

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2025_ року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ДЯДЮК Єлизавети Ігорівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез альгінату *Azotobacter vinelandii*

керівник роботи БУЦЕНКО Людмила Миколаївна, проф. д.в.н.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 27 березня 2025 року №188-к

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Azotobacter vinelandii*, цільовий продукт: альгінат, об'єм ферментера 10,0 м³, коефіцієнт заповнення 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика альгінату. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування альгінату. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5.

Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва альгінату. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання виробництва альгінату. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми виробництва альгінату. РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення альгінату РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва альгінату.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва альгінату – 1 аркуш формату А1 і 1 аркуш формату А4. Апаратурна схема виробництв альгінату – 2 аркуші формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада Консультанта	Підпис, дата	
		завдання ви- дав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01березня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика альгінату	01.03.2025- 06.03.2025	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	06.03.2025- 15.03.2025	
3	Техніко-економічне обґрунтування аль- гінату	15.03.2025- 24.03.2025	
4	Біосинтез цільового продукту	25.03.2025- 28.03.2025	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва альгінату	28.03.2025- 13.04.2025	
6	Специфікація обладнання виробни аль- гінату	13.04.2025- 19.04.2025	
7	Опис технологічної схеми біосинтезу аль- гінату	20.04.2025- 04.05.2025	
8	Основні етапи виділення та очищення аль- гінату	05.05.2025- 19.05.2025	
9	Контроль виробництва альгінату	20.05.2025- 24.05.2025	
10	Оформлення пояснювальної записки	25.05.2025- 26.05.2025	
11	Виконання графічної частини проекту	27.05.2025- 28.05.25	

Здобувач _____
(підпис)

Єлизавета ДЯЦЮК _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Людмила БУЦЕНКО _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічної та апаратурної схем біосинтезу альгінату *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 із концентрацією 3,3 г/л. Альгінат є лінійним полісахаридом, який складається з блоків β -D-мануронової кислоти та α -L-гулууронової кислоти, що чергуються в різних пропорціях. Фізико-хімічні властивості альгінату роблять його універсальним матеріалом для широкого спектру застосувань, від харчових добавок до біомедичних матеріалів. Альгінат пропонується використовувати як компонент для виробництва лікарських засобів, зокрема препаратів для лікування гастриту.

Розрахована потужність біотехнологічного виробництва складає 1650,7 кг альгінату на рік. Технологічна схема біосинтезу альгінату включає допоміжні роботи (підготовка стерильного аераційного повітря, підготовку титрувальних розчинів HCl та NaOH, приготування запасного розчину молібдату натрію, приготування та стерилізацію поживних середовищ), а також безпосередньо технологічний процес (чотири стадії вирощування посівного матеріалу (у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 15 л, 120 л та 1250 л) та біосинтез у ферментері об'ємом 10,0 м³ зі змінним коефіцієнтом заповнення 0,6).

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, п'яти розділів, списку використаної літератури (80 найменувань), технологічної (формат A1) та апаратурної (формат A1) схем. Загальний обсяг роботи – 109 сторінок, 18 таблиць, 7 рисунка.

Ключові слова: альгінат, *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046, біосинтез, гастрит, технологічна схема, апаратурна схема.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological scheme and manufacturing flow chart for alginate biosynthesis by *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046, at a concentration of 3.3 g/l. Alginate is a linear polysaccharide composed of alternating β -D-mannuronic acid and α -L-guluronic acid units in varying proportions. The physicochemical properties of alginate make it a versatile material for a wide range of applications, from food additives to biomedical materials. Alginate is proposed to be used as a component for the production of medicines, in particular drugs for the treatment of gastritis.

The estimated capacity of biotechnological manufacture is 1650,7 kg of alginate per year. The technological scheme of riboflavin biosynthesis includes preparation of sterile aeration air, preparation of a stock solution of sodium molybdate, preparation of HCl solution and sterile NaOH solution for pH control, preparation and sterilization of seed and fermentation media and technological process (four stages of growing seed material (for flask culture, in inoculators 15 L, 120 L та 1250 L) and fermentation in a fermenter 10.0 m³ with a filling factor of 0.6.

The qualification work consists of an introduction, eight sections, references (80 items), technological scheme (A1format) and manufacturing flow chart (A1format). The total volume of the work is 108 pages, 18 tables, 7 figures.

Keywords: alginate, *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046, biosynthesis, gastritis, technological scheme, manufacturing flow chart.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ЗМІСТ	6
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЬГІНАТУ	10
1.1 Загальна характеристика продукту альгінат	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	13
2.2. Первинний розрахунок складу середовища для культивування.....	16
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного.....	19
2.3.1 Морфолого-культуральні ознаки.....	19
2.3.2 Фізіолого-біохімічні ознаки	20
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	21
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	22
3.1. Потреба у альгінаті у фармацевтичній промисловості	22
3.3. Розрахунок загальної кількості циклів проектованого виробництва альгінату та об'єму виробничого ферментера	26
3.4. Розрахунок кількості необхідних етапів для підготовки посівного матеріалу	27
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	31
4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	31
4.2 Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	33
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	40
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	40
5.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	42
5.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	43
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів	43
5.3.2 Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва альгінату	50
5.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	55

5.4.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	56
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	62
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	66
РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ АЛЬГІНАТУ ..	75
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	79
9.1. Мікробіологічний контроль	79
9.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури	79
9.3. Визначення концентрації альгінату.....	81
9.4. Визначення концентрації джерела вуглецевого (глюкоза) і азотного живлення (дріжджовий екстракт) у поживному середовищі	81
9.5. Визначення концентрації біомаси	82
9.6. Карта постадійного контролю.....	83
Перелік літератури:	87
ДОДАТКИ.....	95

ВСТУП

Вперше альгінат був описаний британським хіміком у 1881 році, як природний полісахарид, виділений з бурих морських водоростей. Виробництво альгінату в промислових масштабах почалося в 1929 році, використовуючи його як добавку для котлів, герметичний склад для банок, а пізніше як харчову добавку, таку як стабілізатор морозива. За оцінками, щорічно у світі виробляється щонайменше 30 000 тонн комерційного альгінату. Основні виробники альгінату зосереджені в шести країнах: Китаї, США, Великобританії, Японії, Чилі та Німеччині. Очікується, що ринкова вартість альгінату досягне 1,07 мільярда доларів США до 2028 року, а сумарний річний темп зростання (CAGR) становитиме 5,0% [1, 2].

Крім морських водоростей, альгінат також можна отримувати з бактерій, таких як *Azotobacter* та *Pseudomonas*. Бактеріальні альгінати становлять потенційний комерційний інтерес для використання в різних промислових цілях, від харчових добавок до біомедичних матеріалів. Бактеріальні альгінати піддаються ацетилюванню, відносна величина співвідношення M/G та їх ацетилювання змінюється залежно від виду бактерій та умов росту. Добре відомо, що склад альгінату, включаючи співвідношення M/G, ступінь ацетилювання та молекулярну масу (MW), визначає їх реологічні властивості. На відміну від альгінатів з морських водоростей (ацетилювання=0), бактеріальні альгінати мають високий ступінь ацетилювання, тоді як співвідношення M/G у альгінатах із *Pseudomonas* spp. трохи вище ніж у *A. vinelandii*. Ацетильні групи впливають на в'язкість і гнучкість альгінату. Тому виробництво бактеріального альгінату можна легко пристосувати для отримання молекул з різними характеристиками та складом, головним чином з точки зору молекулярної маси та розподілу M/G. З цієї причини бактеріальні альгінати становлять потенційний комерційний інтерес для використання в різних промислових цілях [1, 2, 3].

Альгінат зарекомендував себе як чудовий біорозкладаний, відновлюваний

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Дядюк Є.І.				Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						8	109
Керівник	Буценко Л.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В.П.						
ВСТУП							

і біосумісний матеріал з неімуногенністю та легкою здатністю до гелеутворення.

На основі даних дослідження [1], запропоновано проєкт біотехнологічного виробництва альгінату за допомогою штаму *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046, що синтезує 3,3 г/л альгінату (під час біосинтезу на поживному середовищі із сахарозою), а також технологічна і апаратурна схеми. Даний проєкт стосується етапу санітарно-гігієнічної підготовки виробництва (пошук і наведення прикладів миючих і дезінфікуючих засобів, їхніх цін на ринку, розрахунків об'ємів робочих розчинів і оброблюваних площ поверхонь). Крім того, проєкт демонструє спосіб виділення і очищення альгінату із культуральної рідини *A. vinelandii* на основі технології екстракції ацетоном.

