

- Мембранні ферментери: Це тип газового ферментера, який використовує мембрану або полімерний матеріал для забезпечення контрольованої передачі газу у культуру. Гази можуть проникати через мембрану, забезпечуючи поступове вивільнення газу у культурі.

- Гель-ферментери: Цей тип газового ферментера використовує гельову матрицю як носій для культури. Гель може бути наповнений газом, або газ може бути постачаний через пористу структуру гелю. Газ проникає через гель і

забезпечує рівномірне поширення газу по всьому об'єму гелю, сприяючи змішуванню та обміну газів з культурою.

- Вертикальні ферментери: Це тип газового ферментера, який має вертикальну орієнтацію. Вони зазвичай мають конічну форму з нижнім входом газу і верхнім виходом газу. Вертикальні ферментери можуть бути оснащені системами змішування, такими як пропелери або ротори, для забезпечення рівномірного розподілу газу та змішування культури.

- Модульні ферментери: Це тип газового ферментера, який складається з модульних блоків або реакторних одиниць, які можуть бути з'єднані для збільшення об'єму реактора або легко розбираються для очищення та обслуговування. Це дозволяє гнучко контролювати розмір та об'єм ферментера залежно від потреб.

- Біосорбційні ферментери: Цей тип газового ферментера використовує спеціальні матеріали, відомі як біосорбенти, для поглинання та утримання газу. Біосорбенти можуть бути вбудовані в реактор або мати форму зерен або часток, які розміщуються в реакторі. Газ проходить через біосорбент, де відбувається його взаємодія з мікроорганізмами або клітинами, що забезпечує обмін газів [28, 29].

Ці типи газових ферментерів представляють лише деякі з можливих варіацій. В реальності існує багато інших типів газових ферментерів, які можуть бути використані в залежності від конкретних потреб та дослідницьких цілей. Наприклад:

- Фіксовані фільми: Це тип газового ферментера, де культура росте на поверхні фіксованого матеріалу, такого як сітка, керамічні частки або пластикові модулі. Газ пропускається через матеріал, і мікроорганізми або клітини прикріплюються до поверхні, забезпечуючи реакцію з газовою фазою.

- Мініатюрні ферментери: Це компактні ферментери, які мають невеликий об'єм, часто в мілілітровому або мікролітровому діапазоні. Вони використовуються для високопродуктивних досліджень і тестування реакційних умов в малих масштабах.
- Газові ферментери з рухоммим шаром: Це тип ферментера, де культура знаходиться на рухомому елементі, що обертається або рухається в реакторі. Це сприяє змішуванню і обміну газів та поліпшує ефективність процесу.
- Аеробні та анаеробні ферментери: В залежності від вимог мікроорганізмів або клітин, газові ферментери можуть бути налаштовані для аеробних (з наявністю кисню) або анаеробних (без кисню) режимів культивування.
- Мембранні ферментери: Цей тип газового ферментера використовує мембрану або полімерний матеріал для розділення газової фази від рідинної фази. Газ проникає через мембрану, забезпечуючи контрольовану передачу газу до культури, тоді як рідина залишається у ферментері. Це дозволяє забезпечити оптимальні умови для мікроорганізмів або клітин, зменшуючи вплив газу на рідину.
- Вакуумні ферментери: Це тип газового ферментера, в якому забезпечується умовне середовище шляхом використання вакууму. Зниження тиску у ферментері дозволяє забезпечити контрольовану подачу газу до культури. Вакуум може використовуватися для змішування, вивільнення газів з культури або для створення специфічних умов росту.
- Мультифазні ферментери: Це тип газового ферментера, в якому відбувається одночасне культивування кількох фаз, таких як газ, рідина і твердий матеріал. Наприклад, це може бути культивування мікроорганізмів на поверхні твердих частинок або пористих матеріалів у присутності газу та рідини.

- Іммобілізовані ферментери: Цей тип газового ферментера використовує іммобілізовані мікроорганізми або клітини, які прикріплюються до носія, такого як гель, сітка, піна або тверді частинки. Гази проходять через носій, що забезпечує взаємодію мікроорганізмів або клітин з газовою фазою для реакцій [32].

Для вирощування *Methylococcus capsulatus*, метанотрофної бактерії, яка здатна окислювати метан, можуть бути використані кілька типів газових ферментерів котрі перераховувалися вище в контексті.

Оптимальний тип ферментера залежить від кількох факторів, включаючи масштаб вирощування, кількість газу, необхідну для постачання, і ефективність обміну газів з мікроорганізмами.

З урахуванням особливостей *Methylococcus capsulatus*, таких як його здатність до окислення метану, оптимальним типом ферментера може бути:

- Пухирчасті (петлеві) ферментери забезпечують ефективне змішування і доставку метану до культури *Methylococcus capsulatus*. Пухирчасті струмені метану забезпечують розподілення газу по всьому об'єму ферментера і поліпшують обмін газів між метаном і мікроорганізмами. Це сприяє підтриманню оптимальних умов для росту та активності *Methylococcus capsulatus*, забезпечуючи достатню кількість метану. Крім того, пухирчасті ферментери можуть бути використані як великомасштабні системи, що підходять для промислового вирощування *Methylococcus capsulatus*. Вони також легкі у використанні та контролі, що дозволяє забезпечити стабільні умови культивування та оптимальну продуктивність [33].

Отже, пухирчастий ферментер може бути оптимальним вибором для вирощування *Methylococcus capsulatus*. Також слід навести додаткові переваги, а саме:

1. Ефективне змішування: Пухирчасті ферментери забезпечують інтенсивне змішування культури *Methylococcus capsulatus*. Це допомагає підтримувати

однорідність умов росту та розподіл метану по всьому об'єму ферментера. Рівномірне змішування сприяє рівномірному росту мікроорганізмів і підвищує продуктивність.

2. Поліпшений обмін газів: Пухирчасті струмені метану, які формуються в пузирчастому ферментері, забезпечують ефективний обмін газів між метаном і *Methylococcus capsulatus*. Це важливо для забезпечення достатньої кількості метану для росту та метанотрофних процесів. Ефективний обмін газів допомагає знизити втрати метану та покращити використання його мікроорганізмами.

3. Легка масштабованість: Пухирчасті ферментери можуть бути легко масштабовані для вирощування *Methylococcus capsulatus* у великих масштабах. Це особливо важливо в промислових масштабах, де потрібно вирощувати значні обсяги мікроорганізмів для виробництва біопродуктів.

4. Контрольовані умови: Пухирчасті ферментери дозволяють забезпечити контрольовані умови культивування *Methylococcus capsulatus*. Параметри, такі як температура, pH, концентрація метану та інші фактори, можуть бути легко контрольовані та регульовані для оптимального росту і продуктивності мікроорганізмів [34].

5.3. Обгрунтування вибору та опис стадій санітарної підготовки виробництва білка

При виборі миючих та дезінфікуючих засобів на будь-якому підприємстві потрібно враховувати кілька ключових аспектів. По-перше, не можна застосовувати тривалий час один вид дезінфікуючого засобу, оскільки це може призвести до виникнення резистентної мікрофлори. Тому слід комбінувати та чергувати різні види миючих засобів. Зокрема, рекомендується змінювати дезінфікуючий засіб кожні два тижні або застосовувати кілька типів одночасно, що допоможе запобігти розвитку стійких штамів мікроорганізмів.

При виборі підходящого дезрозчину варто орієнтуватися на кілька основних критеріїв: ціна, ефективність проти різних форм мікроорганізмів, доступність, токсичність, вплив на поверхні та матеріали, стійкість до умов навколишнього середовища, легкість у використанні та екологічність. Вартість засобу повинна відповідати бюджету підприємства, при цьому не жертвуючи ефективністю. Засіб повинен мати широкий спектр дії, включаючи бактерицидні та фунгіцидні властивості, щоб ефективно знищувати бактерії, гриби, віруси та інші патогенні мікроорганізми. Засіб має бути легко доступним для постійного постачання, щоб уникнути перебоїв у процесі дезінфекції [35].

Використовуваний засіб не повинен мати шкідливого впливу на організм людини. Важливо забезпечити, щоб концентрація активної речовини була достатньо ефективною, але при цьому безпечною для здоров'я працюючого персоналу. Дезінфікуючий засіб не повинен пошкоджувати оброблювані поверхні та матеріали. Слід враховувати сумісність з різними типами поверхонь, щоб запобігти корозії або деградації матеріалів.

Засіб має бути ефективним в умовах, які характерні для конкретного підприємства, включаючи температуру, вологість та наявність органічних матеріалів, які можуть впливати на активність дезінфектанту. Препарат повинен бути зручним у застосуванні, включаючи простоту приготування робочих розчинів та можливість використання за допомогою стандартного обладнання для прибирання та дезінфекції. Перевага надається дезінфікуючим засобам, які є біорозкладними та не завдають шкоди навколишньому середовищу після використання [36].

Врахування всіх цих факторів дозволяє підприємству забезпечити ефективну дезінфекцію, мінімізуючи ризики для здоров'я персоналу та забезпечуючи стійкість проти широкого спектра мікроорганізмів. Крім того, регулярне чергування та комбінування різних дезінфікуючих засобів допомагає

підтримувати високу ефективність санітарних заходів і запобігає розвитку резистентності серед патогенів .

Обробка технологічних поверхонь

Перекис водню (H_2O_2)

Робоча концентрація дезінфікуючих розчинів на основі перекису водню може варіюватися від 3% до 30%, залежно від конкретних вимог та умов дезінфекції. Наприклад, для поверхневої дезінфекції, яка передбачає обробку різноманітних поверхонь, зазвичай використовують розчини з концентрацією 3%. Це пояснюється тим, що такий розчин виявляє високу ефективність у знищенні більшості мікроорганізмів, при цьому не викликає надмірної агресивності до матеріалів, які обробляються.

Щодо норм витрат, вони визначаються відповідно до розмірів та типу поверхонь, які потребують дезінфекції. Загалом, для забезпечення ефективного очищення та дезінфекції важливо, щоб розчин достатньою мірою покривав усі поверхні та обладнання. Це дозволить гарантувати, що всі мікроорганізми на оброблюваних поверхнях будуть знищені, і процес дезінфекції буде максимально ефективним [37]

Новохлор-екстра

Робоча концентрація: Для підготовки дезінфікуючого розчину Новохлор-екстра рекомендується розведення в пропорції 0,5% - це означає 910 мл засобу на 10 літрів робочого розчину.

Норми витрат: Поверхні рекомендується обробляти за допомогою ганчір’я, змоченого у розчині засобу в обсязі 100 мл на кожен квадратний метр поверхні. Рекомендований час дії для досягнення оптимального ефекту дезінфекції - 30 хвилин.

Новохлор-екстра є відмінним універсальним засобом для дезінфекції, що містить гіпохлорит натрію та інші допоміжні компоненти, такі як мийні,

ароматизуючі та антикорозійні речовини. Він ефективний проти широкого спектра мікроорганізмів та класифікується як помірно небезпечна речовина.

Однією з особливостей Новохлор-екстра є те, що його розчини з активним хлором у відсотках від 0,01% до 0,1% можуть використовуватися в присутності осіб, які не займаються проведенням дезінфекційних робіт. Це робить його досить практичним для використання у таких місцях, як медичні установи, громадські приміщення та інші, де потрібна регулярна дезінфекція.

Важливо також зазначити, що розчини Новохлор-екстра не завдають шкоди виробам з металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кераміки та різних покриттів. Це робить його універсальним засобом для використання в різних галузях, включаючи виробничі площі, медичні установи, громадські місця та інші. Його можна використовувати як вручну, так і для автоматизованих систем інтенсивного миття та дезінфекції [38].

Для ефективної обробки обладнання та миття резервуарів рекомендується використовувати спеціальні розчини, такі як розчини Ecolab та каустична сода. Ці засоби мають потужні властивості видалення забруднень та гарантують високий рівень гігієни, необхідний для забезпечення безпеки та якості продукції.

Для забезпечення максимальної зручності та ефективності процесу миття, рекомендується використовувати систему автоматичної мийки CIP (Cleaning in Place). Цей метод дозволяє проводити процедуру миття автоматично, без необхідності вручного втручання. Використання CIP-мийки є перевагою, оскільки воно значно зменшує витрати миючих засобів на 20%-30% у порівнянні з об’ємом, який потрібно для процесу миття вручну, де витрати можуть становити до 50% об’єму.

Такий підхід дозволяє ефективно використовувати ресурси та забезпечує високу якість очищення та дезінфекції обладнання, що є критичним для виробничих процесів та забезпечення безпеки продукції [38].

Біомой

Склад цього засобу включає ряд активних компонентів: алкілбензолсульфонат натрію, що також відомий як сульфонол, присутній у концентрації від 5,0% до 8,0%, та лужну протеазу, яка міститься у концентрації від 1,0% до 1,1%. Крім того, до складу входять натрій карбонат, який може виступати як розчинник або буфер, диспергатор для рівномірного розподілу компонентів у розчині та наповнювач для забезпечення стабільності засобу.

Призначення цього засобу включає дезінфекційне очищення різних видів виробів медичного призначення, що виготовлені з металу, скла, гуми та полімерних матеріалів. Серед таких виробів можуть бути жорсткі та гнучкі ендоскопи, медичні інструменти для гнучких ендоскопів, а також стоматологічні та хірургічні інструменти. Крім того, цей засіб може використовуватися для миття різних поверхонь приміщень, підлог, предметів догляду за хворими та предметів інтер'єру [39].

Застосування засобу розповсюджується на широкий спектр об'єктів і місць, включаючи навчально-виховні заклади, об'єкти комунально-побутового призначення, підприємства парфумерно-косметичної, мікробіологічної, харчової, переробної і фармацевтичної промисловості. Крім того, він застосовується в закладах ресторанного господарства і торгівлі, перукарнях, косметологічних салонах, аптеках, місцях тимчасового проживання та на транспорті. Цей широкий спектр застосування робить цей засіб надзвичайно універсальним для багатьох галузей та сфер діяльності [39].

Токсичність та безпечність: Біомой відноситься до помірно небезпечних речовин при введенні у шлунок, як це зазначено в ГОСТ 12.1.007 (3 клас небезпеки), та до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру (4 клас небезпеки). Він не проявляє шкірно-резорбтивних, шкірно-подразнювальних та сенсибілізуючих властивостей. У своїй нативній формі, як порошок, може викликати подразнення слизової оболонки очей та верхніх

дихальних шляхів. Проте при рекомендованих концентраціях він не подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів. Не виявлено мутагенних, канцерогенних та ембріотоксичних властивостей (за діючою речовиною). Використання робочих розчинів Біомою для ручного та механізованого достерилізаційного очищення виробів медичного призначення не становить загрози надходження його компонентів у повітря робочої зони, оскільки він не містить летких компонентів.

Робоча концентрація: Зазвичай робочий розчин Біомою має концентрацію 0,3%. Його використовують протягом доби після виготовлення, дотримуючись умов зберігання, щоб зберегти його ефективність. Невикористаний робочий розчин можна зберігати протягом 14 діб у тарі з щільно закритою кришкою.Норми витрат: 100 мл / $м^2$.

Для фармацевтичного обладнанні, що включають в себе змішувачі трубопроводів, псевдозріджені шари, резервуари та ємності для зберігання, рекомендується використовувати м'який лужний миючий засіб Ecolab COSA CIP 90. Склад цього засобу включає поверхнево-активну речовину та майже нейтральну формулу, що робить його придатним для чищення обладнання як вручну, так і за допомогою системи CIP.

Важливо відзначити, що цей засіб супроводжується повним пакетом валідації, що включає методи визначення прийнятних залишкових рівнів та аналітичні методи кількісного визначення залишків. Це робить його надійним і безпечним для застосування в фармацевтичній промисловості, де високі стандарти якості та безпеки мають велике значення. Використання Ecolab COSA CIP 90 допомагає забезпечити відповідність стандартам та знижує ризик виникнення проблем з якістю продукції [41].

Обробка рук персоналу

Засоби для дезінфекції рук, такі як "Стериліум" та "Неостерил М", є серед найпопулярніших у своєму класі. Однак, при виборі засобу для

регулярного застосування необхідно враховувати як його ефективність у боротьбі з мікроорганізмами, так і його вплив на шкіру, зокрема збереження її здоров'я.

"Стериліум" містить 2-пропанол, 1-пропанол та мецетроній етилсульфат. Ця комбінація компонентів робить його досить м'яким і ефективним у видаленні мікроорганізмів зі шкіри. За даними випробувань, "Стериліум" може зменшити кількість транзиторної мікрофлори на шкірі вдвічі всього за 30 секунд, і ця ефективність зберігається протягом години. Важливо також зазначити, що він не має подразнюючого впливу на шкіру та не порушує її водно-жировий баланс, а також має бактерицидну та фунгіцидну дію.

"Неостерил М" містить неіоногенні і амфотерні поверхнево-активні речовини, полігексанід та зволожуючі компоненти. Цей засіб також відзначається широким спектром антимікробної дії, включаючи бактеріцидну, фунгіцидну та віруліцидну активність. Цей засіб класифікується як засіб 4-го класу небезпеки, але вважається безпечним для шкіри рук персоналу [41].

З урахуванням цих фактів, «Неостерил М» є оптимальним вибором для регулярної обробки рук персоналу, оскільки забезпечує ефективний захист від мікроорганізмів, при цьому м'яко діє на шкіру, зберігаючи її здоров'я та комфорт [42].

Для встановлення обсягів поверхонь для обробки використаємо специфікацію обладнання з його габаритними розмірами. У ферментаційному відділенні наявні інокулятори та виробничий ферментер на 0,3 $м^3$. Висота ферментера становить близько 1,6 м, приймаємо висоту поверху – 3 м.

Загальна площа приміщення, де встановлено дане обладнання становить

4 м × 3 м = 12 $м^2$. Враховуючи, що поверхня стін даного приміщення теж підлягає миттю та дезінфекції на висоту 2,5 м, загальна площа обробки становитиме:

$\sum F = (4\ м \times 3\ м) + (3\ м + 3\ м + 4\ м + 4\ м) \times 2{,}5\ м = 12\ м^2 + 35\ м^2 = 47\ м^2$

Загальний обсяг обладнання, яке підлягає миттю, становить:

10+30+100+300 = 440 л

Оскільки при використанні CIP-мийки витрата становить 20% від обсягу обладнання, то поверхня для миття буде наступною:

440* 20% / 100% = 88 л

Дані щодо розрахунків розглянутих миючих та дезінфікуючих засобів представлено у табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Назва засобу	**Об'єкт миття та/або дезінфекції**	**Концентрація робочого розчину, %**	**Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, грн/л(кг)**	**Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, грн/л**	**Витрати робочого розчину, л/м2**	**Ефективність використання дез. розчину, Едз, грн/м2**
Перекис водню	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога	3%	91	2,73	0,1	0,03
Новохлор-екстра	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога	0,5%	108	0,54	0,1	0,005
Біомой	Обладнання	0,3%	459	1,37	0,1	0,01

Дані щодо розрахунків розглянутих миючих та дезінфікуючих засобів

5.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу і виробничого процесу

Максимальний синтез біомаси (10,3 г/л) досягається за умов росту *Methylococcus capsulatus* (Bath) NCIMB 11132 *з гетеротрофними бактеріями* з на поживному середовищі з наступним складом, (г/л):

- Газова суміш CH4: Повітря: CO_2 -9:9:2
- $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ – 1;
- KNO_3 - 1;
- $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ – 0,15;
- $CuSO_4 \times 5\ H_2O$ – 2,5 ;
- $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$ – 0,717;
- KH_2PO_4 – 0,272.

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 0.3 $м^3$ із коефіцієнтом заповнення 0,5. Підготовка посівного матеріалу відбувається у чотири етапи стадії (в колбах на качалках та 3 інокуляторах).

5.5. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу одноклітинного білка *M. capsulatus* NCIMB 11132

Виробничий біосинтез здійснюють у газовому біореакторі об'ємом 300 л із коефіцієнтом заповнення 0,5.

Робочий об'єм ферментера ($V_{роб}$) визначають за формулою:

$$V_{роб} = V_{г.\ ф.} \times К_{зап},$$

де: $V_{г.\ ф.}$ – геометричний об'єм ферментера;

$К_{зап}$ – коефіцієнт заповнення.

$$V_{роб} = 300 \times 0,5 = 150\ л.$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 35 % від об’єму поживного середовища, оскільки частка *M. capsulatus* складає 10 %, а *A. acidovaorans* становить 10% і по 7,5% *Brevibacillus sp.* і *A. danicus* [5].

Отже, для одержання 150 л культуральної рідини потрібно:

$$V_{роб.\ 1} = 150 \times 0{,}35 = 52{,}5\ м^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті об’ємом 100 л.

Для одержання 50 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{роб.\ 2} = 50 \times 0{,}35 = 17{,}5 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування метилотрофного штаму в інокуляторі об’ємом 30 л.

15 л культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{роб.\ 3} = 15 \times 0{,}35 = 5{,}25 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об’ємом 10 л.

Для одержання 5 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{роб.\ 4} = 5 \times 0{,}35 = 1{,}75 \text{ л посівного матеріалу}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування метилотрофного штаму в інокуляторі об’ємом 10 л.

Для одержання 1,75 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{роб.\ 4} = 1{,}75 \times 0{,}35 = 0{,}61 \text{ л посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням бактерій у колбах на качалці.

Для зручності висновки стосовно кількості стадій і об’ємів підготовки посівного матеріалу представимо у вигляді таблиці 3.1.

Таблиця 5.2

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**
300	0,5	150	52,5	15	111,1
100		50	17,5	10	37
30		15	5,25	3	11,1
10		5	1,75	0,5	3,7
3,5		1,75	0,61	–*	1,3

*Конденсат не враховано, оскільки стерилізація композицій поживного середовища відбуватиметься у колбах в автоклаві.

5.5. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках та інокуляторі на 10 л

Для вирощування початкового посівного матеріалу використовують середовище, яке наведено у підрозділі 3.3. Стерилізація буде відбуватись в автоклаві, через невеликий об'єм поживного середовища. Зважаючи на режим стерилізації компонентів поживного середовища, поділимо його на наступні композиції:

Композиція А: Газова суміш CH4: Повітря: CO_2 -9:9:2 (підготовленна за рахунок газових фільтрів)

Композиція Б: KNO_3, KH_2PO_4 , $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$, (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція В: $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, $CuSO_4 \times 5\ H_2O$, $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Газова суміш (композиція А) є не потребує стерилізації, її пропускають через газовий фільтр/катридж. KNO_3, KH_2PO_4, $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$ (композиція Б) стерилізується при 131°С, 40 хв окремо від $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, $CuSO_4 \times 5\ H_2O$, $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ для запобігання утворення нерозчинних осадів. $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, $CuSO_4 \times 5\ H_2O$, $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ (композиція В) стерилізуються при 131 °С, 40 хв. Стерилізація композицій Б і В здійснюється в автоклаві.

5.6. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту у посівних апаратах на 30 і 100 л

Для цих стадій поділ на композиції поживного середовища змінюється. Композицію Б готують в окремому збірнику, а стерилізують в інокуляторі (для зменшення ймовірності контамінації), процес стерилізації відбувається при pH 4,5, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином сульфатної кислоти.

Композиція А: Газова суміш СН4: Повітря: CO_2 -9:9:2 (підготовленна за рахунок газових фільтрів)

Композиція Б: KNO_3, KH_2PO_4, $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$, $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, $CuSO_4 \times 5\ H_2O$, $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Газова суміш (композиція А) є не потребує стерилізації, її пропускають через газовий фільтр/катридж.

5.7. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у газовому біореакторі на 300 л

На цій стадії поділ на композиції поживного середовища зберігається з попередніх стадій. Композицію Б готують в окремому збірнику, а стерилізують в інокуляторі (для зменшення ймовірності контамінації), процес стерилізації відбувається при pH 4,5, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином сульфатної кислоти.

Композиція А: Газова суміш СН4: Повітря: CO_2 -9:9:2 (підготовленна за рахунок газових фільтрів)

Композиція Б: KNO_3, KH_2PO_4, $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$, $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, $CuSO_4 \times 5\ H_2O$, $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Газова суміш (композиція А) є не потребує стерилізації, її пропускають через газовий фільтр/катридж.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Інформацію про обладнання, використовуване під час виробництва мікробного білка змішаною культурою, узагальнено та наведено у табл. 6.1. Такі апарати зображено у графічній частині роботи (апаратурна схема).

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання для одержання мікробного білка

Позиція	**Найменування**	**Кількість**	**Характеристика**
1	*2*	*3*	*4*
Ф-1, Ф-4	Фільтр для грубої очистки	2	Блок підготовки стисненого повітря. Робочий тиск, мін./макс.: 0.5-16 бар. Типорозмір 2 (1/2 дюйма). Фільтруючий елемент на 5 мкм [14].
К-2, К-5	Компресор	2	Компресор серії DVK 180. Потужність: 132 кВт. Максимальний тиск: 7,5 бар. Продуктивність: 22,8 $м^3$/хв. Країна-виробник: Україна [15].
Ф-3, Ф-6	Фільтр для тонкого очищення	2	Блок підготовки повітря Mighty Seven SV-2431. Максимальний тиск: 9,65 Бар. Номінальна температура: 5-60°С. Країна-виробник: Тайвань [16].
ІФ-7, ІФ-8, ІФ-11, ІФ-12, ІФ-15, ІФ-16, ІФ-21, ІФ-22	Індивідуальний фільтр	8	Повітряний Фільтр Серії AF 2000. Матеріал: алюмінієве лиття із поліетиленом під тиском покритий залізною кришкою. Робоча температура: 5~60°С. Робочий тиск: 0,95 МПа [17].

Продовження табл. 6.1

І-9	Інокулятор	1	Інокулятор BLBIO-XGCA об’ємом 10 л. Матеріал: нержавіюча сталь 316L+боросилікатне скло. Апарат оснащений датчиками температури, pH, кисню та відпрацьованих газів, а також мішалкою (200 об/хв). Габаритні розміри: 800 х 500 х 670 мм [18].
РЗ-10	Реактор-змішувач для приготування солей	1	Реактор-змішувач об’ємом 10 л. Матеріал: високостійке боросилікатне скло GG3.3. Обладнаний мішалкою (0 – 450 об/хв). Потужність: 90 Вт. Діапазон температури: 80 – 250 ℃. Габаритні розміри: 780 х 550 х 1870 мм [19].
І-13	Інокулятор	1	Інокулятор BLBIO-30SG об’ємом 30 л. Матеріал: нержавіюча сталь типу 316L. Апарат оснащений датчиками температури, pH, кисню та відпрацьованих газів, а також мішалкою (200 об/хв). Габаритні розміри: 1300 х 790 х 1700 мм [18].
РЗ-14	Реактор-змішувач для приготування солей	1	Реактор-змішувач СЕон 0,025 об’ємом 25 л. Матеріал: емальована нержавіюча сталь. Робочий діапазон температури: -20 – 250 ℃. Обладнаний датчиками, сорочкою, якірною мішалкою (50 об/хв). Потужність двигуна: 0,75 кВт. Габаритні розміри: 520 х 450 х 600 мм [20].
І-17	Інокулятор	1	Інокулятор DIN AE об’ємом 100 л. Матеріал: нержавіюча сталь типу AISI304. Апарат оснащений датчиками температури, pH, кисню та відпрацьованих газів, а також мішалкою (200 об/хв). Можливий діапазон температур: -25 – 200 ℃. . Максимальний робочий тиск: 6 бар. Габаритні розміри: 1980 х 600 мм. Країна-виробник: Німеччина [21].
Д-18	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор сипучих матеріалів Triniti F-999. Тип: напівавтоматичний. Діапазон дозування: 10 – 999 г. Похибка дозування: 1% [22].

Закінчення табл. 6.1

РЗ-19	Реактор-змішувач для приготування солей	1	Реактор-змішувач S212 об'ємом 100 л. Матеріал: високоякісне боросилікатне скло типу GG-17. Потужність перемішування: 200 Вт. Швидкість перемішування мішалки: 0 – 680 об/хв. Діапазон робочої температури: 90 – 300 ℃. Габаритні розміри: 1000 x 930 x 2800 мм [23].
Н-20	Відцентровий насос для перекачування солей від РЗ-19 до ГБ-23	1	Насос відцентровий. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 304. Напруга: 220-240 В. Максимальна температура рідини, що перекачується: +85ºС. Продуктивність: 80 л/хв [24].
ГБ-23	Газовий біореактор	1	Інокулятор BLBIO-300SC об'ємом 300 л. Матеріал: нержавіюча сталь типу 316L. Апарат оснащений датчиками температури, pH, кисню та відпрацьованих газів, а також мішалкою (200 об/хв). Габаритні розміри: 3000 x 1250 x 2600 мм [18].
Н-24	Відцентровий насос для перекачування культуральної рідини	1	Насос поверхневий SAER відцентровий M-700B. Матеріал: нержавіюча сталь. Продуктивність: до 10 $м^3$/год. Потужність: 1,5 кВт. Країна-виробник: Італія [25].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

Біотехнологічний процес виробництва білка одноклітинних організмів метилотрофними бактеріями охоплює стадії допоміжних робіт і власне технологічного процесу.

Етапи допоміжних робіт (ДР) включають в себе: підготовку газової суміші, підготовку титрувальних 6 %-их розчинів (сульфатної кислоти (H_2SO_4) та натрію гідроксиду (NaOH)), підготовку розчину мікроелементів та підготовку поживних середовищ (приготування і стерилізацію) для вирощування гетеротрофних мікроорганізмів, посівного матеріалу та виробничого біосинтезу. Технологічний процес складається із наступних етапів: підготовки гетеротрофних культур, вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу у газовому біореакторі.

ДР 1. Підготовка газової суміші

ДР 1.1. Груба очистка повітря і метану з вуглекислим газом

Очищення повітря та CH_4+CO_2 перед подальшою обробкою виконується за допомогою фільтрів (Ф-1, Ф-4), які забезпечують ефективність очищення до 90%. Такі фільтри здатні утримувати частинки діаметром 50 мкм, сприяючи поліпшенню якості повітря перед подальшим обробленням.

ДР 1.2. Компресування попередньо очищеної суміші

Компресія повітря здійснюється за допомогою одного компресора (К-2), а метану з вуглекислим газом за використання іншого – К-5, що необхідно для забезпечення аерації процесу та подолання гідравлічного тиску, який виникає внаслідок стовпа рідини у ферментері. Умови процесу стискання компонентів газової суміші включають тиск на рівні 0,35 МПа.