Таким чином, **новизною кваліфікаційної роботи** є розробка комплексної технології біосинтезу альгінату із використанням штамом *A. vinelandii* ATCC 9046, щоб забезпечити ринок України великою кількістю дешевого полісахариду у вигляді альгінату натрію. Альгінат натрію може використовувати фармацевтична промисловість з метою виробництва лікарських засобів, зокрема для лікування диспепсії, пов'язаної з підвищеною кислотністю шлункового соку та гастроезофагеальним рефлюксом (печія, кисла відрижка), відчуттям тяжкості у шлунку.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЬГІНАТУ

1.1 Загальна характеристика продукту альгінат

Альгінат – це полісахарид, який складається з залишків β -D- мануронової кислоти (M-блок) і α -L-гулууронової кислоти (G-блок), зв'язаних 1,4-глікозидними зв'язками

Органолептичні Властивості

Альгінат, отриманий, зазвичай представлений у формі білого або легко забарвленого порошку. Якщо альгінат не був переведений у суху форму, він може мати вигляд гелеподібної маси. У порошкоподібному стані альгінат характеризується дрібнозернистою, легко розсипчастою текстурою. У вигляді гелю він демонструє в'язкі та еластичні властивості. Як правило, альгінат не має вираженого запаху, або запах є дуже слабким і нехарактерним. Чистий альгінат не має вираженого смаку, хоча може мати легкий солонуватий присмак через свій хімічний склад. *Azotobacter vinelandii* виробляє полісахарид альгінат, який відзначається визначними хімічними властивостями [6].

Хімічні властивості.

Альгінат є лінійним полісахаридом, який складається з блоків β -D-мануронової кислоти та α -L-гулууронової кислоти, що чергуються в різних пропорціях. Це полісахарид, відомий як сіль альгінової кислоти, з складною полімерною структурою. Хімічно він складається з блоків D-мануронової кислоти та L-гулууронової кислоти, з'єднаних через $\beta(1\rightarrow4)$ глікозидні зв'язки. Співвідношення та послідовність цих мономерів визначає властивості та функціональність альгінату. Альгінат розчиняється у воді, утворюючи в'язкі розчини. Розчинність залежить від ступеня полімеризації та пропорції мануронової та гулууронової кислот. Альгінат є аніонним полісахаридом, що містить карбоксильні групи, які надають йому здатність утворювати гелі при взаємодії з двовалентними катіонами, такими як кальцій (Ca^{2+}). Розчини альгінату характеризуються

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дядюк Є.І.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКЕРИСТИКА АЛЬГІНАТУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							10	109 10
Керівник		Буценко Л.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

високою в'язкістю, яка може варіюватися залежно від концентрації, молекулярної маси та температури. Альгінат є термостабільним полімером, що витримує високі температури без розпаду або втрати своїх властивостей. Він також не токсичний і біосумісний, що дозволяє його широке використання в медичних та фармацевтичних застосуваннях.

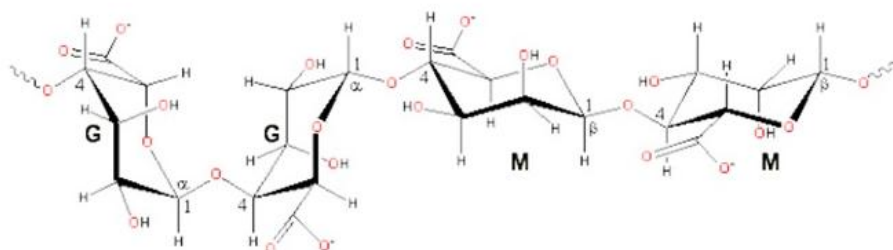


Рис. 1.1 Хімічна структурна формула альгінату [7]

Таблиця 1.1

Фізико-хімічні властивості альгінату

Найменування показника	Характеристика
Розчинність	Альгінат розчинний у воді, але нерозчинний у більшості органічних розчинників. Розчинність може змінюватися в залежності від рН, температури та наявності інших солей.
В'язкість	Розчини альгінату мають високу в'язкість, яка залежить від концентрації, молекулярної маси полімеру та температури розчину.
Гелеутворення	Альгінат утворює гелі у присутності двовалентних катіонів, таких як кальцій (Ca^{2+}). Гелеутворююча здатність альгінату є ключовою для його застосувань у харчовій промисловості та біомедицині.
Термостабільність	Альгінат є термостабільним і зберігає свої властивості при високих температурах.
рН-залежність	Властивості альгінату, зокрема розчинність та в'язкість, залежать від рівня рН. При низьких рівнях рН карбоксильні групи полісахариду протонуються, що впливає на його властивості.
Іонна взаємодія	Карбоксильні групи в альгінаті утворюють комплекси з різними металевими іонами, що може бути використано для видалення токсичних металів з водних розчинів.
Біосумісність та нетоксичність	Альгінат є біосумісним і нетоксичним, що робить його придатним для застосувань у біомедицині та фармацевтиці.

Фізико-хімічні властивості альгінату роблять його універсальним матеріалом для широкого спектру застосувань, від харчових добавок до біомедичних матеріалів. Альгінат володіє високою здатністю абсорбувати воду, що робить його цінним компонентом у виробництві дегідратованих продуктів, таких як добавки для схуднення. Він також застосовується в паперовій та текстильній промисловості для підвищення водонепроникності та у виробництві вогнетривких матеріалів. Завдяки своїм полімерним ланцюгам, альгінат може утворювати важкорозчинні солі з іонами лужноземельних металів, що використовується для створення пролонгованих форм лікарських препаратів. Його емульгуючі, загущувальні та стабілізуючі властивості знаходять застосування у виробництві паст, мазей та стабільних емульсій [8].

Додавання сульфатів до культурального середовища значно збільшує в'язкість нативного екзополісахариду (ЕПС), підвищуючи її на 146% порівняно з початковою в'язкістю без додавання солей. При розведенні в'язкість збільшується до 148%, а частково гідролізований ЕПС демонструє зростання в'язкості до 161%. Сульфати натрію і марганцю особливо сприяють підвищенню в'язкості, тоді як хлориди металів знижують в'язкість ЕПС до 61-84%, а розведеного та частково гідролізованого ЕПС – до 74-82%. Хлорид заліза (III), через свої сильні властивості кислоти Льюїса, негативно впливає на в'язкість гелю ЕПС, спричиняючи його випадання з розчину. Нітрати лужних та лужноземельних металів знижують в'язкість нативного та розведеного ЕПС до 60-70% від початкового рівня, але стабілізують частково гідролізований ЕПС [9].

Альгінат є стійким у діапазоні рН від 4 до 9 і може витримувати широкий інтервал температур. Він добре розчиняється у високомінералізованій та гарячій воді (при температурі близько 60°C), зберігаючи високу в'язкість, але не розчиняється у холодній воді та органічних розчинниках з концентрацією понад 30%. Ступінь полімеризації альгінату становить близько 950, що забезпечує його відмінні фізико-хімічні властивості та широке застосування в різних галузях промисловості [10].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІО-ЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Альгірати виробляються з коричневих водоростей, таких як *Macrocystis pyrifera*, *Sargassum sinicola* та *Laminaria hyperborean* за допомогою процесу екстракції. При екстракції використовують різні хімічні розчини, щоб витягти альгірат із водоростей. Також альгірати можуть бути отримані з культуральної рідини бактерій, зокрема *Pseudomonas aeruginosa* та *A. vinelandii*. У випадку бактерій, альгірат виробляється в процесі їх життєдіяльності та потім відділяється від інших компонентів культуральної рідини. *A. vinelandii* є особливо цінним джерелом альгірату через його непатогенні властивості та здатність виробляти альгірати високої якості [11]. *M. pyrifera*, вирощена на спеціалізованих морських фермах, часто використовується для виробництва альгірату, але її альгірат має меншу міцність і стабільність порівняно з альгіратом із *S. sinicola* та *L. hyperborean*. У зв'язку з патогенними властивостями *P. aeruginosa*, використання її альгірату в харчовій промисловості та медицині обмежене [2].

A. vinelandii виступає як ключовий непатогенний мікробний продуцент альгірату, що робить його ідеальним для застосування в харчовій промисловості. Цей мікроорганізм виробляє унікальний вид альгірату, який відрізняється від інших бактеріальних альгіратів завдяки включенню додаткових залишків гулулонової кислоти після полімеризації [1-2].