ДР 1.3. Очистка на головному фільтрі

Після цього стиснене повітря направляється до головного фільтра очистки (Ф-3), а стиснені метан і вуглекислий газ – до Ф-6, які розташовані біля ферментаційних відділень. На цьому етапі відбувається високоякісна очистка газової суміші, і ступінь очищення досягає 95%.

ДР 1.4. Фільтрування на індивідуальному фільтрі

Газова суміш (від *ДР 1.3*) через трубопроводи подається безпосередньо в ін-дивідуальні фільтри (ІФ-7, ІФ-8, ІФ-11, ІФ-12, ІФ-15, ІФ-16, ІФ-21, ІФ-22) кожного з біореакторів до *ТП 6.5, ТП 6.6, ТП 6.7, ТП 7.1*. Ступінь кінцевої очистки повітря складає 99,999% та КУО < 1.

ДР 2. Підготовка титрувальних розчинів

ДР 2.1. Приготування 6 %-го розчину сульфатної кислоти

ДР 2.1.1 Приготування 6 %-го розчину сульфатної кислоти для підкислення середовища в інокуляторах та газовому біореакторі

Для приготування 368 мл 6%-го розчину H_2SO_4 у колбу об’ємом 1 л вносять за допомогою мірного циліндра 345,5 мл дистильованої води і вносять за допомогою мірного циліндра при постійному перемішуванні 22,5 мл 98%-ого розчину H_2SO_4.

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

ДР 2.2.1 Приготування і стерилізація 6 %-го розчину натрію гідроксиду з метою підлужнення середовища в інокуляторах та газовому біореакторі

Для приготування 368 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 22,1 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 1 л і за допомогою мірного циліндра на 500 мл додають 368 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131 ℃ (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3. Підготовка розчину мікроелементів

ДР 3.1. Приготування і стерилізація розчину мікроелементів для вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

На технічних вагах зважують 0,5 г $FeSO_4 \times 7H_2O$, 0,4 г $ZnSO_4 \times 7H_2O$, 0,2 г ЕДТА. На торсійних терезах зважують 0,015 г H_3BO_3, 0,05 г $CoCl_2 \times 6H_2O$, 0,02 г $MnCl_2 \times 4H_2O$ і 0,01 г $NiCl_2 \times 6H_2O$. Отримані наважки переносять у колбу об'ємом 2 л, додають 820 мл дистильованої води, перемішують та закривають ватно-марлевим корком. Такий розчин направляють на стерилізацію, що здійснюється в автоклаві при 131 ºС (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4. Підготовка поживних середовищ

ДР 4.1. Підготовка поживних середовищ для вирощування гетеротрофних мікроорганізмів

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація дріжджового автолізату

На технічних терезах зважують 0,6 г дріжджового екстракту. Одержану наважку переносять у колбу об'ємом 500 мл, додають 200 мл дистильованої води і ретельно перемішують за нагрівання на водяній бані. Колбу з одержаним бульйоном закривають пробкою і стерилізують в автоклаві за 112 ℃ (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація живильного бульйону

На технічних терезах зважують 1 г пептону, 0,1 г яловичого екстракту, 0,2 г дріжджового екстракту і 0,5 г NaCl. Отримані наважки поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 98 мл дистильованої води і ретельно перемішують за нагрівання на водяній бані. Колбу з одержаним бульйоном закривають пробкою і стерилізують в автоклаві за 112 ℃ (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 4.2. Підготовка поживних середовищ для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці

Обрахований склад компонентів поживного середовища, необхідного для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці представлено у табл. 2.1.

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

Для приготування газової суміші об’ємом 300 мл її компоненти, а саме CH_4 та CO_2 безперервно подають із спеціальних балонів. Повітря ж пропускають через систему фільтрів із діаметром пор 0,45 мкм. Співвідношення газів у суміші контролюється за використання кондукторів-витратомірів.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 0,82 г KNO_3, 0,22 г KH_2PO_4 і 0,6 г $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$. Наважки поміщають у колбу об’ємом 1 л, додають за допомогою мірного циліндра дистильовану воду (0,32 л). Одержаний розчин перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131 ºС (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 0,82 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, 2,05 г $CuSO_4 \times 5H_2O$ і 0,123 г $CaCl_2 \times 2H_2O$. Наважки поміщають у колбу об’ємом 500 мл, додають за допомогою мірного циліндра дистильовану воду (0,2 л). Одержаний розчин перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131 ºС (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.3. Підготовка поживних середовищ для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об’ємом 10 л

Обрахований склад компонентів поживного середовища, необхідного для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці представлено у табл. 2.2.

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

Для приготування газової суміші об’ємом 1200 мл її компоненти, а саме CH_4 та CO_2 безперервно подають із спеціальних балонів. Повітря ж пропускають через систему фільтрів із діаметром пор 0,45 мкм. Співвідношення газів у суміші контролюється за використання кондукторів-витратомірів.

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 3,15 г KNO_3, 0,86 г KH_2PO_4 і 2,26 г $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$. Наважки поміщають у колбу об’ємом 2 л, додають за

допомогою мірного циліндра дистильовану воду (1 л). Одержаний розчин перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131 ºС (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 3,15 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, 7,88 г $CuSO_4 \times 5H_2O$ і 0,47 г $CaCl_2 \times 2H_2O$. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2 л, додають за допомогою мірного циліндра дистильовану воду (0,95 л). Одержаний розчин перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131 ºС (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.4. Підготовка поживних середовищ для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

Обрахований склад компонентів поживного середовища, необхідного для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці представлено у табл. 2.3.

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

Для приготування газової суміші об'ємом 5 л її компоненти, а саме CH_4 та CO_2 (готова суміш) безперервно подають із газгольдера метантенка, що розташований у тваринницькому комплексі. Повітря ж забирають повітрязабірником, стискають компресором, видаляють зайву вологу ресивером та пропускають через систему фільтрів. Співвідношення газів у суміші контролюється за використання кондукторів-витратомірів.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі здійснюють зважування 10,95 г KNO_3, 2,98 г KH_2PO_4, 7,85 г $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$, 10,95 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, 27,4 г $CuSO_4 \times 5H_2O$ і 1,64 г $CaCl_2 \times 2H_2O$. Наважки переносять у реактор на 10 л (РЗ-9), додають через лічильник 5,95 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для ефективного розчинення компонентів у сорочці реактора здійснюється подача пари, що дозволяє досягти температури на рівні 40°С. Отриманий розчин подають самоплином у попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 30 л

(І-11), подають 6 %-ий розчин H_2SO_4 (від *ДР 2.1.1*) до досягнення pH 4,0-4,5 і стерилізують при 131 ºС (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.5. Підготовка поживних середовищ для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

Обрахований склад компонентів поживного середовища, необхідного для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці представлено у табл. 2.4.

ДР 4.5.1. Приготування і стерилізація композиції А

Для приготування газової суміші об'ємом 17 л її компоненти, а саме CH_4 та CO_2 (готова суміш) безперервно подають із газгольдера метантенка, що розташований у тваринницькому комплексі. Повітря ж забирають повітрязабірником, стискають компресором, видаляють зайву вологу ресивером та пропускають через систему фільтрів. Співвідношення газів у суміші контролюється за використання кондукторів-витратомірів.

ДР 4.5.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах здійснюють зважування 37,8 г KNO_3, 10,3 г KH_2PO_4, 27,1 г $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$, 37,8 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, 94,5 г $CuSO_4 \times 5H_2O$ і 5,67 г $CaCl_2 \times 2H_2O$. Наважки переносять у реактор на 25 л (РЗ-12), додають через лічильник 18,5 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для ефективного розчинення компонентів у сорочці реактора здійснюється подача пари, що дозволяє досягти температури на рівні 40°С. Отриманий розчин подають самоплином у попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 100 л (І-14), подають 6 %-ий розчин H_2SO_4 (від *ДР 2.1.1*) до досягнення pH 4,0-4,5 і стерилізують при 131 ºС (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.6. Підготовка поживних середовищ для виробничого біосинтезу у газовому біореакторі

Обрахований склад компонентів поживного середовища, необхідного для виробничого біосинтезу у газовому біореакторі представлено у табл. 2.5.

ДР 4.6.1. Приготування і стерилізація композиції А

Для приготування газової суміші об’ємом 50 л її компоненти, а саме CH_4 та CO_2 (готова суміш) безперервно подають із газгольдера метантенка, що розташований у тваринницькому комплексі. Повітря ж стискають компресором, видаляють зайву вологу ресивером та пропускають через систему фільтрів. Співвідношення газів у суміші контролюється за використання кондукторів-витратомірів.

ДР 4.6.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі здійснюють зважування 131,3 г KNO_3, 35,7 г KH_2PO_4, 94,1 г $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$, 131,3 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, 328,25 г $CuSO_4 \times 5H_2O$ і 19,7 г $CaCl_2 \times 2H_2O$. Наважки переносять у реактор на 100 л (РЗ-16), додають через лічильник 72,4 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для ефективного розчинення компонентів у сорочці реактора здійснюється подача пари, що дозволяє досягти температури на рівні 40℃. Отриманий розчин перекачують відцентровим насосом (Н-17) у попередньо простерилізований газовий біореактор об’ємом 300 л (ГБ-20), подають 6 %-ий розчин H_2SO_4 (від *ДР 2.1.1*) до досягнення pH 4,0-4,5 і стерилізують при 131 ℃ (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ТП 5. Підготовка гетеротрофних культур

ТП 5.1. Підтримання колекційних гетеротрофних культур

Колекційні культури *A. acidovorans*, *A. danicus* і *Brevibacillus sp.* зберігаються у пробірках на агаризованих середовищах (м’ясо-пептонний агар (МПА)) у холодильнику при 2 – 4 ℃. Пересіви на свіже середовище проводять 1–2 рази на місяць з дотриманням асептичних правил.

ТП 5.2. Одержання робочих гетеротрофних культур

Колекційні культури *A. acidovorans*, *A. danicus* і *Brevibacillus sp.* розсівають на чашки Петрі із МПА для одержання ізольованих колоній. Вирощують у термостаті при температурі 45℃ (24 год).

ТП 5.3. Вирощування гетеротрофних культур у пробірках на агаризованих середовищах

Отримані ізольовані колонії *A. acidovorans*, *A. danicus* і *Brevibacillus sp.* із чашок Петрі (від *ТП 5.2*) пересівають петлею у пробірки зі скошеними МПА. Одну ізольовану колонію використовують для засіву однієї пробірки. Час вирощування складає 24 години, температура 45 ℃. Кожні 4 год із пробірок відбирають проби з метою здійснення мікробіологічного контролю.

ТП 5.4. Вирощування гетеротрофних бактерій у колбах на качалці

В асептичних умовах у 2 стерильні качалочні колби об’ємом 750 мл вносять простерилізований дріжджовий автолізат (від *ДР 4.1.1*) по 100 мл в кожну, а також в ще 1 стерильну качалочну колбу об’ємом 750 мл вносять протерилізований поживний бульйон (від *ДР 4.1.2*). У пробірки з робочими культурами *A. danicus* і *Brevibacillus sp.* (від *ТП 5.3*) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою відбирають отримані таким чином суспензії бактерій і вносять у качалочні колби із дріжджовим автолізатом.

У пробірку із робочою культурою *A. acidovorans* (від *ТП 5.3*) також вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою переносять суспензію бактерій у качалочну колбу із поживним бульйоном. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивують на качалках (180 об/хв) при температурі 45℃ упродовж 24 год, після чого здійснюють мікробіологічний контроль.

ТП 5.5. Підготовка гетеротрофних бактерій до змішаної ферментації

Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину (від *ТП 5.4*) з кожної колби центрифугували, ресуспендували у колбах об’ємом 50 мл із 10 мл середовища NMS №131 (за складом аналогічне тому, що використовується для вирощування продуцента) перед об'єднанням з *M. capsulatus* для біосинтезу.

Колби барботують повітрям, метаном і вуглекислим газом у співвідношенні 9:9:2, інкубують на шейкері при 45 ℃ та перевіряють оптичну густину через 24 год. Отриманий посівний матеріал направляють до *ТП 6.5*.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної метилотрофної культури

Колекційна культура *M. capsulatus* NCIMB 11132 зберігається у пробірці на агаризованому середовищі (агар NMS №131 із 0,02% метанолом) у холодильнику при 2 – 4 ℃. Пересіви на свіже середовище проводять 1–2 рази на місяць з дотриманням асептичних правил.

ТП 6.2. Одержання робочої метилотрофної культури

Колекційну культуру *M. capsulatus* NCIMB 11132 розсівають на чашки Петрі із агаром NMS №131 із 0,02% метанолом для одержання ізольованих колоній. Вирощують у термостаті в атмосфері CH_4: Повітря: CO_2 9:9:2 при температурі 45 ℃ (48 год).

ТП 6.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах

Одержані ізольовані колонії *M. capsulatus* NCIMB 11132 із чашок Петрі (від *ТП 6.2*) пересівають петлею у пробірки зі скошеним агаром NMS №131 із 0,02% метанолом. 1 ізольовану колонію використовують для засіву 1 пробірки. Час вирощування складає 48 години, температура 45 ℃. Кожні 4 год із пробірок відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 6.4. Вирощування інокуляту у колбах на качалці

В асептичних умовах у колбу об’ємом 1 л зі стерильною композицією Б (від *ДР 4.2.2*) вносять простерилізовану композицію В (від *ДР 4.2.3*), вносять розчин мікроелементів об’ємом 6,5 мл (від *ДР 3.1*), перемішують і розливають по 100 мл у стерильні качалочні колби об’ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *M. capsulatus* NCIMB 11132 (від *ТП 6.3*) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою відбирають отриману суспензію бактерій і вносять у качалочні колби

зі стерильним поживним середовищем. Бактеріальна суспензія, отримана з однієї пробірки, використовується для засіву однієї качалочної колби.

Кожну колбу закривали гумовою пробкою з двома отворами, оснащеною трубкою з нержавіючої сталі, з'єднаною з силіконовою трубкою зі стерильним фільтром, прикріпленим на одному кінці, щоб забезпечити барботування газовою сумішшю (від *ДР 4.2.1*). Культивують на качалках (180 об/хв) при температурі 45℃ упродовж 48 год, після чого визначають концентрацію біомаси, яка повинна становити 5,1 – 5,2 г/л, і здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 6.5. Вирощування інокуляту у посівному апараті на 10 л

В асептичних умовах у колбу об'ємом 1 л зі стерильною композицією Б (від *ДР 4.3.3*) вносять простерилізовану композицію В (від *ДР 4.3.2*), вносять розчин мікроелементів об'ємом 18,5 мл (від *ДР 3.1*), перемішують і вносять через засівний пристрій у посівний апарат об'ємом 10 л (І-9). Далі шляхом барботування перекачують газову суміш (від *ДР 4.3.1*). Вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від *ДР 2.2.1*) pH середовища за показником датчика pH до 6,8-7,0. Через засівний пристрій подають із колби посівний матеріал продуцента (від *ТП 6.4*) і гетеротрофних культур (від *ТП 5.4*).