Як видно із даних, що наведено у таблиці 2.1. найбільшу кількість альгірату (3,8 г/л) продукує штам *Azotobacter vinelandii* АТ9 протягом 72 год вирощування [13]. Трохи меншу концентрацію альгірату – 3,3 г/л синтезує *Azotobacter vinelandii* АТСС 9046 за 65 год росту. [1].

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Дядюк Є.І.				Літ.	Арк.	Акрушія
Консульт.						13	109
Керівник	Буценко Л.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В.П.						
					РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІО-ЛОГІЧНОГО АГЕНТА		

Таблиця 2.1

Особливості одержання альгінату культивуванням різних штамів

Біологічний агент	Склад поживного середовища	Концентрація альгінату, г/л	Тривалість культивування	Умови культивування	Література
<i>Azotobacter vinelandii</i> AT9	Сахароза – 20,0 г/л, дріжджовий екстракт 3,0 г/л, K ₂ HPO ₄ – 0,66 г/л, KH ₂ PO ₄ – 0,16 г/л, CaSO ₄ ·2H ₂ O – 0,05 г/л, NaCl – 0,2 г/л, MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,2 г/л, Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O – 0,0029 г/л, FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,027 г/л	3,8	72 годин	29°C, pH 7,2, 200 rpm	García A. , Castillo T., Ramos D., Ahumada-Manuel C. L., Núñez C. , Galindo E., Büchs J., Peña C. Molecular weight and viscosifying power of alginates produced by mutant strains of <i>Azotobacter vinelandii</i> under microaerophilic Conditions. <i>Biotechnol Rep (Amst)</i> . 2020, 20:26:e00436. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00436
<i>Azotobacter vinelandii</i> ATCC 9046	Сахароза – 20,0 г/л, K ₂ HPO ₄ – 0,66 г/л, KH ₂ PO ₄ – 0,16 г/л, CaSO ₄ ·2H ₂ O – 0,05, NaCl – 0,2 г/л, MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,2 г/л, Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O – 0,0029 г/л, FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,027 г/л	3,3	65 годин	30°C, pH 7,0, 700 rpm	Díaz-Barrera A., Sanchez-Rosales F., Padilla-Córdova C., Andler R. Peña C. Molecular weight and guluronic/mannuronic ratio of alginate produced by <i>Azotobacter vinelandii</i> at two bioreactor scales under diazotrophic conditions. <i>Bioprocess Biosyst Eng</i> , 2021, 44(6):1275-1287. doi: 10.1007/s00449-021-02532-8.

Тому на наступному етапі вибору продуценту поівняємо вартість поживних середовищ для культивування (див. табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів альгінату

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна, грн/кг	Вартість компонентів (грн) на 1 л середовища	Джерело*
<i>Azotobacter vinelandii</i> AT9	Сахароза	20,0	29,9	0,59	1
	дріжджовий екстракт	3,0	1800,0	5,4	2
	K ₂ HPO ₄	0,66	138	0,091	4
	KH ₂ PO ₄	0,16	92,0	0,014	5
	CaSO ₄ ·2H ₂ O	0,05	25,0	0,001	6
	NaCl	0,2	12,9	0,002	7
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	32,0	0,006	8
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0029	1000,0	0,002	9
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,027	70,0	0,001	10
Вартість 1 л середовища – 6,11 грн.					
<i>Azotobacter vinelandii</i> ATCC 9046	Сахароза	20,0	29,9	0,59	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3	50,0	0,01	3
	K ₂ HPO ₄	0,66	138	0,09	4
	KH ₂ PO ₄	0,16	92,0	0,01	5
	CaSO ₄ ·2H ₂ O	0,056	25,0	0,001	6
	NaCl	0,2	12,9	0,002	7
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	32,0	0,006	8
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0029	1000,0	0,002	9
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,027	70,0	0,001	10
Вартість 1 л середовища – 0,74 грн.					

Примітка. * – Ціни наведено станом на січень 2025 р.

Умовна вартість 1 г альгінату, синтезованого на різних поживних середовищах

Біологічний агент	Концентрація, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість альгіна за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Azotobacter vinelandii</i> AT9	3,8	72	0,052	6,11	1,6
<i>Azotobacter vinelandii</i> ATCC 9046	3,3	65	0,050	0,74	0,22

Я видно із даних, наведених у табл. 2.2, найбільш дешеве поживне середовище (0,74 грн) для культивування *A. vinelandii* ATCC 9046, а найдорожче – для *A. vinelandii* AT9 (6,11 грн).

На заключному етапі вибору біологічного агента розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3). Найвища умовна вартість цільового продукту становить 1,6 грн/г для *A. vinelandii* AT9, що у майже 8 рази вище за мінімальну вартість цільового продукту – 0,22 грн/г для *A. vinelandii* ATCC 9046

Враховуючи це, а також вище наведені цифри, найбільш оптимальним продуцентом альгінату є *A. vinelandii* ATCC 9046.

2.2. Первинний розрахунок складу середовища для культивування

Тривалість культивування 65 год, концентрація альгіну в культуральній рідині становить 3,3 г/л, а концентрація біомаси – 6,7 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу альгінату. Як джерело вуглецю для одержання альгінату використовуються сахароза. Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 3,3 г альгінату. Молекулярна маса альгінату становить 327. Отже, у 327 г альгінату ($C_{16}H_{19}N_3O_5$) міститься 192 г Карбону, а в 3,3 г рибофлавінуальгінату $(3,3 \times 192) / 327 = 1,94$ г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах сахарози міститься 1,94 г Карбону. Молекулярна маса сахарози ($C_{12}H_{22}O_{11}$) – 342. У 342 г сахарози міститься 144 г Карбону, а 1,94 г Карбону міститься у $(1,94 \times 342) / 144 = 4,6$ г сахарози. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на сахарозі близько 40% субстрату окислюється до CO_2 для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст сахарози у середовищі становитиме $(4,6 \times 0,4) + 4,6 = 6,44$ г/л.

Потреби для синтезу біомаси.

Кількість сахарози необхідної для синтезу біомаси = $20,00 - 6,44 = 13,56$ г. Оскільки під час вирощування продуценту на сахарозі близько 40 % субстрату використовується на «холосте окиснення» для одержання енергії, тому щоб синтезувати необхідну кількість біомаси у середовище необхідно внести $x \cdot 0,4 + x = 13,56$; $x = 9,6$ г сахарози. У такій кількості сахарози міститься $9,6 \cdot 144 / 342 = 4,04$ г Карбону. У біомасі міститься 50 % Вуглецю, тому 4,04 г такого елемента міститься у $4,04 \cdot 2 = 8,08$ г біомаси.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення.

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 6,7 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 0,67 г.

Продуцент альгінату може асимілювати як джерело азотного живлення органічний Нітроген. Такий тип азоту містить 43 % білків, а до складу таких білків входить близько 16 % Нітрогену.

Для одержання альгінату в промислових умовах використовується середовище, яке містить як джерело органічного Нітрогену сульфат амонію. Оскільки у 100 г білка міститься 16 г азоту, тоді 0,67 г Нітрогену у $(100 \cdot 0,67) / 16 = 4,18$ г білку. В перерахунку на сульфат амонію отримуємо 9,72 г/л.

Потреби для синтезу альгінату. Оскільки Нітроген входить до складу не тільки біомаси, а й альгінату, то потрібно розрахувати вміст сульфату амонію у середовищі, необхідного для одержання 3,3 г/л альгінату.

Молекулярна маса альгінату ($C_{16}H_{19}N_3O_5$) становить 327. У 327 г альгінату міститься 42 г Нітрогену, тоді у 3,3 г альгінату міститься 0,42 г Нітрогену. Далі розрахуємо, в якій кількості сульфату амонію (в якому міститься 43 % білків, а до складу таких білків входить близько 16 % Нітрогену) міститься ця кількість Нітрогену.

У 100 г білку міститься 16 г азоту, тоді 0,42 г Нітрогену міститься у $(0,42 \times 100) / 16 = 2,62$ г білку, що у перерахунку на сульфат амонію складає 6,56 г.

Отже сумарно поживне середовище для росту продуцента і біосинтезу альгінату має містити $9,72 + 6,56 = 16,28$ г сульфату амонію.

Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі

Для одержання альгінату в промислових умовах використовується середовище, яке містить як джерело мінерального Фосфору гідроортофосфат калію – K_2HPO_4 та дигідроортофосфат калію KH_2PO_4 , які вносяться у середовище у концентрації 0,2 та 0,2 г/л.