Клітини *M. capsulatus* і гетеротрофних бактерій інокулюють у ферментер у співвідношенні 75:25 відповідно *A. acidovaorans*, що містить 10% і по 7,5% *Brevibacillus sp.* і *A. danicus*. Культивують при температурі 45℃ і концентрації розчиненого кисню (pO_2 = 20 – 30 % від насичення повітря) упродовж 48 год. Рівень кисню (pO_2) в середовищі підтримується шляхом регулювання швидкості перемішування та витрати стерильного аераційного повітря. Швидкість потоку повітря встановлюється на 0,5 vvm, CH_4 на 0,1 vvm, а CO_2 на 0,0012 vvm.

Кожні 4 год із інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси (5,1 – 5,2 г/л).

ТП 6.6. Вирощування інокуляту у посівному апараті на 30 л

У посівний апарат об'ємом 30 л (І-11) зі стерильною композицією Б (від *ДР 4.4.2*), додають через засівний пристрій розчин мікроелементів об'ємом 55,5 мл (від *ДР 3.1*), вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від *ДР 2.2.1*) pH середовища за показником датчика pH до 6,8-7,0. Далі шляхом барботування перекачують газову суміш (від *ДР 4.4.1*). Шляхом самоплину подають з інокулятора посівний матеріал змішаної культури (від *ТП 6.5*). Культивують при температурі 45°С і концентрації розчиненого кисню (pO_2 = 20 – 30 % від насичення повітря) упродовж 48 год. Рівень кисню (pO_2) в середовищі підтримується шляхом регулювання швидкості перемішування та витрати стерильного аераційного повітря. Швидкість потоку повітря встановлюється на 0,5 vvm, CH_4 на 0,1 vvm, а CO_2 на 0,0012 vvm.

Кожні 4 год із інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси (5,1 – 5,2 г/л).

ТП 6.7. Вирощування інокуляту у посівному апараті на 100 л

У посівний апарат об'ємом 100 л (І-14) зі стерильною композицією Б (від *ДР 4.5.2*), додають через засівний пристрій розчин мікроелементів об'ємом 185 мл (від *ДР 3.1*), вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від *ДР 2.2.1*) pH середовища за показником датчика pH до 6,8-7,0. Далі шляхом барботування перекачують газову суміш (від *ДР 4.5.1*). Самоплином подають з інокулятора посівний матеріал змішаної культури (від *ТП 6.6*). Культивують при температурі 45°С і концентрації розчиненого кисню (pO_2 = 20 – 30 % від насичення повітря) упродовж 48 год. Рівень кисню (pO_2) в середовищі підтримується шляхом регулювання швидкості перемішування та

витрати стерильного аераційного повітря. Швидкість потоку повітря встановлюється на 0,5 vvm, CH_4 на 0,1 vvm, а CO_2 на 0,0012 vvm.

Кожні 4 год із інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси (5,1 – 5,2 г/л).

ТП 7. Виробничий біосинтез

ТП 7.1. Виробничий біосинтез у газовому біореакторі об'ємом 300 л

У виробничий газовий біореактор об'ємом 300 л (ГБ-20), у якому міститься стерильний розчин солей (від *ДР 4.6.2*) подають розчин мікроелементів об'ємом 555,5 мл (від *ДР 3.1*). Далі шляхом барботування перекачують газову суміш (від *ДР 4.6.1*). Вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від *ДР 2.2.1*) pH середовища за показником датчика pH до 6,8-7,0. Через трубу перетискування подають з інокулятора (І-15) посівний матеріал змішаної культури (від *ТП 6.7*). Культивують при температурі 45℃ і концентрації розчиненого кисню (pO_2 = 20 – 30 % від насичення повітря) упродовж 48 год. Рівень кисню (pO_2) в середовищі підтримується шляхом регулювання швидкості перемішування та витрати стерильного аераційного повітря. Швидкість потоку повітря встановлюється на 0,5 vvm, CH_4 на 0,1 vvm, а CO_2 на 0,0012 vvm.

Кожні 4 год із газового біореактора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси (10,2 – 10,3 г/л). Отриману культуральну рідину, у складі якої і міститься цільовий продукт – мікробний білок, далі перекачують у цех виділення та очистки за використання відцентрового насосу (Н-21).

РОЗДІЛ 8. ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНІ ПРОЦЕСИ ВИРОБНИЦТВА БІЛКА

8.1. Обгрунтування стадій виділення і очищення мікробного білка

Сьогодні мікробний білок має широкий спектр застосувань. Його використовують у сільському господарстві (як корм та добавка), у харчовій промисловості (як барвник та добавка) та в медицині (у препаратах з намікробним білком, включаючи його використання як антиоксидант). Склад і ступінь очищення продукту з намікробним білком залежать від його призначення.

Процес виділення та очищення мікробного білка включає етапи екстрагування його з біомаси, відокремлення від біомаси та висушування.

При виборі мікроорганізмів для виробництва мікробної біомаси слід враховувати ряд важливих факторів. Серед них - питому швидкість росту та вихід біомаси на певному субстраті, стабільність у процесі потокового культивування та розмір клітин. Наприклад, дріжджі мають більші розміри клітин порівняно з бактеріями, що спрощує їхнє відокремлення від рідини за допомогою центрифугування [43].

Найціннішим компонентом у сумішевій культурі, яка включає *M. capsulatus NCIMB 11132, A. acidovorans, A. danicus і Brevibacillus s*p., є білок. Цей білок має склад амінокислот, що перевершує білок, який міститься в зернових культурах, та майже рівний білку з молока і рибного борошна. Його біологічна цінність визначається високим вмістом незамінних амінокислот.

Також клітини цих мікроорганізмів містять мікроелементи та значну кількість жиру, переважно ненасичених жирних кислот [44].

Технологія отримання білка з використанням комплексу мікроорганізмів включає кілька стадій: підготовка сировини, аерація, посів матеріалу, додаткові операції, стадія ферментації, виділення та концентрування цільового продукту, термічна обробка, сушіння та упаковка. Додатково передбачаються заходи для утилізації відходів, очищення стічних вод і газоповітряних викидів [45].

Процес виділення продукту має на меті збереження якості та біологічних властивостей продукту. Це означає, що необхідно запобігти втратам білка, незамінних амінокислот та вітамінів через нагрівання, механічну або хімічну дію, а також через наявність мікроорганізмів забруднень.

У процесі переробки рідких відходів у кормові продукти застосовується глибинне культивування біомаси одноклітинних організмів. Ця біомаса відокремлюється від ферментованого середовища, так званої культуральної рідини, і подальше концентрується за допомогою різних методів або згущується і сушиться разом із залишками субстрату і продуктами життєдіяльності [46].

8.1.1. Виділення клітин

Для виділення клітин мікроорганізмів з рідкого середовища, такого як культуральна рідина, застосовуються різні методи, серед яких основні - декантація (седиментація) та гравітаційне ущільнення. У відміну від процесів біологічного очищення стічних вод, де активний мул осаджується у вторинних відстійниках або на стадії попереднього ущільнення, в технологіях мікробіологічного синтезу ці способи використовуються рідко через їхню низьку продуктивність. Це пов'язано з тим, що щільність мікроорганізмів майже однакова з густинею середовища культивування [47].

Для прискорення осадження біомаси в середовище, можуть додавати коагулянти і флокулянти. Ці речовини сприяють утворенню великих флокул мікроорганізмів та їхньому осадженню. Декантація та ущільнення дозволяють зменшити обсяг суспензії мікроорганізмів, що призводить до зниження витрат

на наступних стадіях переробки. Після відстоювання, осад можна направити в сепаратор для додаткового згущення мікробної біомаси, а згущену біомасу - в сушилку [48]

Фільтрація

Фільтрація використовується досить часто для процесу концентрування біомаси. Для цього застосовуються різні види обладнання, такі як барабанні та стрічкові преси (особливо ефективні при фільтрації кормового продукту з твердою фазою), фільтр-преси, нутч-фільтри (для невеликих об'ємів рідини). Ще один метод - фільтрація з використанням намивного шару, яка дозволяє вилучити мікроорганізми разом зі залишками твердої фази після гетерофазного культивування. Тверда фаза переробленого субстрату використовується як намивний шар. Перед фільтрацією суспензії мікробних клітин можливе введення деревної тирси, деревного борошна, діатоміту, цеолітів та інших матеріалів, які є інертними і легко фільтруються. Це поліпшує ефективність фільтрації і може використовуватися для підтримки оптимальних кормових властивостей продуктів [49].

Проте, у всіх методах фільтрації є проблема швидкого забивання фільтрів і мембран, що призводить до різкого падіння їхньої продуктивності. Це вимагає значних зусиль для збереження задовільних робочих характеристик фільтрів, включаючи множинне збільшення площі фільтруючої поверхні та розмірів установок. Для прискорення процесу фільтрації можуть додавати коагулянти або флокулянти, а також нагрівати суспензію. Присутність смолистих, слизових та колоїдних домішок, олій та жирів у суспензії також погіршує її фільтрованість.

Центрифугування та сепарація

Центрифугування та сепарація широко використовуються в біотехнологічних підприємствах для першого етапу концентрування мікроорганізмів, за умови, що ферментаційне середовище не містить залишків

твердої фази або абразивних домішок. Основні переваги цього методу полягають у його простоті, економічності та можливості автоматизації. Однак недоліком є часті зупинки центрифуг та сепараторів для очищення через наявність у суспензії частинок піску, залишків твердої фази субстрату та інших домішок. Великі мікроорганізми, такі як дріжджі, легко відокремлюються від суспензії [50].

Флотація

Флотаційне широко використовується на початковій стадії концентрації біомаси, зазвичай в одно- або багатосекційних флотаторах. Цей метод має кілька переваг, зокрема простоту апаратурного оформлення та можливість використання у ферментерах для утворення піни. Піна, яка містить підвищену концентрацію мікроорганізмів, дозволяє досягти високої концентрації біомаси у шарі піни (від 30 до 100 г/л за сухими речовинами).

У виробництві білкових компонетів на поживних середовищах що є продуктами біогазових установок дозволяють досягти заданої концентраці цільового продукту у ферментаційному середовищі. При низькій концентрації біомаси (до 8–10 г/л) ефективніше використовувати флотацію, а не сепарацію.

Проте флотація зазвичай використовується як один з етапів процесу, оскільки не завжди забезпечує повне відділення або концентрацію мікроорганізмів. Зазвичай після флотації передбачається проведення сепарації.

Флотаційний метод має свої недоліки, зокрема високий винос нефлотованих клітин мікроорганізмів (0,5–1,5 г/л) та втрати біомаси.

Електрофлотація

Цей процес включає утворення бульбашок газу під час електролізу води, що може також використовуватися для згущення мікробної біомаси. Під час обробки суспензії бактерій електрофлотацією, ступінь згущення становить 3–5 при початковій концентрації 0,6–1,0 % абсолютно сухих речовин, а

енерговитрати становлять близько 1–2 кВт·год на 1 $м^3$ вихідної суспензії. Найбільший вплив на процес електрофлотації має щільність струму [51].

Серед вказаних методів відокремлення біомаси найефективнішим є центрифугування, оскільки воно забезпечує швидке відділення білків з біомаси, що позитивно впливає на технологічний процес.

8.1.2. Концентрування

Концентрування полягає в збільшенні вмісту продукту у об’ємі за рахунок видалення зайвої води, і цей процес варіюється залежно від виду продукту. Для досягнення цієї мети використовують різні методи:

Упарювання застосовується, коли потрібно концентрувати білків шляхом випаровування води.

Седиментація використовується для осадження частинок внаслідок дії гравітаційних сил.

Декантація - це процес зливання рідини, де відбувається відокремлення рідини від твердих часток.

Фільтрація полягає в проходженні рідини через фільтр, який утримує тверді частки.

Флотація передбачає прилипання частинок до бульбашок повітря, утворюючи піну.

Центрифугування - це розділення неоднорідних сумішей на компоненти за допомогою центробіжної сили.

Сепарація - це процес відокремлення компонентів суміші за допомогою різних фізичних або хімічних властивостей [52].

Отже, для білкового комплексу, який плануємо отримати, найдоцільнішим методом є випарювання.

Процес концентрування розчинів, відомий як випарювання, включає видалення розчинника шляхом його випаровування при кипінні. У більшості випадків з розчину видаляється лише частина розчинника, оскільки випарений

розчин повинен залишатися у рідкому стані. Повне видалення розчинника можливе лише в тих випадках, коли розчинена речовина є або рідкою (наприклад, випарювання розчинів гліцерину), або коли температура процесу знаходиться у розплавленому стані (наприклад, випарювання розчинів аміачної селітри або їдкого натру). В деяких випадках при випарюванні розчинів твердих речовин досягається насичення розчину, і подальше видалення розчинника з такого розчину призводить до кристалізації, тобто виділення з нього розчиненої твердої речовини. Випарювання широко застосовується для підвищення концентрації розбавлених розчинів або виділення з них розчиненої речовини шляхом кристалізації [53].

Нагрівання розчину, що випарюється, проводиться шляхом передачі тепла від нагріваючого агента через стінку, яка розділяє обидві речовини, або шляхом безпосереднього стикання речовин. Випарювання ведуть як при атмосферному, так і під пониженим або підвищеним тиском. При випарюванні розчину під атмосферним тиском утворений так званий вторинний (соковий) пар випускається в атмосферу. Такий спосіб випарювання є найбільш простим.

Отриману білкову біомасу будемо випарювати до концентрації сухих речовин 60%.

8.1.3. Висушування

Процес сушіння має велике значення для збереження та довготривалого зберігання продуктів. В залежності від особливостей продукту використовують різні методи сушіння. Термостабільні препарати, наприклад, сушать на стрічкових конвеєрах або у киплячому шарі. Особливо чутливі до тепла речовини піддаються сушінню у вакуумних шафах за зниженого тиску та температури, а також у розпилюючих сушарках.

У процесі сушіння вологість отриманого продукту після коцентрування, наприклад, знижується до 8–10%. Оскільки білки є термолабільними, необхідно здійснювати сушіння в м'якому режимі - при помірній температурі та короткому

часі, щоб зберегти білок. Для цього використовують кілька методів: сушіння у малорухомому шарі, у зваженому стані, розпилення, в умовах пониженого тиску. У всіх випадках сушіння здійснюється за допомогою нагрітого повітря [27].

Проте температура теплоносія відрізняється залежно від типу сушарки: у вакуумних сушарках - 60 °C, у камерних і стрічкових - 45–48 °C, у розпилюючих - 140 °C. Ці умови дозволяють ефективно видалити вологу з продукту, зберігаючи його якість [54].

Розпилювальне сушіння є одним з найбільш поширених методів отримання продуктів мікробіологічного походження з розчинів, оскільки воно дозволяє швидко висушувати рідини протягом кількох секунд. Особливо цей метод застосовується для отримання сухих мікробних препаратів, антибіотиків, вакцин та інших фармацевтичних продуктів.

У першому поколінні сушарок були помітні недоліки. Це стосувалося геометрії сушильних башт, розподілу технологічного повітря, а також компонентів систем, які складають установку, таких як розпилювачі, гомогенізатори та інші. Світовий досвід показав, що в тих випадках, коли можливе використання різних методів розпилювання, найбільш доцільним є відцентрове дискове розпилювання. Його переваги полягають у можливості оброблення абразивних сировин та суспензій, а також у простоті регулювання розмірів крапель шляхом зміни швидкості обертання диску.