Вміст Фосфору у K_2HPO_4 становить $(31/174) \cdot 100 = 17,8$ %, а у KH_2PO_4 – $(31/136) \cdot 100 = 22,8$ %. Отже, у KH_2PO_4 міститься у $22,8/17,8 = 1,28$ рази більше Фосфору, ніж у K_2HPO_4 .

Прийmemo вміст Фосфору (P) у K_2HPO_4 за 1 (одиницю), тоді вміст P у KH_2PO_4 буде 1,28. Отже, можемо записати $2,28 \times x = 2,84$, звідки $x \approx 1,25$.

Таким чином, вміст P у вигляді K_2HPO_4 становить 1,25 г/л, а у вигляді KH_2PO_4 – $1,25 \times 1,28 \approx 1,59$ г/л. Відповідно, концентрація цих солей у середовищі становить $(174 \times 1,25) / 31 = 7,01$ г/л та $(136 \times 1,59) / 31 = 6,97$ г/л.

Отже, середовище для культивування продуцента альгінату містить 7,01 г/л K_2HPO_4 та 6,97 г/л KH_2PO_4 .

Інші компоненти середовища

Джерелами таких необхідних для росту бактерій елементів, як Кальцій, Хлор, Магній, Натрій, Сульфур і Молібден є солі хлориду натрію ($NaCl$), молібдату натрію ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$), сульфату магнію ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) і кальцію ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$), яка не можуть лімітувати ріст продуцента альгінату (як і інших мікроорганізмів), оскільки зазвичай вноситься у середовище у надлишку.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного

2.3.1 Морфолого-культуральні ознаки

Azotobacter vinelandii ATCC 9046 – грамнегативні бактерії, що утворюють витягнуті клітини овальної форми розмірами 2x5 мкм (рис. 3.1). Джгутиків не утворюють, до руху ковзанням не здатні [14, 15, 16].

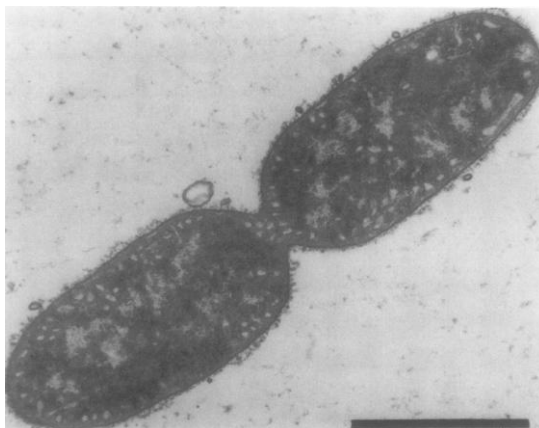


Рис. 2.1. Клітини *Azotobacter vinelandii* перед закінченням поділу [14]

Клітини *A. vinelandii* не здатні до утворення спор, проте у процесі своєї життєдіяльності можуть утворювати цисти у відповідь на несприятливі умови навколишнього середовища [14, 15].

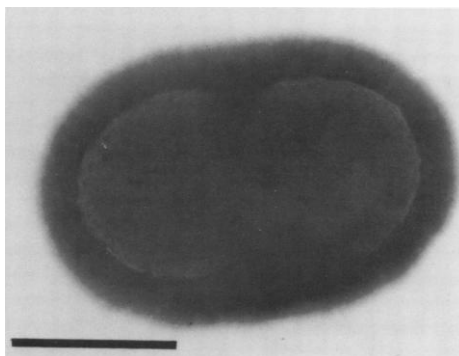


Рис. 2.2. Формування цисти клітиною *A. vinelandii* [14]

На щільних поживних середовищах утворюють плоскі колонії білого кольору з більш прозорими краями, зазвичай глянцевої. Псевдоміцелію не утворює [14, 15, 17].

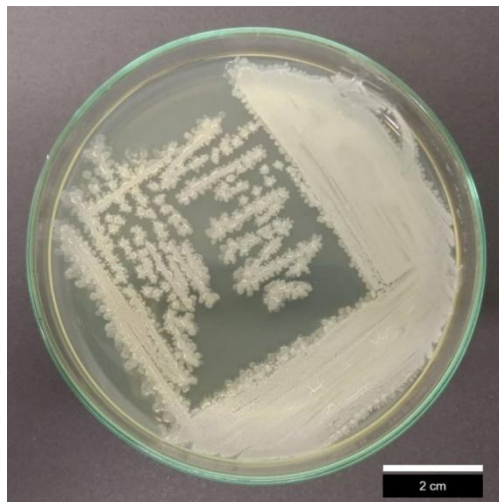


Рис. 2.3. Колонії *A. vinelandii* на щільному поживному середовищі [17]

2.3.2 Фізіолого-біохімічні ознаки

Бактерії *A. vinelandii* – це облигатні аероби, хемоорганотрофи, діазотрофи – здатні до фіксації атмосферного азоту. Мезофіли, здатні рости у температурному діапазоні від 20 до 34С з оптимумом при 30 С. Нейтралофіл, здатен розвиватися в діапазоні рН 7,0-8,5, при цьому оптимальне рН для росту – 8,0 [14, 15, 19].

Здатен до росту на манітолі, рамнозі та інших карбогідратах, асимілює глюкозу, сахарозу, фруктозу. Може також використовувати у якості джерела вуглецю різні органічні кислоти та спирти, наприклад гліцерин. Як джерело азоту також здатен використовувати сульфат амонію. У якості запасної речовини акумулює полі-β-гідроксимасяну кислоту [14, 18].

Мікроорганізм здатен синтезувати фітогормони та вітаміни, а також флуоресцентний пігмент півердин, котрий може зумовлювати світіння на краях колоній при рості на щільних поживних середовищах. Бактерії також здатні до утворення практично корисного екзополісахариду альгінату [14, 15, 19, 20, 21].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Філогенетичну класифікацію для *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 наведено відповідно до другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [21].

Домен – *Bacteria*

Царство – *Bacteria*

Відділ – *Pseudomonadota*

Клас – *Gammaproteobacteria*

Порядок – *Pseudomonadales*

Родина – *Pseudomonadaceae*

Рід – *Azotobacter*

Вид – *Azotobacter vinelandii*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у альгінаті у фармацевтичній промисловості

Альгінати — лінійні полісахариди, що складаються з (1–4)- маннууронової кислоти (M) та її C-5 епімер α -l-гулууронової кислоти (G). Ці полісахариди утворюються морськими водоростями і бактеріями *Azotobacter vinelandii* і *Pseudomonas spp.* Виробництво бактеріального альгінату можна легко пристосувати для отримання молекул з різними характеристиками та складом, головним чином з точки зору молекулярної маси та розподілу M/G. З цієї причини бактеріальні альгінати становлять потенційний комерційний інтерес для використання в різних промислових цілях [1, 3].

Розподіл мономерів у альгінатних полісахаридних ланцюгах може складатися з послідовних M (M-блоки), послідовних G (G-блоки) або субодиниць, що чергуються (MG-блоки). Альгінати можуть бути ацетильовані, відносна величина співвідношення M/G та їх ацетилювання змінюється залежно від виду бактерій та умов росту. Добре відомо, що склад альгінату, включаючи співвідношення M/G, ступінь ацетилювання та молекулярну масу (MW), визначає їх реологічні властивості. На відміну від альгінатів з морських водоростей (ацетилювання=0), бактеріальні альгінати мають високий ступінь ацетилювання, тоді як співвідношення M/G у альгінатах із *Pseudomonas spp.* трохи вище ніж у *A. vinelandii*. Ацетильні групи впливають на в'язкість і гнучкість альгінату.

Гелеутворюючі властивості альгінату пов'язані з його G-субодиницями, які взаємодіють з двовалентними іонами, такими як найбільш часто використовуваний кальцій (Ca^{2+}), що дозволяє утворювати матриці для гелів, плівок, мікрочастинок та ін. Альгінати, які містять G-блоки, такі як ті, що виробляються *A. vinelandii*, створюють міцніші гелі у присутності Ca^{2+} і мають більш високу в'язкість, тоді як ті, у яких відсутні G-блоки, утворюють гнучкі гелі в присут

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУН- ТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Дядюк Є. І.					22	109 22
Консульт.						Кафедра БТМ		
Керівник		Буценко Л.М.						
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

ності Ca^{2+} і мають меншу в'язкість, наприклад ті, що утворюються *Pseudomonas spp.* Однак міцність гелю визначається не тільки співвідношенням M/G, а й наявністю частотних субодиниць G [1, 3].

Альгінат зарекомендував себе як чудовий біорозкладаний, відновлюваний і біосумісний матеріал з неімуногенністю та легкою здатністю до гелеутворення. Альгінат є схваленим FDA США продуктом, який зараз використовується в кількох медичних цілях, таких як загусники, стабілізатори для зубних відбиткових матеріалів і лікування ран у формі гелю. В даний час альгінат має величезну кількість промислових застосувань у широкому спектрі галузей, таких як біотехнологія, біоінженерія, біомедицина і клінічне застосування, фармацевтична промисловість, хімічна, текстильна, пакувальна та будівельна промисловість, продукти харчування напої, аквакультура, стоматологія, косметологія, папір промисловість, а також індустрія дозвілля [3].

Характеристики альгінатів дозволяють використовувати їх як біоматеріал в біомедичній галузі та тканинній інженерії. Залежно від співвідношення M/G і MW бактеріальні альгінати мають властивості матеріалу, привабливі для медичних застосувань. Молекулярна маса альгінату дуже важлива для утворення гідрогелю для доставки ліків, білків або ферментів. В якості каркасного матеріалу для доставки ліків рекомендуються обирати альгінати з високою молекулярною масою, оскільки використовуваний полімер піддається впливу різних значень рН, що впливає на механічні властивості.

Нещодавно було показано, що альгінат із високим показником очищення, з *A. vinelandii*, може бути перероблений у волокна з підвищеною гелеутворювальною здатністю порівняно з волокнами, виготовленими з альгінатів, що синтезуються водоростями. У цьому сенсі ступінь ацетилювання альгінату та збільшення утворення гелю альгінату, отриманого з *A. vinelandii*, можуть бути відповідними для приготування пов'язок для ран [1, 3].

Композиційні гідрогелі желатину та альгінату натрію добре показали себе у експериментах із загоюванням ран *in vitro*. Є повідомлення про ефективність

альгінату у регенерації стовбурових клітин [3]. Композит із скляних наночастинок і альгінату виявився корисним для регенерації кісток [3].

Композити на основі альгінатів також можуть бути використані для конструювання порожнистих мікрокапсульованих носіїв ліків методом пошарового нанесення [22]. У роботі описано [22] поліелектролітну мікрокапсулу, багат шарову капсулу з хітозан-альгінату бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Дослідники інкапсулювали адриаміцин в гелеві капсули бичачого сироваткового альбуміну і провели протипухлинні експерименти *in vitro* з лінією клітин раку молочної залози людини, стійкою до адриаміцину MCF-7/ADR. Результати показують, що завантажені адриаміцином гелеві капсули БСА є більш смертельними для клітин MCF-7/ADR, ніж вільний адриаміцин.

Було клінічно повідомлено, що альгінат натрію в дозі 60 мг/день знижує артеріальний тиск і усуває гіпертензію після 2 тижнів лікування. Інше дослідження показало, що властивості альгінату запобігають пошкодженню нирок на ранніх стадіях шляхом зниження швидкості клубочкової фільтрації. Крім того, калій на основі альгінату перевірено як перспективний засіб для пом'якшення серцево-судинних ускладнень, пов'язаних з гіпертензією, включаючи гіпертрофію серця та нирок у ризику виникнення інсульту [23].

У Китаї проводилися клінічні дослідження як препарату проти СНІДу, де досліджувалися похідні альгінату гепариноїду для лікування ВІЛ. Вони використовували сульфатовані збагачені маннуранові та гулуранові гетерогенні альгінатні фрагменти, об'єднані з гепариноїдними полісахаридами, препарат 911, який складається з 10 кДа до 1,5 сульфатів і 1,0 карбоксильних груп на залишок цукру. Було встановлено, що гепариноїд 911 взаємодіє з позитивно зарядженими ділянками глікопротеїнів, присутніх на поверхні клітини, що призводить до екрануючого ефекту на ці ділянки, таким чином протидіючи зв'язуванню ВІЛ-вірусу з поверхнею клітини. Було встановлено, що дія 911 пов'язана з пригніченням зворотної транскриптази вірусу та запобіганням адсорбції вірусу. Повідомлялося про значний інгібуючий ефект на ДНК-полімеразу

вірусу гепатиту В, що означає, що його можна застосовувати для лікування гепатиту В [23, 24].

Зважаючи на вище вказану інформацію, не дивно, що обсяг світового ринку альгінатів у 2022 році становив 854,98 мільйонів доларів США, а до 2032 року він, за прогнозами, сягне приблизно 1464,15 мільйонів доларів США, збільшуючись на 5,53% з 2023 до 2032 року [25].

Найбільш відомим лікарським засобом із альгінату натрієвої солі та антацидів є Гавіскон, виробництва англійської компанії Reckitt Benckiser Healthcare (UK) Limited, що призначений для симптоматичного лікування диспепсії, пов'язаної з підвищеною кислотністю шлункового соку та гастроєзофагеальним рефлюксом (печія, кисла відрижка), відчуття тяжкості у шлунку після прийому їжі [26].

На ринку ліків України, згідно із інформацією з державного реєстру лікарських засобів [27], альгінат представлений у вигляді лікарських засобів у формі таблеток чи суспензій для лікування симптомів гастроєзофагеальної рефлюксної хвороби (печії; відрижки кислим; розладів травлення, пов'язаних з рефлюксом), українського та закордонного виробництва. Концентрація альгінату в ЛЗ коливається від 250 мг до 500 мг альгінату натрію на одну таблетку або 5-10 мл розчину.

Дорослим та дітям віком від 12 років препарат призначати перорально по 2–4 таблетки після їжі та перед сном (до 4 разів на добу). Таблетки необхідно розжовувати. Не слід застосовувати препарат більше 7 днів [27].

За статистикою в Україні гастрит відзначають у 30–50% населення і з віком дедалі частіше [28]. Станом на 1 січня 2024 року населення України становить близько 27 млн осіб [29]. В Україні на початок 2024 року проживало 7 348 531 дітей віком від народження до 18 років [30].

Прийmemo, що кількість пацієнтів із гастритом, що проявляється печією принаймні один раз на рік становить в середньому 40 %, тоді кількість пацієнтів становить $(27\,000\,000 - 7\,348\,531) \times 0,4 = 7\,860\,587$. Для розрахунку прийmemo, що пацієнту на добу потрібно в середньому 3 таблетки 4 рази на добу.

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в альгінаті

Доза альгінату, мг	Об'єм прийому препарату на добу, табл	Тривалість прийому, діб	Об'єм альгінату на курс, г	Кількість хворих на 2024 р, осіб	Загальна кількість альгінату на всіх хворих, кг
1	2	3	4	5	6
250	12	7	21	7 860 587	165 072

Отже, згідно з даними в таблиці 3.1, потреба в альгінаті для виготовлення препаратів для лікування печії становить 165 072 кг

3.2. Обрахунок загальної потужності виробництва альгінату

Згідно з Державним реєстром лікарських засобів [27], в Україні зареєстровано 9 ЛЗ закордонного і вітчизняного виробництва, для лікування печії із альгінатом натрію у складі. Враховуючи, цей факт, пропонуємо виробляти альгінат для задоволення 1 % від загальної потреби, оскільки на ринку існує суттєва конкуренція:

$$165\,072 \text{ кг} \times 0,01 = 1650,7 \text{ кг}$$

Розрахувавши потребу у альгінаті на рік, слід визначити, скільки культуральної рідини потрібно отримати під час культивування штаму *Azotobacter vinelandii* АТСС 9046, який синтезує 3,3 г/л альгінату протягом 65 год [1]. Отже, об'єм культуральної рідини становитиме:

$$\frac{1650,7 \times 1000}{3,3} = 500\,218 \text{ л}$$

Далі враховуємо загальні втрати під час етапів виділення альгінату із культуральної рідини які складають 20 %:

$$500\,218 \text{ л} / (1 - 0,2) = 625\,272 \text{ л}$$

3.3. Розрахунок загальної кількості циклів проєктованого виробництва альгінату та об'єму виробничого ферментера

Далі розрахуємо, який об'єм культуральної рідини можна отримати за цикл біосинтезу. Згідно із цими даними розрахуємо кількість необхідних етапів

підготовки посівного матеріалу. Прийmemo, що кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) = 355, тоді кількість культуральної рідини на добу (V_d) становитиме:

$$V_d = C / T_{рд} = 625\,272 / 355 = 1761 \text{ л}$$

Об'єм культуральної рідини за цикл ($V_{пц}$) буде становити:

$$V_{пц} = \frac{K_1 * V_d * T_{цф}}{24} = \frac{1,1 * 1761 * 73}{24} = 5892 \text{ л/цикл}$$

де $T_{цф}$ – загальний цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (65 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год).