Сучасний технологічний процес реалізується таким чином. Спочатку відбувається розпилювальне сушіння протягом дуже короткого часу (1–10 секунд). Цей етап характеризується високою швидкістю сушіння та інтенсивністю дифузії вологи з частинок порошку, а також підвищеною вологістю продукту. Другий етап (досушування продукту до необхідної вологомісткості та подальше охолодження) відбувається в окремому апараті за більш м'якими термінами обробки та тривалості.

Обладнання, перш за все, включає системи нагрівання теплоносія (повітря або інертних газів) і циклони. Для нагрівання повітря, яке використовується в розпилювальних сушарках будь-якого типу, як теплоносій, застосовуються калорифери. В цих калориферах пар або перегріта вода подаються для нагрівання повітря. Використання пари дозволяє нагрівати повітря до температур, які зазвичай не перевищують 110–140 °C. Для нагрівання до ще вищих температур потрібна пара високого тиску, яка має тиск близько 1,2 МПа [55].

Таким чином, після концентрування будемо проводити сушіння біомаси в розпилювальній сушарці до вологості 8%.

9.1.4. Стабілізація

Для збереження стійкості та властивостей біотехнологічних продуктів часто застосовується додавання різних речовин у якості наповнювачів. Наприклад, для стабілізації білка часто використовують пшеничні висівки або кукурудзяне борошно, які мають додаткову поживну цінність. Пшеничні висівки, що є відходами виробництва після змелення пшеничного зерна на борошно, є економічно вигідним компонентом для стабілізації кормового білка дріжджового походження. Таким чином, можемо вважати, що пшеничні висівки, як стабілізатор, будуть введені у кількості 30% від загального обсягу вихідного продукту.

Порівнюючи призначення та властивості кормових та технічних наповнювачів для білків, можна зробити наступні спостереження. Кормові наповнювачі використовуються у сільському господарстві для покращення якості кормів для тварин, додаючи білки, вітаміни та мінерали, необхідні для здоров'я тварин і підвищення їхньої продуктивності. З іншого боку, технічні наповнювачі використовуються в промисловості для поліпшення технічних характеристик матеріалів, таких як пластмаси, гума, фарби, кераміка тощо, шляхом додавання білкових компонентів [56].

Щодо складу, кормові наповнювачі містять білки, амінокислоти та інші корисні речовини, спрямовані на поживлення тварин, тоді як технічні наповнювачі можуть містити різні хімічні сполуки та добавки, які впливають на технічні характеристики матеріалів. З точки зору застосування, кормові наповнювачі використовуються у харчовій промисловості для виробництва кормів для тварин, а технічні наповнювачі - в промисловості для створення матеріалів з покращеними технічними характеристиками.

8.1.5. Фасування та пакування мікробного білка

Розглядаються різноманітні види упаковки, включаючи паперові, поліетиленові пакети, скляні та металеві банки. Упаковка для зоотоварів повинна відповідати ряду вимог, включаючи міцність, щільність, вологостійкість, повітронепроникність, аромастійкість та стійкість до механічних пошкоджень.

Скляні банки мають свої недоліки, такі як вразливість до розбиття, значна вага та відносно висока ціна. Паперові пакети можуть пропускати вологу, що може не забезпечити довготривалого зберігання товару. Металеві банки, хоча відповідають всім критеріям, мають високу вартість, включаючи витрати на обладнання для їх запайки.

Очевидно, що різноманітні пластикові вироби найкраще відповідають усім вимогам. Продукт може бути упакований у щільні мішки з внутрішнім фольгованим шаром для захисту від вологи та неприємних запахів. Отже, у даному випадку найбільш вигідним варіантом буде використання поліетиленових пакетів [52].

показано поліетиленовий пакет, який має фольгований шар. Це тип упаковки, який зазвичай використовується для зберігання продуктів, які потребують захисту від вологи, світла або запахів.

Пакування білка може здійснюватися різними методами. Напівавтоматичний процес може включати використання шнекових і вакуумних дозаторів. Це означає, що частина процесу (наприклад, завантаження порошку в пакет) виконується автоматично, але інші кроки, наприклад, закривання пакету, можуть вимагати втручання оператора.

Автоматичний метод включає в себе використання спеціалізованих пакувальних апаратів, які здійснюють упаковку без прямого втручання оператора. Ці апарати можуть бути налаштовані на певний тип пакування, і вони зазвичай використовуються для великих обсягів виробництва [52].

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Під час періодичного процесу виробництва білка одноклітинних організмів здійснюється відбір проб культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації бактеріальної біомаси та одержаного метаболіту, а також контролю рівнів джерел вуглецю (газова суміш) та азоту (калію нітрат) у поживному середовищі. Також необхідним є моніто-ринг мікробіологічної чистоти культури-продуцента і гетеротрофних бактерій та стерильності готових поживних середовищ.

9.1. Мікробіологічний контроль

На усіх етапах технологічного процесу біотехнологічного виробництва мікробного білка постає необхідність у проведенні мікробіологічного контролю, оскільки як зазначалося у попередніх розділах, змішана культура (M. capsulatus NCIMB 11132 + A. acidovorans, A. danicus і Brevibacillus sp.) повинна рости в асептичних умовах.

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ та мікробіологічної чистоти посівного матеріалу і культуральної рідини зазвичай здійснюють такими методами:

1. Прямий висів на агаризовані середовища: відібрану пробу (напри-клад, з поживного середовища або культуральної рідини) об'ємом 1 мл розсі-вають петлею на поверхню агаризованих середовищ, таких як м'ясо-пептонний агар (МПА) для бактерій або сусловий агар (СА) / глюкозо-картопляний агар (ГКА) для дріжджів і грибів [57].

2. Експрес-метод (мікроскопіювання): пробу також можна оглянути під мікроскопом для швидкого виявлення мікроорганізмів, які можуть бути присутні в зразках. Цей метод дозволяє швидко оцінити наявність мікробіоти без необхідності інкубації.

Після розсіву проб петлею на агар, проводять інкубацію за відповідною температурою та тривалістю:

1) МПА: витримування у термостаті при температурі 37 ℃, що зазвичай відповідає бактеріальному росту.

2) СА або ГКА: витримування у термостаті при температурі 24 - 26 ℃, оптимальній для дріжджів і грибів [58].

Після закінчення періоду інкубації, чашки перевіряють на наявність колоній. У чашках із пробами поживних середовищ повинна бути відсутня мікробіота, що підтверджуватиме їх стерильність. На чашках із пробами культуральної рідини повинні вирости колонії, які формами та розмірами характерні для обраної змішаної культури.

Бактерія-продуцент (*M. capsulatus* NCIMB 11132) зазвичай утворює колонії з округлими, гладкими контурами. Колонії можуть бути безбарвними або світло-жовтими [59]. *A. acidovorans* на чашках Петрі здатна утворювати кремові або жовті колонії, з гладкою або хвильовою поверхнею. Бактерія не утворює пігментів. З віком поверхня утворюваних колоній стає не блискучою, а матовою [60].

A. danicus є грам-позитивною бактерією, яка може формувати спори. Вона має циліндричну форму і може розташовуватися поодиноко або у вигляді ланцюжків. Колонії *A. danicus* на чашках зазвичай мають кремовий або білий колір [61]. *Brevibacillus sp*. також є грам-позитивною бактерією, яка може формувати спори. Вона має коротку і товсту форму і здатна рости поодиноко чи утворювати ланцюжки. Колонії *Brevibacillus sp*. зазвичай мають жовтуватий або кремовий колір [62].

Для проведення мікробіологічного експрес-методу спочатку на стерильне предметне скло наноситься крапля досліджуваного зразка культуральної рідини чи матеріалу. Зразок розподіляється на поверхні скла і підсушується. Потім на нього наносять 1-2 краплі метиленового синього [63]. Після цього зразок висушують і досліджують під світловим мікроскопом. Цей метод дозволяє швидко оцінити наявність мікроорганізмів та їхні характеристики на предметному склі.

Морфологія клітин ізолятів *M. capsulatus*, вирощених у рідкій культурі в експоненціальній або стаціонарній фазі, являє собою короткі палички довжиною 1,5–2,2 мкм і діаметром 0,5–1,5 мкм. Клітини є грамнегативними, розділені симетричним бінарним поділом і є нерухомими та зустрічаються окремо або парами, і не утворюють більших агрегацій клітин (тетракоків або більших згустків) [64].

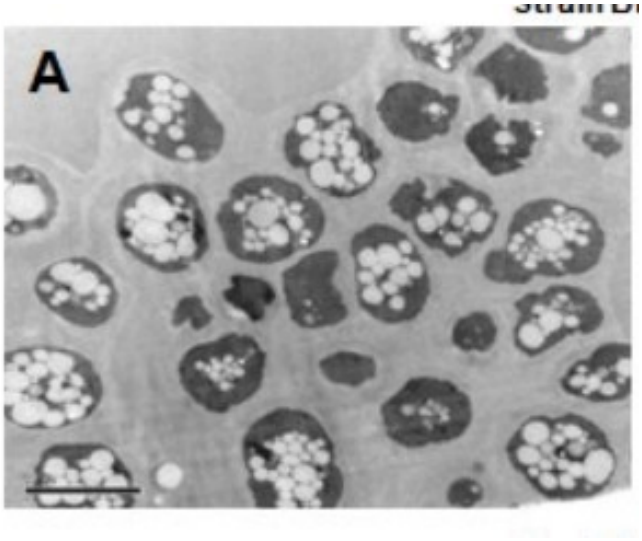

Рис. 9.1. Електронна мікрофотографія клітин *M. capsulatus* [64]

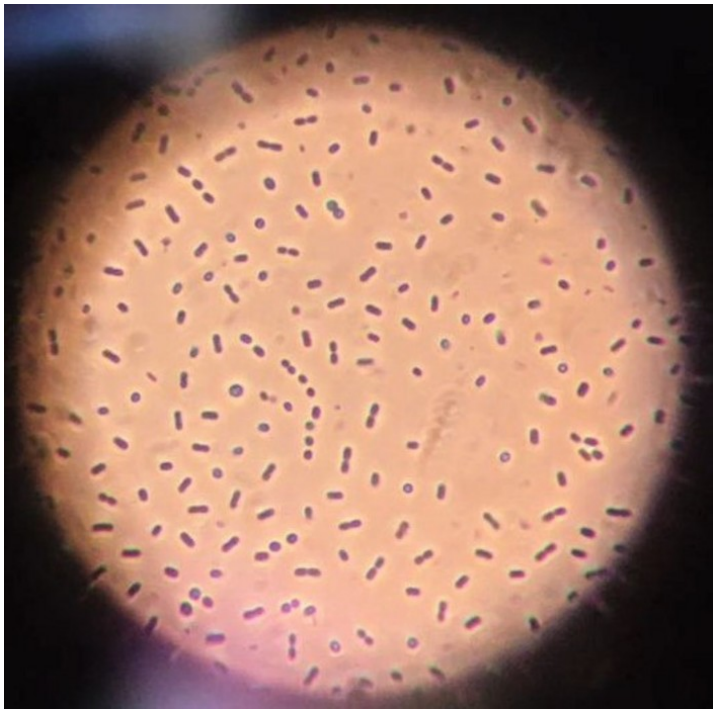

Рис. 9.2. Зображення *M. capsulatus* під світловим мікроскопом [65]

9.2. Визначення концентрації біомаси метилотрофних бактерій

Відібрану пробу культуральної рідини спочатку розділяють на супернатант та осад біомаси шляхом вакуумного фільтрування через фільтр Merck Millipore ацетат целюлози 0,45 мкМ. Одержаний вологий осад висушують до постійної маси. Відповідна концентрація біомаси визначається зважуванням сухого залишку клітин [66].

9.3. Визначення концентрації біомаси гетеротрофних бактерій

Для визначення концентрації біомаси *A. acidovorans, A. danicus і Brevibacillus sp.* використовують оптичну щільність культуральної рідини за довжиною хвилі 540 нм з використанням фотоелектроколориметра (ФЕК). Пробу від кожної вирощеної у колбах на качалці культури аналізують на ФЕК. Потім проводять перерахунок на абсолютно суху біомасу за допомогою калібрувального графіка [66].

9.4. Визначення концентрації джерела вуглецю (газова суміш)

Контроль концентрацій компонентів газової суміші пропонується проводити за використання датчика, вбудованого у конструкцію газового біореактора. Обраний детектор змішаних газів складається з ІЧ-джерела, коліматора, газової комірки та інтегрованого спектрометра на основі LVOF. ІЧ-світло, випромінюване джерелом ІЧ-світла, вирівнюється коліматором, а потім падає на LVOF. У результаті безперервний ІЧ-спектр перетворюється у кілька дискретних вузькосмугових спектрів, окремо відповідних кожному каналу фільтра з піковою довжиною хвилі в лінійній варіації. Лінійна матриця детекторів термобатареї розміщується під LVOF для перетворення енергії падаючого світла з різних каналів фільтра в електричний сигнал.

Експериментально прилад демонструє середнє значення повної ширини на половині максимуму 400 нм і середнє пікове пропускання 70% у діапазоні довжин хвиль 2,3~5 мкм. Детектори на термобатареї демонструють чутливість 146 мкВ/°С за умови кімнатної температури. Показано, що детектори можуть досягти кількісного визначення та ідентифікації газової суміші [63].

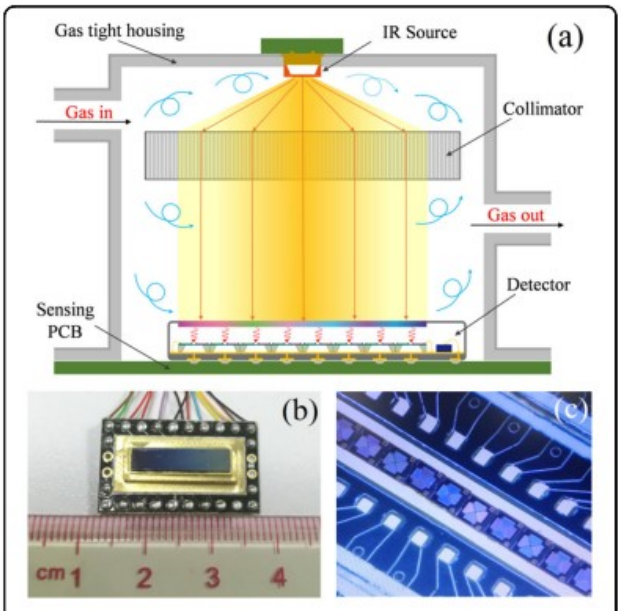

Рис. 5.3. Зображення пристрою: а) принципова схема роботи мініатюрного детектора змішаних газів; b) фотографії мініатюрного приладу на основі

спектрометру; с) матриця мікросхем термобатареї, упакована в гніздо [35]

9.5. Визначення концентрації джерела азоту (калію нітрату)

Концентрацію джерела азоту пропонується визначати за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) із флуоресцентним детектором, що ґрунтується на диференціальній взаємодії між компонентами зразка та нерухомою фазою всередині колонки [36].