K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій $K_1 = 1,1 - 1,5$.

Розрахований об'єм культуральної рідини (5892,0 л) можна одержати у ферментері, геометричний об'єм якого складатиме:

$$V_{г} = \frac{V_{пц}}{K_{зап}} = \frac{5892,0}{0,6} = 9820,0 \text{ л}$$

Найближчим за об'ємом є стандартний ферментер на 10,0 м³. Уточнюємо коефіцієнт заповнення для обраного ферментера:

$K_{зап} = V_{г} / V_{ф} = 5892,0 / 10\,000 = 0,59 \sim 0,6$. Розраховане число не перевищує заданого значення, а отже, об'єм ферментера підібраний правильно.

3.4. Розрахунок кількості необхідних етапів для підготовки посівного матеріалу

Отже, за виробничий цикл можна одержати $V_{пц} = 5892$ л культуральної рідини. Також слід врахувати, що при одержанні культуральної рідини, можливими є її втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{ф}$), які складають 10%.

Отже, розрахуємо кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед процесом ферментації:

$$V_{роб1} = V_{пц} / (1 - E_{ф}) = 5892,0 / (1 - 0,1) = 6547 \text{ л}$$

Встановлена доза для посівного матеріалу складає від 5 до 10 % від об'єму поживного середовища. Приймаємо такий показник $X_{пм1} = 10\%$. Тому, із

врахуванням дози посівного матеріалу $X_{\text{пм1}}$ робочий об'єм ферментера $V_{\text{роб1}}$ складе:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{пс1}} + V_{\text{пс1}} \cdot X_{\text{пм1}}$$

Звідси, об'єм поживного середовища $V_{\text{пс1}}$ буде:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 6547 / (1 + 0,1) = 5952,0 \text{ л,}$$

тоді об'єм посівного матеріалу $V_{\text{пм1}}$ складе

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 6547 - 5952 = 595 \text{ л}$$

Враховуючи втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря в розмірі 10 – 15%, об'єм посівного матеріалу та поживного середовища у посівному апараті буде таким:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 595 / (1 - 0,13) = 684 \text{ л.}$$

Оскільки попередньо було обрано дозу посівного матеріалу у розмірі 10%, то у посівному апараті об'єм поживного середовища становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 684 / (1 + 0,1) = 622 \text{ л,}$$

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

Далі слід розрахувати об'єм посівного матеріалу для посівного апарату, який становить $V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 684 - 622 = 62 \text{ л.}$

Інокулят об'ємом $V_{\text{роб.2}} = 684 \text{ л}$ можна отримати протягом вирощування штаму у посівному апараті з геометричним об'ємом $V_{\text{ін2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 684 / 0,6 = 1140 \text{ л.}$ Для цього обираємо найближчий за розміром стандартний посівний апарат $V_{\text{сна}} = 1,25 \text{ м}^3$. Перерахований коефіцієнт заповнення складатиме:

$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сін}} = 684 / 1250 = 0,55$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів (0,55-0,65)

Посівний матеріал об'ємом 62 л можна отримати шляхом вирощування в інокуляторі із врахуванням подальших втрат у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10 – 15%).

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

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 62 / (1 - 0,1) = 68,8 \text{ л.}$$

Додавання посівного матеріалу у кількості 10% від об'єму поживного середовища є стандартною практикою для забезпечення належного засіву. Тоді об'єм поживного середовища, для вирощування бактерій в інокуляторі буде складати:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 68,8 / (1 + 0,1) = 62,62 \text{ л,}$$

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

Об'єм посівного матеріалу для інокулятора становить $V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 68,8 - 62,62 = 6,18 \text{ л.}$

Відповідну кількість посівного матеріалу $V_{\text{роб.3}} = 68,8 \text{ л}$ можна отримати під час культивування бактеріального штаму в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{\text{ін3}} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап}} = 68,8 / 0,6 = 114,6 \text{ л.}$ Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}} = 120 \text{ л}$ та уточнюємо попередньо встановлений коефіцієнт заповнення.

$K_{\text{зап3}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сін}} = 68,8 / 120 = 0,57.$ Одержане значення перебуває у межах, прийнятих для ферментерів межах для аеробних процесів (0,55-0,65).

Розрахований об'єм інокуляту (6,18 л) можна отримати шляхом вирощування штаму в інокуляторі із врахуванням подальших втрат у результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря (10 – 15%).

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме: $V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 6,18 / (1 - 0,2) = 7,72 \text{ л.}$

Додавання посівного матеріалу у кількості 10% від об'єму поживного середовища є стандартною практикою для забезпечення належного засіву. Тоді об'єм поживного середовища, для вирощування дріжджів в інокуляторі буде складати:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 7,72 / (1 + 0,1) = 7,01 \text{ л,}$$

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

Об'єм посівного матеріалу для інокулятора тоді складає $V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 7,72 - 7,01 = 0,71 \text{ л.}$

Такий об'єм посівного матеріалу $V_{\text{роб.4}} = 7,72 \text{ л}$ можна отримати під час культивування штаму в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{\text{ін4}} = V_{\text{роб.4}} / K_{\text{зап}} =$

$7,72 / 0,6 = 12,86$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}} = 15,0$ л та уточнюємо попередньо обраний коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зап4}} = V_{\text{роб.4}} / V_{\text{сін}} = 7,72 / 15,0 = 0,52.$$

Посівний матеріал об'ємом $V_{\text{пм4}} = 0,71$ л можна одержати культивуванням штаму у колбах на качалці. Для цього застосовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 710 / (750 \cdot 0,2) = 4,7, \text{ отже, } 5 \text{ колб.}$$

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідно 5 качалочних колби.

Можна зробити висновок, що процес одержання посівного матеріалу для проведення виробничого біосинтезу альгінату у ферментері об'ємом $10,0 \text{ м}^3$ за коефіцієнту заповнення 0,6 буде проходити у 4 етапи. Узагальнена інформація щодо кількості стадій виробництва альгінату наведена у табл. 3.2.

Отже, за результатами наведених розрахунків, можна зробити висновок, що для біосинтезу альгінату *A. vinelandii* ATCC 9046 потрібно встановити один ферментер об'ємом $10,0 \text{ м}^3$, один посівний апарат об'ємом $1,25 \text{ м}^3$, один інокулятор об'ємом 120 л та один інокулятор об'ємом 15 л.

Таблиця 3.2

Кількість стадій та апаратів, необхідна підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу альгінату

№ стадії	Геометричний об'єм обраного апарату, $V_{\text{г}}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$, частка	Робочий об'єм апарата, $V_{\text{роб}}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$, л
1	2	3	4	5	6
1	10000	0,6	6547	5952	595
2	1250	0,55	684	622	62
3	120	0,57	68,8	62,62	6,18
4	15	0,5	7,72	7,01	0,71
5	0,75×5 колб	0,2	–	0,71	0,71

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Azotobacter vinelandii - як джерело вуглецю використовує глюкозу. Катаболізм глюкози здійснюється за шляхом гліколізу. Ключовим ферментом гліколізу є 1,6-фосфофруктокіназа.

Глюкоза за участю глюкокінази (КФ 2.7.1.2) перетворюється на глюкозу 6-фосфат, де остання за дії глюкозо-6-фосфат ізомераз (КФ 5.3.1.9) перетворюється на фруктозу 6-фосфат; 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11) активує перетворення фруктози 6-фосфат у фруктозо-1,6-дифосфат. Дія фруктозодифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на фруктозо-1,6-дифосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід 3-фосфат та діоксіацетонфосфат, який під дією тріозофосфатізомераз (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід 3-фосфат.

До подальшого катаболізму глюкози залучається гліцеральдегід 3-фосфат, під дією гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) він перетворюється на 1,3 –дифосогліцерат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у 3-фосфогліцерат. Дія 2,3-бісфосфогліцерат-незалежної фосфогліцерат-мутази (КФ 5.4.2.12) на 3-фосфогліцерат індукує його перетворення на 2-фосфогліцерат. Далі під дією енолази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфогліцерат перетворюється у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40) або дикінази води (КФ.2.7.9.2) [31].