Зразок культуральної рідини центрифугують за 10 000 g та 4 ℃ протягом 10 хв. 25 мл зразків супернатанту розбавляють вдвічі водою, а потім нагрівають протягом 10 хвилин при 70 ℃. Після відновлення температури зразків до кімнатної температури до них додають 10 мл 1 мМ НАДФН, 10 мл 1 мМ ФАД і 40 мл 1 ОД/мл нітратредуктази та інкубують протягом 40 хв. Згодом до сумішей додають 20 мл 50 од./мл молочнокислої дегідрогенази та інкубують протягом 20 хвилин для окислення НАДФН. Зразки захищають від світла протягом усього процесу реакції. Після реакції зразки депротеїнізують шляхом додавання 3 об'ємів метанолу (приблизно 400 мл) та інкубують з 20 мл 316 мМ 2,3-діамінонафталіну (в 0,62 М HCl) при кімнатній температурі протягом 30 хв, після чого додають 20 мл 1,4 М NaOH. Концентрацію нітратів в реакційній суміші аналізують за допомогою HPLC-FL, протягом 24 годин.

Аналіз проводять на аналітичній колонці XBridge C18 (2,1 50 мм, 3,5 мм; Waters, Ireland). Рухома фаза складається з 15% (об./об.) ацетонітрилу в 20 мМ натрій-фосфатному буфері (pH 10) і дегазована онлайн-дегазатором. Швидкість потоку рухомої фази становить 0,3 мл/хв. Зразок (10 мл) вводять в колонку через автосамплер. Усі хроматографічні процедури проводять при постійній температурі 30 ℃. Флуоресценцію контролюють з довжиною хвилі збудження при 355 нм і довжиною хвилі випромінювання при 460 нм. Концентрацію нітратів визначають за калібрувальною кривою зі стандартними розчинами нітрату, який обробляли за допомогою того ж процесу, що й для зразків супернатанту [57].

9.6. Визначення концентрації білку одноклітинних організмів

Даний аналіз пропонується здійснювати за використання методу Бредфорда у лунках мікропланшета. Формат мікропланшета зменшує динамічний діапазон аналізу залежно від глибини лунок у мікропланшеті. Необхідні матеріали для аналізу:

- зразок білка;
- стандарт білка 1 мг/мл (наприклад, BSA – бичачий сироватковий альбумін);
- реактив Бредфорда;
- 1 М NaOH;
- мікропланшет;
- багатоканальний піпетор або повторюваний дозатор;
- зчитувач мікропланшетів.

Хід аналізу:

1. Відібрану пробу культуральної рідини центрифугують за 10 000 g та 4 °С протягом 10 хв. Далі готують стандарти різної відомої концентрації та беруть зразок супернатанту в кінцевому об’ємі 160 мкл.

2. Додають 20 мкл 1 М NaOH. NaOH додається, щоб переконатися, що зразок не випадає в осад після додавання реактиву Бредфорда на кроці 4. Якщо зразок, що не містить NaOH, випадає в осад після додавання реактиву Бредфорда, необхідно підготувати новий зразок, оскільки додавання NaOH після осадження не розчинить осад. Перед додаванням реактиву Бредфорда до нового зразка необхідно додати NaOH.

3. Додати 40 мкл реактиву Бредфорда в кожну лунку планшета для мікротитрації та ретельно перемішують. Використання багатоканального піпетора полегшує змішування. Якщо такого немає, обережно постукують по стороні планшета для мікротитрації, щоб уникнути перехресного забруднення лунок, або використовують мінішейкер.

4. Інкубують 5 хв при кімнатній температурі. Якщо вперше використовується формат мікротитраційного планшета, уважно оглядають лунки мікротитраційного планшета на лайтбоксі на наявність ознак утворення осаду. Якщо спостерігається осадження білка, додають 20 мкл 1 М NaOH і зменшують кінцевий об’єм зразка до 140 мкл.

5. Зчитують зразки на відповідній довжині хвилі (зазвичай 595 нм) за використання спектрофотометра.

6. Отримані результати переводять у масову концентрацію відповідно до стандартної калібрувальної кривої [58].

9.7. Методи ідентифікації білка

Метою є отримання кормового білка, що міститься в біомасі, що вимагає проведення ідентифікації білка. Кольорові реакції на білки є індикаторами функціональних груп радикалів амінокислот, що складають білки. Ці специфічні реакції часто використовуються у лабораторних умовах для ідентифікації та кількісного визначення білків і окремих амінокислот. Для досягнення мети та оцінки якості кормового білка важливо застосовувати методи, які дозволяють виявляти його присутність та визначати його кількість в біомасі [63].

Біуретова реакція - це метод виявлення білків та пептидів, який базується на їхньому взаємодії в лужному середовищі за наявності солей міді. Ця реакція отримала свою назву від біурету, який є похідним сечовини. Біурет має хімічну формулу H2N-CO-NH-CO-NH2 та містить у собі пептидний зв'язок, який також присутній в молекулах білків.

Принцип цієї реакції полягає в тому, що біурет утворюється з сечовини та набуває того ж кольору, що й сечовина. Внаслідок біуретової реакції у речовинах виявляють пептидний зв'язок, який утворюється за участю карбоксильної групи однієї амінокислоти та аміногрупи іншої, з видаленням

молекули води. Важливо відзначити, що вільні амінокислоти таку реакцію не проявляють.

Біуретова реакція властива лише для речовин, які мають не менше двох пептидних зв'язків. У сильнолужному середовищі білки утворюють комплексні сполуки з міддю, які забарвлюються у червоно-фіолетовий або синьо-фіолетовий колір. Забарвлення цих комплексів залежить від довжини пептидного ланцюга. Для прикладу, дипептиди забарвлюються у синій колір, трипептиди - у фіолетовий, а пептиди з довжиною ланцюга від чотирьох амінокислотних залишків мають червоний колір. Таким чином, розчини білків мають синьо-фіолетове забарвлення, тоді як пептони, що є продуктами неповного гідролізу білків, мають рожеве або червоне забарвлення [64].

Матеріали: 1% розчин білка, 10% розчин NaOH, 0,5% розчин $CuSO_4$, пробірки, піпетки.

Виконання дослідження: до 2-3 мл розчину білка додають таку ж кількість 10% розчину NaOH та кілька крапель 0,5% $CuSO_4$. Таким чином спочатку виникає рожеве забарвлення, яке при додаванні розчину купруму сульфату переходить у червоний, фіолетовий та синій колір [35].

Таким чином проводять ідентифікацію білків.

9.8. Визначення показників якості

Перший параметр, який необхідно оцінити - зовнішній вигляд. Його можна визначити шляхом візуального огляду. Очікується, що колір продукту буде від жовтого до світло-коричневого.

Другий аспект - вологість. Визначити загальну кількість води у кормах можна за допомогою швидкого методу. Невелику кількість подрібненого корму розміщують в бюксі або металевій чашці, після чого викладають у сушильну шафу і нагрівають до 130^oC [66].

Проведення дослідження

Попередньо висушені до стійкої маси скляні або алюмінієві бюкси додають дві наважки корму в кількості по 5 грамів кожна (зважують з точністю до 0,01 г). Наважки розсипаються тонким шаром по дну бюксів.

Після цього відкриті бюкси разом з кришками поміщають у передньо підігріту до температури 130±2°С електросушильну шафу і тримають наважки протягом 40 хвилин. Якщо корми мають підвищений вміст вологи, їх слід просушувати в шафі до однієї години.

Після 40-хвилинного висушування бюкси з сушильної шафи виймають тигельними щипцями, швидко закривають кришками і залишають на 20-30 хвилин у ексикаторі для охолодження до кімнатної температури.

Після охолодження в ексикаторі бюкси з досліджуваними зразками знову зважують. Встановлюють вміст вологи за різницею маси до та після висушування, використовуючи наступну формулу [57]:

$$X = \frac{m - m_1}{a} \times 100$$

де X – загальний вміст води в кормі; %; m – маса корму до висушування, г; m_1 – маса корму після висушування, г; а – наважка корму, г; 100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки [28].

Показник вологості має становити не більше 10%.

9.9. Частка жиру та ліпідхих залишків у кінцевому продукті

Метод С.В. Рушковського використовується для визначення жиру за кількістю знежиреного залишку [58].

Для проведення цього методу необхідно мати наступне обладнання: апарат Сокслета, органічний розчинник, сушильна шафа, бюкси, ексикатор і паперові пакетики з фільтрувального паперу. Апарат Сокслета складається з колби – випаровувача, екстрактору та кулькового холодильника, при цьому екстрактор має дві трубки – більш широку та вузьку (сифон). Перед початком

роботи апарат Сокслета збирають, з'єднуючи колбу для розчинника з екстрактором, а потім екстрактор приєднують до холодильника. У готовому вигляді апарат Сокслета закріплюють у штативі Бунзена.

Проведення дослідження включає такі етапи:

Готують пакети з фільтрувального паперу, поміщають їх у бюкси та висушують у сушильній шафі при температурі 100 – 105°С, після чого охолоджують у ексикаторі та зважують. До кожного пакету додають 1–2 г досліджуваного зразка, кладуть в бюкс та висушують при температурі 100 – 105°С до постійної маси.

Висушені та зважені в бюксах пакети з кормом поміщають в екстрактор апарату Сокслета, заливають органічним розчинником (200–250 мл ефіру) та залишають на ніч. Наступного дня доливають в екстрактор таку кількість ефіру, щоб після його зливання з екстрактору в ньому залишався деякий надлишок ефіру (орієнтовно 50 – 25 мл).

Колбу апарату Сокслета розміщують на водяній бані, нагрівають на повільному вогні, при цьому розчинник не має сильно кипіти. Під час нагрівання ефір випаровується і піднімається по широкій трубці екстрактору в холодильник. Там він конденсується та стікає по краплях у екстрактор, де знаходяться пакети з досліджуваним зразком. Коли екстрактор наповниться ефіром до верхнього згину сифонної трубки, ефір з розчиненим у ньому жиром стікає з сифонної трубки в колбу.

Під час оптимального режиму екстракції протягом 1 години відбувається 4–5 зливань ефіру. Корми з високим вмістом жиру екстрагують 10–12 годин, а з низьким вмістом – 5–6 годин.

Після закінчення екстракції пакети виймають, розкладають на великому годинниковому склі та висушують. Потім пакети поміщають у відповідні бюкси та висушують при 100 – 105°С до постійної маси.

Вміст сирого жиру визначають наступ [59]:

$$x = \frac{(m - m_1) \times 100}{b},$$

де х – вміст сирого жиру в кормі, який досліджується,%; m – маса бюкси і пакетика з наважкою корму після висушування до екстрагування жиру; m_1 – маса бюкси і пакетика з наважкою після екстрагування та висушування; b – наважка корму в повітряно–сухому стані; 100 – коефіцієнт для переведення у відсотки [28].

Частка жиру має становити не більше 10%.

4) **Вміст золи**

Визначають шляхом окиснення. Для цього необхідно мати наступні матеріали: аналітичні ваги з похибкою зважування не більше 0,0002 г, муфельну піч, порцелянові тиглі різних розмірів (№ 3-4-5), ексикатор, тигельні щипці, азотну кислоту, азотнокислий амоній, перекис водню та 30%-ий водний розчин.

Для проведення дослідження виконують наступні кроки:

Порцелянові тиглі прожарюють протягом 30 хвилин до 1 години в муфельній печі за температури темно-червоного каління.

Після прожарювання тиглі переносять з муфеля за допомогою тигельних щипців в ексикатор і охолоджують протягом 1 – 1,5 години.

Зважують порожній тигель на аналітичних вагах, фіксують його масу, потім вносять 2-5 г досліджуваного зразка в тигель і зважують тигель з кормом. Різницю мас використовують для визначення кількості аналізованого зразка.

Тиглі поміщають в холодну муфельну піч, вмикають на слабкий нагрів, відкриваючи двері муфеля для кращого доступу повітря. Після 50-60 хвилин при 250-300°С після припинення диміння зразка в тиглі, нагрів муфеля збільшують до 450-500°С, змінюючи положення важеля реостата. Тиглі в

муфелі залишають на 2-3 години при темно-червоному накалюванні до одержання золи світло-сірого кольору.

Після завершення прожарювання, тиглі з золою охолоджують у вимкненій муфельній печі, після чого переносять до ексикатора і зважують. Кількість сирої золи в повітряно-сухій речовині досліджуваного зразка визначається за допомогою спеціальної формули [40]:

$$X = \frac{m - m_1}{a} \times 100$$

де X – вміст золи, %; m – маса тигля з сирою золою, г; m_1 – маса порожнього тигля, г; а – наважка корму, г.; 100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки.

Вміст золи має становити не більше 17%.

Вміст білка

Метод Дюма отримав широке поширення у лабораторній практиці для визначення вмісту білка. При цьому методі зразок піддається високій температурі (900–1030 °C) у спеціальній лунці в атмосфері кисню, де відбувається його спалювання, що призводить до виділення CO2, H2O та N2. Газовий аналізатор з теплопровідністю (TCD) LoGas™, який не потребує газу для порівняння, визначає вміст азоту, а потім результат порівнюється з калібрувальною кривою (GOST R 54390- 2011). Основною перевагою цього методу є його швидкість: він не потребує токсичних речовин чи каталізаторів, майже не потребує підготовки зразків (за винятком розмелу) і займає всього кілька хвилин для проведення одного вимірювання [61].

Очікуваний вміст білка повинен бути в межах 65-72%.

9.10. Оцінка біологічної дії

Оскільки кінцевий продукт представляє собою кормовий білок, можна визначити його біологічну активність шляхом аналізу перетравності поживних речовин у кормі [30]. Під перетравністю розуміють здатність поживних речовин корму розщеплюватися під впливом ферментів травних соків та мікроорганізмів до простих сполук, які можуть бути засвоєні у травному тракті тварини. Перетравлені поживні речовини (ППР) розраховуються як різниця між кількістю спожитих поживних речовин у кормі (ПР корму) та виділеними з калом (ПР калу).

Оскільки перетравність є узагальненою характеристикою корму, який можна давати у різних кількостях, вона виражається не у абсолютних, а у відносних величинах. Кількість перетравленої речовини, виражена у відсотках від спожитої, називається коефіцієнтом перетравності. Його розраховують за наступною формулою: [62]:

$$КП=\frac{ППР x 100}{ПР корму},$$

Зазвичай встановлюють коефіцієнти перетравності органічної речовини, білка, жиру, клітковини і енергії корму. Для цього проводять спеціальні експерименти, в яких задіяні не менше трьох тварин однієї породи та статі, які мають схожий вік, живу масу, харчування та продуктивність. Для годівлі використовують корми з відомим хімічним складом.

Експеримент розділяється на два етапи: підготовчий та спостережний. У підготовчому етапі тварин привчають до вживання досліджуваного корму. Його тривалість, залежно від виду тварин, становить від 6 до 15 днів. У спостережний період, який триває від 5 до 10 днів, збирають кал, визначають його масу та відбирають 3-10% для аналізу. Спостереження за споживаним тваринами кормом проводять протягом всього експерименту [63].

9.11. Карта постадійного контролю

Таблиця 9.1

Карта постадійного контролю виробництва мікробного білка

Позначення контрольної точки	**Показник контролю та об'єкт**	**Методи контролю**	**Періодичність відбору аналізованої проби та час аналізу**	**Значення нормативу**
1	*2*	*3*	*4*	*5*
Кт 1.1 *Груба очистка повітря і метану з вуглекислим газом*	**Очищене повітря і біогаз** Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очистки відповідно до інформації, зазначеної паспортом фільтра	Після пропускання через фільтр грубої очистки	Е = 90%
Кт 1.2 *Компресування попередньо очищеної суміші*	**Стиснена суміш** Тиск	Манометр	Після завершення компресування	Р = 0,35 МПа
Кт 1.3 *Очистка на головному фільтрі*	**Очищена суміш** Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очистки відповідно до інформації, зазначеної паспортом фільтра	Після проходження через головний фільтр	Е = 95%
Кт, Км 1.4 *Фільтрування на індивідуальному фільтрі*	**Очищена газова суміш** Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення відповідно до інформації, зазначеної паспортом фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження через індивідуальний фільтр	Е = 99,999%, КУО - 0

Продовження табл. 9.1

Кт, Кх 2.1.1 *Приготування 6 %-го розчину сульфатної кислоти для підкислення середовища в інокуляторах та газовому біореакторі*	**Розчин сульфатної кислоти** Концентрація	Фізико-хімчний метод	Перевірка після приготування розчину	С = 6 %
Кт, Кх, Км 2.2.1 *Приготування 6 %-го розчину натрію гідроксиду для підкислення середовища в інокуляторах та газовому біореакторі*	**Розчин натрію гідроксиду** Концентрація, тиск, час, стерильність	Фізико-хімчний метод, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Перевірка концентрації після приготування розчину. Час і тиск контролюються безперервно протягом стерилізації. Мікробіологічний контроль – після завершення стерилізації	С = 6 %, Р = 0,15 МПа, t = 131 ℃, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.2.1 *Приготування і стерилізація розчину мікроелементів для вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу*	**Розчин мікроелементів** Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Час і тиск контролюються безперервно протягом стерилізації. Мікробіологічний контроль – після завершення стерилізації	Р = 0,15 МПа, t = 131 ℃, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 9.1

Кт, Км 4.1.1 *Приготування і стерилізація дріжджового автолізату*	**Дріжджовий автолізат** Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Час і тиск контролюються безперервно протягом стерилізації. Мікробіологічний контроль – після завершення стерилізації	P = 0,05 МПа, t = 112 ℃, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2 *Приготування і стерилізація живильного бульйону*	**Живильний бульйон** Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Час і тиск контролюються безперервно протягом стерилізації. Мікробіологічний контроль – після завершення стерилізації	P = 0,05 МПа, t = 112 ℃, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1, 4.3.1, 4.4.1, 4.5.1 *Приготування і стерилізація поживного середовища для стадій вирощування інокуляту у колбах на качалках та інокуляторах на 10, 30 і 100 л та виробничого біосинтезу у газовому біореакторі на 300 л* *Приготування і стерилізація композиції А*	**Композиція А** Діаметр пор, стерильність	Діаметр пор перевіряють згідно зі значеннями, встановленими у паспорті фільтра	Діаметр пор контролюють перед процесом пропускання через фільтр, стерильність – після завершення процесу	d = 0,45 мкм, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 9.1

Кт, Км 4.2.2, 4.3.2 *Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках та інокуляторі на 10 л* *Приготування і стерилізація композиції Б*	**Композиція Б** Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Час і тиск визначаються постійно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.2, 4.5.2 *Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у інокуляторі на 100 л та виробничого біосинтезу у газовому біореакторі на 300 л* *Приготування і стерилізація композиції Б*	**Композиція Б** Тиск, температура, час, pH, стерильність	Манометр, годинник, датчик температури, датчик pH, мікробіологічний контроль	pH визначається перед стерилізацією та контролюється протягом всього процесу. Час, температура і тиск визначаються постійно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 ℃, pH = 4,0 – 4,5, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 9.1

Кт, Км 6.1 *Підтримання колекційної метилотрофної культури*	**Колекційна культура *M. capsulatus* NCIMB 11132** температура, мікробіологічна чистота	Холодильник, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожні 3-4 місяці	t = 2 – 4 ℃, τ = 3 – 4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.2 *Одержання робочої метилотрофної культури*	**Робоча культура *M. capsulatus* NCIMB 11132 на чашках Петрі** температура, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 45±1 ℃, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.3 *Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах*	**Робоча культура *M. capsulatus* NCIMB 11132 у пробірках** температура, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 45±1 ℃, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.4 *Вирощування інокуляту у колбах на качалці*	**Посівний матеріал** температура, час, швидкість перемішування, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль	Температура і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 45±1 ℃, τ = 48 год, w = 180 об/хв, Сб = 5,1 – 5,2 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 9.1

Кт, Км 6.5, 6.6, 6.7 *Вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 10, 30 і 100 л*	**Посівний матеріал** температура, час, швидкість пере-мішування, концентрація розчиненого кисню, pH, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Манометр, годинник, датчик температури, датчик pH, pO_2, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль	pH визначається перед вирощуванням та контролюється протягом всього процесу. Температура, тиск, концентрація розчиненого кисню, час і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 45±1 ℃, τ = 48 год, w = 180 об/хв, pO_2 = 20 –30%, pH = 6,8 – 7,0, Сб = 5,1 – 5,2 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл. 9.1

Кт, Км 7.1 *Виробничий біосинтез у газовому біореакторі об'ємом 300 л*	**Культуральна рідина** температура, час, швидкість перемішування, концентрація розчиненого кисню, pH, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Манометр, годинник, датчик температури, датчик pH, pO_2, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль	pH визначається перед вирощуванням та контролюється протягом всього процесу. Температура, тиск, концентрація розчиненого кисню, час і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 45±1 ℃, τ = 48 год, w = 180 об/хв, pO_2 = 20 –30%, pH = 6,8 – 7,0, Сб = 10,2 – 10,3 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

РОЗДІЛ 10. ПЕРСПЕКТИВИ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Сьогодні під екологізацією розуміють процес поступового і послідовного впровадження систем технологічних, управлінських та інших рішень, які дозволяють підвищувати ефективність використання природних ресурсів і умов поряд з покращенням або хоча б збереженням якості природного середовища. Це одна з головних вимог сучасності в умовах глобальної екологічної кризи. В соціально-економічному плані екологізація повинна спиратися на перехід до природозберігаючих методів господарювання, а в технічному – на екологізацію технологій виробництва і природокористування. На території біотехнологічних підприємств утворюються три категорії відходів: виробничі, побутові й атмосферні [67].

10.1 Системи знешкодження рідких відходів

Під час виробництва мікробного білка з використанням одноклітинних мікроорганізмів метилотрофної бактерії *Methylococcus capsulatus* NCIMB 11132, що вирощується із гетеротрофними бактеріями (ацетогеннами) *Alcaligenes acidovorans*, *Aneurinibacillus danicus* і *Brevibacillus sp* утворюються рідкі відходи у вигляді:

- використаних мийних і дезінфікуючих засобів;
- відпрацьованої води для ополіскування обладнання.

10.1.1 Розрахунки орієнтовного об'єму стічних вод

Відповідно до специфікації обладнання, для цього розрахунку будемо використовувати реактори-збірники та ферментери.

$V_{ємностей}=V_{реактор}+V_{ферментер}+V_{реактор}=10+30+100+300=440$ л

Для миття та дезінфекції обладнання необхідно приготувати робочі розчини із розрахунку 20-30% від об’єму обладнання.

$V_{засобів}$ = 440×0,2 =88 л

$V_{засобів}$ = 440×0,3 = 132 л

Припускаємо, що об'єм відпрацьованих залишків засобів дорівнює об'єму цих засобів, тобто 88 – 132 л.

Об'єм води для ополіскування становить 20-30% від об'єму ємнісного обладнання.

Як і розраховано вище, цей параметр дорівнює 88 – 132 л. Таким чином, у сумі орієнтовна кількість стічних вод за один цикл виробництва становитиме: 132 +132 = 264 л.

Орієнтовний об'єм стічних вод на 0,5 $м^3$ кінцевого продукту становить .

Згідно з розрахунками за один цикл отримуємо 177,3 л культуральної рідини, кількість кінцевого продукту 5,2 г/л, =0,0052кг

Тобто 177,3 ×0,0052= 0,922 кг

Оскільки основна частина культуральної рідини є вода, то 177,3 - 0,922 = 176,378 л

Таким чином, за один виробничий цикл отримуємо 0,922 кг кінцевого продукту та 176,378 л води

Отже, на 0,3 $м^3$ готової продукції, утворюється:

(300×176,378)/ 0,922 = 48 786,2 л стічних вод

10.1.2. Визначаємо середні витрати стічних вод від промислового підприємства.

Для розрахунку візьмемо дані з ТЕО.

$$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-E_ф) = 159,6/0,9 = 177,3 \text{ л},$$

Тоді,

$Q_e = q_e \times n$;

де qe - норма водовідведення в л на одиницю продукції, яку випускає підприємство; n - кількість одиниць продукції, що виробляється за зміну (розраховується у масових одиницях випуску готової продукції на добу).

Середні за зміну витрати побутових стічних вод становлять:

$Q_n = q_n \times N = 25 \times 5 = 125$ л/зміну,

де q_n – норма відведення побутових стічних вод в л/зм на одного робітника (приймаємо для холодного цеху 0,025 $м^3$/зм люд); N – кількість робітників, що працюють у зміну, приймаємо 5.

Середні за добу витрати побутових стічних вод становлять:

$Q_n = Q_n \times N_{зм} = 125 \times 2 = 250$ л/добу

де $N_{зм}$ – кількість змін на добу ($N_{зм} = 4$).

Загальна за добу витрата атмосферних стічних вод становлять:

$Q_a = Q_n/15 = 250/15 = 16,6$ л/добу.

Загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві, становлять:

$Q = Q_e + Q_n + Q_a = 1,66 + 250 + 16,6 = 268,26$л/добу.

10.1.3. Система очищення стічних вод

Система очищення стічних вод для підприємства потребує спеціалізованого підходу, щоб забезпечити ефективну очистку води від забруднень і дотримання екологічних норм. Основні компоненти такої системи можуть включати попередню обробку, фізико-хімічну очистку, біологічну очистку та моніторинг і контроль якості. На початковому етапі стічні води піддаються попередній обробці для видалення великих твердих частинок, таких як осад. Це може бути досягнуто за допомогою грубих фільтрів або сіток, які затримують великі забруднювачі. Механічне видалення великих частинок є важливим кроком для запобігання засміченню обладнання на наступних етапах очищення [68].

Фізико-хімічна очистка включає процеси коагуляції та флокуляції, під час яких додаються спеціальні хімічні речовини (коагулянти і флокулянти). Вони сприяють утворенню флокул – великих агрегатів дрібних частинок і забруднень. Сформовані флокули легше видаляються з води за допомогою фільтрації або осадження в спеціальних осадниках, що дозволяє значно зменшити концентрацію зважених речовин у воді. Для подальшого розкладання органічних забруднень використовуються біологічні процеси. Це може бути здійснено за допомогою біологічних фільтрів або систем активного мулу. В цих системах бактерії і мікроорганізми розкладають органічні сполуки на більш прості речовини, такі як вуглекислий газ і вода. Цей етап є критичним для видалення біологічно розкладних забруднень.

Постійний моніторинг якості води на різних етапах очищення є важливою частиною системи. Це включає вимірювання параметрів, таких як рівень pH, концентрація розчиненого кисню, хімічне споживання кисню (ХСК) і біохімічне споживання кисню (БСК). Моніторинг дозволяє забезпечити відповідність якості води нормативним вимогам та ефективно керувати процесом очищення. Ця комплексна система очищення стічних вод допомагає забезпечити ефективне та екологічно безпечне видалення забруднень, що дозволяє підприємству дотримуватися екологічних норм і стандартів [69].

10.2. Системи знешкодження газоподібних відходів

Газоподібні відходи біотехнологічних виробництв виникають під час отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу у вигляді використаного повітря, яке містить аерозольні частки клітин продуцента.

Розрахуємо об’єм відпрацьованого повітря, знаючи, що він приблизно дорівнює об’ємам аераційного повітря.

В інокуляторі 300 л , отже аераційного повітря потрібно 2 л/хв, тобто 300×2=600 л/год. Процес отримання посівного матеріалу займає 48 год, для цього необхідно 48×600 = 28 800 л аераційного повітря на виробничий цикл.

10.3. Системи знешкодження твердих відходів

Непридатні хімічні реактиви вимагають спеціальних заходів для їх зберігання та утилізації. Їх рекомендується зберігати у спеціальних відокремлених шафах і передавати спеціалізованим організаціям, які займаються обробкою небезпечних хімічних речовин відповідно до технологічних стандартів. Інші тверді відходи, такі як упаковочні матеріали та скло, слід збирати в окремі контейнери з кришками для подальшої передачі на переробку до пунктів вторинної переробки. Перед цим всі пакувальні матеріали необхідно сортувати та транспортувати до відповідних пунктів прийому вторсировини. Цей процес сприяє ефективному використанню ресурсів і допомагає зменшити негативний вплив на навколишнє середовище [70].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Adedayo, M.R., Ajiboye, E.A., Akintunde, J.K., Odaibo, A. 2011. SCP: As nutritional Enhancer. J. Microbiol., 2(5): 396- 409.

2. Ferrianti, M.P. and A. Fiechter, 1983. Production and Feeding of Single Cell Protein. Applied Science Publications, London, ISBN: 085334231, pp: 201

3. Mondal, A.K. 2006. Production of single cell protein from fruits waste by using Saccharomyces cerevisiae. Am. J. Food Technol., 58: 117 134.

4. Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., and Morowvat, M. H. (2011). "Algae for the production of SCP," in Biochemistry Research trends. Bioprocess Sciences and Technology, ed. M.-T. Liong (New York: Hauppage) 163–184. Режим доступу до ресурсу: https://www.researchgate.net/profile/Mohammad-Hossein-Morowvat/publication/278410537_Algae_for_the_production_of_SCP/links/558081ed08ae47061e5f3253/Algae-for-the-production-of-SCP.pdf

5. Enhanced Production of Single Cell Protein from M. capsulatus (Bath) Growing in Mixed Culture. [Електронний ресурс] // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 6(3):894. DOI:10.15414/jmbfs.2016/17.6.3.894-899

6. Sun, Y., Chen, Y., Shen, H., Chen, X., Sun, M., Xie, S., ... & Lou, L. (2016). Application of gas-lift bioreactors for large-scale bioprocessing of marine microorganisms. Marine drugs, 14(4), 73.

7. Calabro, V., Bowles, T., Dienes, D., & Kurzawski, D. (2021). Methylococcus capsulatus with specific methane conversion activity and enhanced biofilm formation. Applied Microbiology and Biotechnology, 105(8), 3457-3467.

8. Vadlja, D., Veider, A., Skerget, M., & Knez, Ž. (2013). Advanced bioreactors for CO2 capture using immobilized microalgae. Journal of CO2 Utilization, 3, 50-59.

9. Deng, Y., Zhang, Z., & Ruan, Z. (2018). Optimization of bioreactor parameters for biohydrogen production from wastewater. Frontiers in Microbiology, 9, 2741.

10. Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers by Shang-Tian Yang.