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Дядюк Є. І.				РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							31	109
Керівник	Буценко Л.М.					31		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

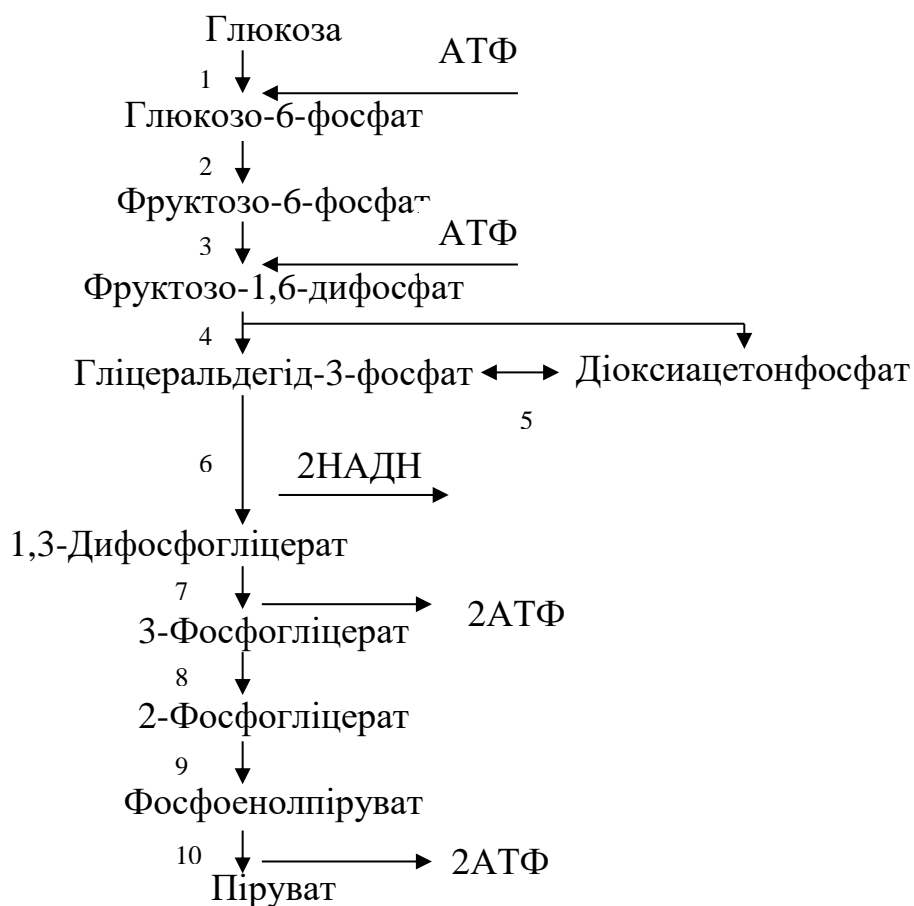


Рис. 4.1. Шлях катаболізму глюкози в *Lactobacillus plantarum* AS-14

Ферменти:

- 1 – глюкокіназа (КФ 2.7.1.2)
- 2 - глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9);
- 3 -6- фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11);
- 4 - фруктозодифосфатальдоза (КФ.4.1.2.13);
- 5 - триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1);
- 6 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12);
- 7 - фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3);
- 8 - 2,3-бісфосфогліцерат-незалежна фосфогліцерат-мутаза (КФ.5.4.2.12);
- 9 - енолаза (КФ.4.2.1.11);
- 10 - піруваткіназа (КФ.2.7.1.40) або дикіназа води (КФ.2.7.9.2)

4.2 Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *Azotobacter vinelandii* з використанням глюкози як джерела вуглецю, внаслідок гліколізу (рис. 1), утворюється піруват. Далі піруват залучається до ЦТК через ацетил-КоА.

Для біосинтезу альгінату *Azotobacter vinelandii* необхідно навести схему біосинтезу амінокислот, нуклеотидів, полісахаридів (полісахаридні ланцюги (N-ацетилглюкозаміну та N-ацетил-муреїнової кислоти) для утворення пептдоглікану), ліпідів (фосфотидилетаноламіну).

Для поповнення втрат в ЦТК функціонують **анаплеротичні реакції**:

- карбоксилювання фосфоенолпірувату з утворенням оксалоацетату під дією фосфоенолпіруваткарбоксилази (КФ 4.1.1.32);
- карбоксилювання пірувату з утворення оксалоацетату під дією піруваткарбоксилази (КФ 6.4.1.1);
- карбоксилювання пірувату з утворенням малату під дією малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37).
- карбоксилювання оксалоацетату з утворенням 2-оксоглутарату під дією цитрат синтетази (КФ 2.3.3.1), аконітат гідратази (КФ 4.2.1.3), ізоцитрат-дегідрогенази (КФ 1.1.1.42)

Синтез амінокислот

Глюкозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу. За участю ферментів глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9), глюкозо-6-фосфат 1-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.49, КФ 1.1.1.363), 6-фосфоглюконолактоназа (КФ 3.1.1.31), 6-фосфоглюконатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.44, КФ 1.1.1.343) перетворюється на рибулозо-5-фосфат, який далі за участю рибулозо-фосфатна 3-епімерази (КФ 5.1.3.1) перетворюється на ксилулозо-5-фосфат. Також з рибулозо-5-фосфату за допомогою рибоза-5-фосфат-ізомерази А (КФ 5.3.1.6) та рибоза-фосфат-дифосфокінази (КФ 2.7.6.1) отримуємо фосфорибозилпірофосфат [32].

3 фосфорибозилпірофосфату за допомогою фосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.17); КФ 3.6.1.31 і КФ 3.5.4.19 (фосфорибозил-АТФ пірофосфогідро-

лаза / фосфорибозил-АМФ циклогідролаза /гістидинолдегідрогеназа), фосфорибозилформаміно-5-аміноімідазол карбоксамід-риботиду (КФ 5.3.1.16), циклази (КФ 4.3.2.10), імідазолегліцерол-фосфатдегідратази (КФ 4.2.1.19), гістидинол-фосфатої амінотрансферази (КФ 2.6.1.9), гістидинолфосфатази (КФ 3.1.3.15); КФ 1.1.1.23 (фосфорибозил-АТФ пірофосфогідролаза /фосфорибозил-АМФ циклогідролаза / гістидинолдегідрогеназа) утворюється *гістидин* [33].

З 3-фосфогліцерату за участю ферментів: фосфогліцератдегідрогеназа (КФ 1.1.1.95), фосфосерин трансміназа (КФ 2.6.1.52), фосфосеринфосфатаза (КФ 3.1.3.3) утворюється *серин*, який далі за допомогою серинальдолази (КФ 2.1.2.1) та цистеїн-синтази (КФ 2.5.1.47) перетворюється в *гліцин* і *цистеїн* відповідно [34, 35].

Піруват пертворюється в ацетил-КоА (піруватдегідрогеназа - КФ 1.2.4.1, дигідроліпоамід ацетилтрансфераза - КФ 2.3.1.12, дигідроліпоаміддегідрогеназа - КФ 1.8.1.4). Ацетил-КоА через цитрат оксалоацетат ліазу (КФ 2.3.3.1) залучається до циклу три карбонових кислот (ЦТК).

В ЦТК, цитрат утворений з ацетил-КоА, за допомогою цис-аконітази (КФ 4.2.1.3) перетворюється в ізоцитрат, який далі за участю ферменту ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.42) перетворюється в 2-оксоглутарат. Останній за допомогою альфа-кетоглутаратдекарбоксилази (КФ 1.2.4.2, КФ 2.3.1.61) та дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4) перетворюється в сукциніл-КоА, який під дією ферменту сукциніл-КоА синтетази (КФ 6.2.1.5) перетворюється в сукцинат. Дія сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.5.1) індукує утворення фумарату, який далі під дією фумаратгідратази (КФ 4.2.1.2) перетворюється в малат. Малат за участю малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37/КФ 1.1.5.4) перетворюється в оксалоацетат [36].

З оксалоацетату утворюється *аспартат* за допомогою аспартат-трансамінази (КФ 2.6.1.1), який далі під дією аспаргінової синтетази (КФ 6.3.5.4/КФ 6.3.1.1) перетворюється в *аспарагін*. З аспартату за участю ферментів: аспартаткіназа (КФ 2.7.2.4), аспартат-семіальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.11), гомосериндегідрогенази (КФ 1.1.1.3), гомосерин кінази (КФ 2.7.1.39),

треонін синтетази (КФ 4.2.3.1) утворюється **треонін**. Також з аспартату за допомогою аспартаткінази (КФ 2.7.2.4), аспартат-семіальдегіддегідрогенази (КФ 1.2.1.11), гомосериндегідрогенази (КФ 1.1.1.3), гомосерин О-ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.46), цистатіонін-гамма-синтази (КФ 2.5.1.48), цистатіонін бета-ліаза (КФ 4.4.1.13), 5-метилтетрагідрофолат – гомоцистеїнметилтрансфераза (КФ 2.1.1.13), гомоцистеїн метилази (КФ 2.1.1.14) та гомоцистеїн S-метилтрансферази (КФ 2.1.1.10) утворюється **метіонін** [34, 35, 37].