11. Bioreactors: Design, Operation and Novel Applications edited by Carl-Fredrik Mandenius and Nigel Jenkins.

12. Bioprocess Engineering: Basic Concepts by Michael L. Shuler and Fikret Kargı.

13. Industrial Microbiology: An Introduction by Michael J. Waites, Neil L. Morgan, John S. Rockey, and Gary Higton.

14. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology (Journal) - This journal publishes research articles and reviews on various topics related to biochemical engineering and biotechnology, including bioreactor design and microbial cultivation

15. Kalyuzhnaya, M. G., Yang, S., Rozova, O. N., Smalley, N. E., Clubb, J., Lamb, A., ... & Lidstrom, M. E. (2015). Highly efficient methane biocatalysis revealed in a Methane-oxidizing bacterium. Nature communications, 6(1), 1-11.

16. Bowman JP, Sly LI, Nichols PD, Hayward AC. Revised taxonomy of the methanotrophs: Description of Methylobacter gen. nov., emendation of Methylococcus, validation of Methylosinus and Methylocystis Species, and a proposal that the family Methylococcaceae includes only the group I methanotrophs. Int J Syst Evol Microbiol 1993; 43:735–753 [Google Scholar]

17. A Genome-Scale Metabolic Model for Methylococcus capsulatus (Bath) Suggests Reduced Efficiency Electron Transfer to the Particulate Methane Monooxygenase [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02947/full.

18. Methylococcus capsulatus. Taxonomy [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/tree/?taxon=414.

19. Methylococcus capsulatus [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/414/.

20. Гончарук І. В. Виробництво біогазу в аграрному секторі—шлях до підвищення енергетичної незалежності та родючості грунтів. *Агросвіт*. 2020, 15: 18-29. doi: 10.32702/2306&6792.2020.15.18.

21. Scarlat N., Dallemand J.-F., Fah F. Biogas: Developments and perspectives in Europe. *Renewable Energy*. 2018, 129: 457–472. doi: 10.1016/j.renene.2018.03.006.

22. Панцирева Г. В. Технологічні аспекти виробництва біогазу з органічної сировини. *Вісник Харківського національного технічного університету сільського господарства, Вип. 199 «Механізація сільськогосподарського виробництва»*. 2019. С. 276-290.

23. Марцинкевич В., Коломієць Н. Поводження з відходами тваринництва: переваги технології анаеробного зброджування. Національний екологічний центр України.–К.: Print Quick, ФОП Попов Дмитро Вікторович. 2015.

24. Ievstafiieva Y., Levytska V., Terenov D. Biogas production as a component of green energy generation. *In Renewable Energy Sources: Engineering, Technology, Innovation: ICORES 2017 Cham: Springer International Publishing*. 2018, 755-764. doi: 10.1007/978-3-319-72371-6_74.

25. Охота Ю. В., Козак К. В. Основні тенденції ефективного використання біогазу в Україні. *Ефективна економіка*. 2018, 4. URL: http://www. economy. nayka. com. ua/? op= 1&z= 6264.

26. Качура В. Біогазові установки–успіхи, плани в Україні. Матеріали Міжнародної студентської науково-технічної конференції «Природничі та гуманітарні науки. Актуальні питання». Подільськ, 2020. С. 235-236.

27. Отримання біогазу шляхом анаеробного зброджування. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://elib.tsatu.edu.ua/dep/mtf/ophv_4/page11.html.

28. Біогазові установки: економічна доцільність та перспективи на майбутнє. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://agroelita.info/biohazovi-ustanovky-ekonomichna-dotsilnist-ta-perspektyvy-na-maybutnie-2/.

29. Nunes J. J., Aufderheide B., Ramjattan D. M., Dass R. Enhanced production of single cell protein from *M. capsulatus* (Bath) growing in mixed culture. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2016, 6 (3): 894. doi: 10.15414/JMBFS.2016/17.6.3.894-899.

30. Methane metabolism - Methylococcus capsulatus [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://www.genome.jp/pathway/mca00680.

31. Rasouli Z., Valverde-Pérez B., D'Este M., De Francisci D., Angelidaki I. Nutrient recovery from industrial wastewater as single cell protein by a co-culture of green microalgae and methanotrophs. *Biochemical Engineering Journal*. 2018, 134: 129-135. doi: 10.1016/j.bej.2018.03.010.

32. Hou D., Jassby D., Nerenberg R., Ren Z. J. Hydrophobic Gas Transfer Membranes for Wastewater Treatment and Resource Recovery. *Environmental Science & Technology*. 2019, 53 (20): 11618 – 11635. doi: 10.1021/acs.est.9b00902.

33. Clermont D., Harmant C., Bizet C. Identification of Strains of *Alcaligenes* and *Agrobacterium* by a Polyphasic Approach. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, 39 (9): 3104 – 3109. doi: 10.1128/jcm.39.9.3104-3109.2001.

34. Kaur C., Selvakumar G., Ganeshamurthy A. N. Exploring the Utility of *Aneurinibacillus* as a Bioinoculant for Sustainable Crop Production and Environmental Applications. *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol*. 2019. doi: 10.1007/978-3-030-15175-1_7.

35. Ray S., Patel N., Amin D. *Brevibacillus. Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. 2020, 149–167. doi: 10.1016/B978-0-12-823414-3.00009-5.

36. Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM. 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics 31:3210–3212. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351

37. Дезінфікуюча дія перекису водню та лізоформіну на грамнегативні бактерії, які контамінують виробництва харчової промисловості / І. М. Фуртат, Т.

В. Нів'євська, Л. О. Горбатько, Л. О. Михальський // Магістеріум. Вип. 16. Природничі науки / Національний університет "Києво-Могилянська академія". - 2004. - С. 29-35.

38. ІНСТРУКЦІЯ із застосування засобу «Новохлор-екстра» з метою дезінфекції, передстерилізаційного очищення та стерилізації [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://interdez.com.ua/wp-content/uploads/2020/06/Instructions-Novohlor-Extra-2019-uk.pdf

39. БІОМОЙ МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ (ІНСТРУКЦІЯ ПО ЗАСТОСУВАННЮ) [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/biomoj-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu/

40. Розчин для антисептики та гігієни рук, Sterillium Classic Pure,(Стериліум Класік Пур),5л. BODE CHEMIE. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://vdsstomat.com.ua/product/sterillium-klasik-pur-sterillium-classic-pure-5l/

41. НЕОСТЕРИЛ М / Baltiachemi. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://interdez.com.ua/product/antisepticheskoe-sredstvo-neosteril-m-baltiachemi-kiev

42. Лихач А. В. Промислова біотехнологія : курс лекцій / А. В. Лихач – Миколаїв : МНАУ, 2015. – 214 с.

43. Ali, S., Mushtaq, J., Nazir, F., & Sarfraz, H. (2017). Production and processing of single cell protein (SCP) - A review. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research, 4*, 86–94. https://scholar.google.com/scholar_lookup?&title=Production%20and%20processing%20of%20single%20cell%20protein%20%28SCP%29%20-%20A%20review&journal=European%20Journal%20of%20Pharmaceutical%20and%20Medical%20Research&volume=4&pages=86-94&publication_year=2017&author=Ali%2CS&author=Mushtaq%2CJ&author=Nazir%2CF&author=Sarfraz%2CH

44. Z. Amini Khoeyi, J. Seyfabadi, Z. Ramezanpour, Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. Aquac. Int. **20**, 41–49 (2012)

https://link.springer.com/doi/10.1007/s10499-011-9440-1

45. J.R. Banu, P.S. Kavitha, M. Guvanesekaran, G. Kumar, Microalgae based biorefinery promoting circular bioeconomy-techno economic and life- cycle analysis. Bioresour. Technol.**302**, 122822 (2020)

https://doi.org/10.1016%2Fj.biortech.2020.122822

46. M. Benedetti, V. Vecchi, S. Barera, L. Dall'Osto, Biomass from microalgae: the potential of domestication towards sustainable biofactories. Microb. Cell Factories **17**, 173 (2018). https://doi.org/10.1186/s12934-018-1019-3

47. R. Bermejo, E.M. Talavera, J.M. Alvarez-Pez, Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from Porphyridium cruentum: semipreparative high-performance liquid chromatographic separation and characterization of its subunits. J. Chromatogr. A 917(1–2), 135–145 (2001)

https://doi.org/10.1016%2FS0021-9673%2801%2900692-6

48. S.K. Bhatia, S. Mehariya, R.K. Bhatia, M. Kumar, A. Pugazhendhi, M.K. Awasthi, … Y.H. Yang, Wastewater based microalgal biorefinery for bioenergy production: progress and challenges. Sci. Total Environ. 751, 141599 (2021)

49. T.R. Brown, I. Dogaris, A. Meiser, L. Walmsley, M. Welch, G. Philippidis, Development of a scalable cultivation system for sustainable production of algal biofuels, in Proceedings of the 23rd European Biomass Conference & Exhibition, Vienna, Austria (2015, June), pp. 1–4

https://scholar.google.com/scholar?&q=T.R.%20Brown%2C%20I.%20Dogaris%2C%20A.%20Meiser%2C%20L.%20Walmsley%2C%20M.%20Welch%2C%20G.%20Philippidis%2C%20Development%20of%20a%20scalable%20cultivation%20system%20for%20sustainable%20production%20of%20algal%20biofuels%2C%20in%20Proc

eedings%20of%20the%2023rd%20European%20Biomass%20Conference%20%26%20Exhibition%2C%20Vienna%2C%20Austria%20%282015%2C%20June%29%2C%20pp.%201%E2%80%934

50. D.H. Cho, R. Ramanan, J. Heo, J. Lee, B.H. Kim, H.M. Oh, H.S. Kim, Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community. Bioresour. Technol. 175, 578–585 (2015)

https://doi.org/10.1016%2Fj.biortech.2014.10.159

51. M. Ghazvini, M. Kavosi, R. Sharma, M. Kim, A review on mechanical-based microalgae harvesting methods for biofuel production. Biomass Bioenergy 158, 106348 (2022)

https://doi.org/10.1016%2Fj.biombioe.2022.106348

52. L.M. González-González, S. Astals, S. Pratt, P.D. Jensen, P.M. Schenk, Impact of osmotic shock pre-treatment on microalgae lipid extraction and subsequent methane production. Bioresour. Technol. Rep. 7, 100214 (2019)

https://doi.org/10.1016%2Fj.biteb.2019.100214

53. A. Juneja, R.M. Ceballos, G.S. Murthy, Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. Energies 6(9), 4607–4638 (2013)

https://doi.org/10.3390%2Fen6094607

54. K. Banerjee, S. Das, P. Choudhury, S. Ghosh, R. Baral, S.K. Choudhuri, A novelapproach of synthesizing and evaluating the anticancer potential of silver oxide nanoparticles in vitro, Chemotherapy 62 (5) (2017) 279–289. https://karger.com/che/article-abstract/62/5/279/66455/A-Novel-Approach-of-Synthesizing-and-Evaluating?redirectedFrom=fulltext

55. V. Miikkulainen, M. Leskela, M. Ritala, R.L. Puurunen, Crystallinity of inorganic films grown by atomic layer deposition: overview and general trends, J. Appl. Phys. 113 (2) (2013) 2.https://pubs.aip.org/aip/jap/article-

abstract/113/2/021301/924855/Crystallinity-of-inorganic-films-grown-by-atomic?redirectedFrom=fulltext

56. . C. Davies, Annual Report of the Chief Medical Officer, Volume Two, 2011. Infections and the rise of antimicrobial resistance, London, 2013 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?orig_db=PubMed&db=pubmed&cmd=Search&term=Annual%20Report%20of%20the%20Chief%20Medical%20Officer,%20Volume%20Two,%202011.%20Infections%20and%20the%20rise%20of%20antimicrobial%20resistance%5BJour%5D%20AND%20%5Bvolume%5D%20AND%20%5Bpage%5D%20and%202013%5Bpdat%5D

57. Center for Disease Dynamics, Economics and Policy, State of the World's Antibiotics, 2015, http://cddep.org/publications/state_worlds_antibiotics_2015#sthash.ztACc9UO.dpbs.

58. Abdollahzadeh J, Zolfaghari S (2014) Efficiency of rep-PCR fingerprinting as a useful technique for molecular typing of plant pathogenic fungal species: Botryosphaeriaceae species as a case study. FEMS Microbiol Lett 361(2):144–157 https://doi.org/10.1111%2F1574-6968.12624

59. Chen X, Ugaz VM (2008) Investigating DNA migration in pulsed fields using a miniaturized FIGE system. Electrophoresis 29(23):4761–4767 https://doi.org/10.1002%2Felps.200800113

60. Cowan LS, Diem L, Brake MC, Crawford JT (2004) Transfer of a Mycobacterium tuberculosis genotyping method, spoligotyping, from a reverse line-blot hybridization, membrane-based assay to the Luminex multianalyte profiling system. J Clin Microbiol 42(1):474–477 https://doi.org/10.1128%2FJCM.42.1.474-477.2004

61. Bochner B.R. Global phenotypic characterization of bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 2009;33:191–205. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00149.x. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704929/

62. Lagier J.-C., Hugon P., Khelaifia S., Fournier P.-E., La Scola B., Raoult D. The Rebirth of Culture in Microbiology through the Example of Culturomics to Study Human Gut Microbiota. Clin. Microbiol. Rev. 2015;28:237–264. doi: 10.1128/CMR.00014-14. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4284300/
63. Breitwieser F.P., Lu J., Salzberg S.L. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. Brief. Bioinform. 2017 doi: 10.1093/bib/bbx120. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6781581/
64. Schuler B., Meyer G., Peña D., Mullins O.C., Gross L. Unraveling the Molecular Structures of Asphaltenes by Atomic Force Microscopy. J. Am. Chem. Soc. 2015;137:9870–9876. doi: 10.1021/jacs.5b04056. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26170086
65. Noble R., Fuhrman J. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. Aquat. Microb. Ecol. 1998;14:113–118. doi: 10.3354/ame014113. https://doi.org/10.3354%2Fame014113.
66. Xie C., Mace J., Dinno M.A., Li Y.Q., Tang W., Newton R.J., Gemperline P.J. Identification of Single Bacterial Cells in Aqueous Solution Using Confocal Laser Tweezers Raman Spectroscopy. Anal. Chem. 2005;77:4390–4397. doi: 10.1021/ac0504971 https://doi.org/10.1021%2Fac0504971
67. Ганна Щавинська. Шляхи екологізації виробництва [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://oldconf.neasmo.org.ua/node/2903
68. Навчально-методичний посібник "Технології захисту водного середовища" для спеціальностей 101"Екологія", 183 «Технології захисту навколишнього середовища» всіх форм навчання / Полтава: НУ «Полтавська політехніка імені Юрія Кондратюка», Миколаїв: Національний університет кораблебудування імені адмірала Макарова. 2022. – 306 с. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://reposit.nupp.edu.ua/bitstream/PoltNTU/11307/1/%D0%9D%D0%B0%D0

%B2%D1%87_%D0%BF%D0%BE%D1%81%D1%96%D0%B1_%D0%A2%D0%B5%D1%85%D0%BD%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%97%20%D0%B7%D0%B0%D1%85%D0%B8%D1%81%D1%82%D1%83%20%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%BD%D0%BE%D0%B3%D0%BE%20%D1%81%D0%B5%D1%80%D0%B5%D0%B4%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%89%D0%B0.pdf

69. Фільтр повітряний касетний, клас фільтрації F9 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-vozdushniy-kassetniy-klass-filtratsii-f9/

70. Чуєшов В. І., Гладух Є.В. Технологія ліків промислового виробництва. Том 2: підручник для фарм. ф-тів ВМНЗ IV р.а. – Вінниця: Нова Книга, 2014 – 664 с.