З треоніну утворюється **ізолейцин** за допомогою ферментів: треоніндегідратази (КФ 4.3.1.19), ацетолактатсинтази (КФ 2.2.1.6), кетол-кислотна редуктоїзомерази (КФ 1.1.1.86), дигідроксикислотної дегідратази (КФ 4.2.1.9), амінокислота з розгалуженою ланцюгом амінотрансферази (КФ 2.6.1.42) [38].

З аспартату утворюється **лізин** за допомогою ферментів: аспартаткіназа (КФ 2.7.2.4), аспартат-семіальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.11), дигідродипіколінат синтази (КФ 4.3.3.7), дигідродипіколінат редуктази (КФ 1.17.1.8), тетрагідродипіколінат сукцинілази (КФ 2.3.1.117), N-ацетилорнітинінамінотрансфераза (КФ 2.6.1.17), сукцинілдіамінопімелатдесукцинілаза (КФ 3.5.1.18), діамінопімелат-епімераза (КФ 5.1.1.7), діамінопімелатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.20) [39].

З 2-оксоглутарату за участю ферментів: аспартат-трансамінази (КФ 2.6.1.1), аланін-трансамінази (КФ 2.6.1.2), N-ацетилглутамат синтетаза (КФ 2.3.1.1), ацетилглутаматкіназа (КФ 2.7.2.8), N-ацетилглутамілфосфатредуктаза (КФ 1.2.1.38), N-ацетилорнітинінамінотрансфераза (КФ 2.6.1.11), ацетилорнітиндеацетилаза (КФ 3.5.1.16), орнітин-карбамоїлтрансфераза (КФ 2.1.3.3), аргініносукцинатсинтетаза (КФ 6.3.4.5), аргініносукцинатна ліаза (КФ 4.3.2.1) утворюється **аргінін** [40].

З 2-оксоглутарату за допомогою омега-амідази (КФ 3.5.1.3) та глутаматсинтази (КФ 1.4.1.4) утворюється **глутамат**, який далі за допомогою глутамінсинтетази (КФ 6.3.1.2) пертворюється в **глутамін**. Також глутамат за допомогою L-глутамат гамаполуальдегіддегідрогенази (КФ 1.2.1.88) та піролін-5-карбоксилат редуктази (КФ 1.5.1.2) пертворюється в **пролін** [37].

З ксилулозо-5-фосфату, який утворився в пентозофосфатному циклі, утворюється еритрозо-4-фосфат, який взаємодіючи з ФЕП утворює С₇-сполуку за участю 3-дезоксигептулоноатсинтетази (КФ 2.5.1.54). Далі за допомогою 3-дегідрохінат синтетази (КФ 4.2.3.4) утворюється 3-дегідрохінат, який під дією ферментів: 3-дегідрохінат дегідратази (КФ 4.2.1.10) та шикімаатдегідрогенази (КФ 1.1.1.25) утворює шикімаат. За допомогою шикімаат-кінази (КФ 2.7.1.71), 3-фосфошикімаат-1-карбоксивінілтрансферази (КФ 2.5.1.19) та хоризмаат-синтази (КФ 4.2.3.5) шикімаат перетворюється в хоризмаат. Хоризмаат за участю гідросифенілпіруватсинтетази (КФ 5.4.99.5) перетворюється в префенат, який далі перетворюється в **L-фенілаланін** за допомогою префенатдегідратази (КФ 4.2.1.51) та тирозин амінотрансфераза (КФ 2.6.1.57). Також префенат за участю ферментів: префенатдегідрогенази (КФ 1.3.1.12) та ароматичної амінокислотної трансамінази (КФ 2.6.1.57) утворює **L-тирозин**. Антранілат утворюється з хоризмаату за допомогою антранілат-синтетази (КФ 4.1.3.27), з якого за участю ферментів: антранілат фосфобосилтрансферази (КФ 2.4.2.18), фосфорибосилантранілат-ізомерази (КФ 5.3.1.24), індол-3-гліцерин-фосфатної синтази (КФ 4.1.1.48) та триптофан-синтази (КФ 4.2.1.20) синтезується **L-триптофан** [41].

З пірувату за допомогою ацетолактатної синтетази (КФ 2.2.1.6), дигідроксизовалератдегідрогенази (КФ 1.1.1.86), ацетогідроксикислотна дегідрогенази (КФ 4.2.1.9) та трансамінази В (КФ 2.6.1.42) утворюється **валін**. Також з пірувату за участю ферментів КФ 2.2.1.6, КФ 1.1.1.86, КФ 4.2.1.9, 2-ізопропілмалат синтази (КФ 2.3.3.13), 3-ізопропілмалат дегідратази (КФ 4.2.1.33), 3-ізопропілмалат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.85), амінокислотна амінотрансфераза з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42) утворюється **лейцин**. З пірувату за допомогою аланінтрансамінази (КФ 2.6.1.2) утворюється **аланін** [37, 38].

Синтез нуклеотидів

Фосфорибозилпірофосфат, утворений в пентозофосфатному циклі, за допомогою ферментів: амідофосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.14), фосфорибозиламін - гліцинова лігаза (КФ 6.3.4.13), фосфорибозилгліцинамід формилтра-

нсфераза 2 (КФ 2.1.2.2), фосфорибозилформалглїцинамїд синтетаза (КФ 6.3.5.3), фосфорибозилформалглїцинамїд цикло-лїгаза (КФ 6.3.3.1), 5- (карбок-сиамїно) імїдазолу рибонуклеотидсинтаза (КФ 6.3.4.18), N (5) - карбоксамїноїмїдазол-рибонуклеотидна мутаза (КФ 5.4.99.18), фосфорибозиламїноїмїдамїдазол-сукцинокарбоксамїдсинтаза (КФ 6.3.2.6), аденилосукцинатна лїаза (КФ 4.3.2.2), ІМР циклогїдролаза (КФ 2.1.2.3, КФ 3.5.4.10), перетворюється на інозинмонофосфат (пуриновий нуклеотид).

Далї ІМР перетворюється на **АТФ** за участю ферментів: аденилосукцинатсинтетаза (КФ 6.3.4.4), аденилосукцинатна лїаза (КФ 4.3.2.2), аденилаткїназа (КФ 2.7.4.3), нуклеозиддифосфатна кїназа (КФ 2.7.4.6); та на **ГТФ** за участю ферментів: ІМР дегїдрогеназа (КФ 1.1.1.205), GMP-синтетаза (КФ 6.3.5.2), гуанїлаткїназа (КФ 2.7.4.8), нуклеозиддифосфатна кїназа (КФ 2.7.4.6) [42].

Аспартат та карбомаїлфосфат за участю фермента аспартаткарбомаїлтрансфераза (КФ 2.1.3.2) перетворюються на карбомаїласпартат, далї за допомогою дигїдрооротаза (КФ 3.5.2.3) та дигїдрооротатдегїдрогеназа (КФ 1.3.5.2) отримуємо оротат, який взаємодїючи з фосфорибозилпїрофосфатом утворює оротидинмонофосфат (пїримїдиновий нуклеотид) (оротат фосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.10)). Далї синтезується **УТФ** за участю ферментів оротидин-5'-фосфатдекарбоксілаза (КФ 4.1.1.23), уридилаткїназа (КФ 2.7.4.22), нуклеозиддифосфатна кїназа (КФ 2.7.4.6) та **ЦТФ**: СТР-синтетаза (КФ 6.3.4.2) [43].

Синтез полісахаридних ланцюгів (N-ацетилглюкозамїну та N-ацетилмуреїнової кислоти)

З фруктозо-6фосфату синтезується **N-ацетилглюкозамїн** за участю ферментів: L-глутамїн - D-фруктоза-6-фосфат аїноттрансфераза (КФ 2.6.1.16), мутаза фосфоглюкозамїну (КФ 5.4.2.10), глюкозамїн-1-фосфатна N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.157), бїфункціональна UDP-N-ацетилглюкозамїнпїрофосфорилаза (КФ 2.7.7.23) [44].

N-ацетилглюкозамїн далї перетворюється на **N-ацетилмуреїнову кислоту** за допомогою ферментів: UDP-N-ацетилглюкозамїн 1-

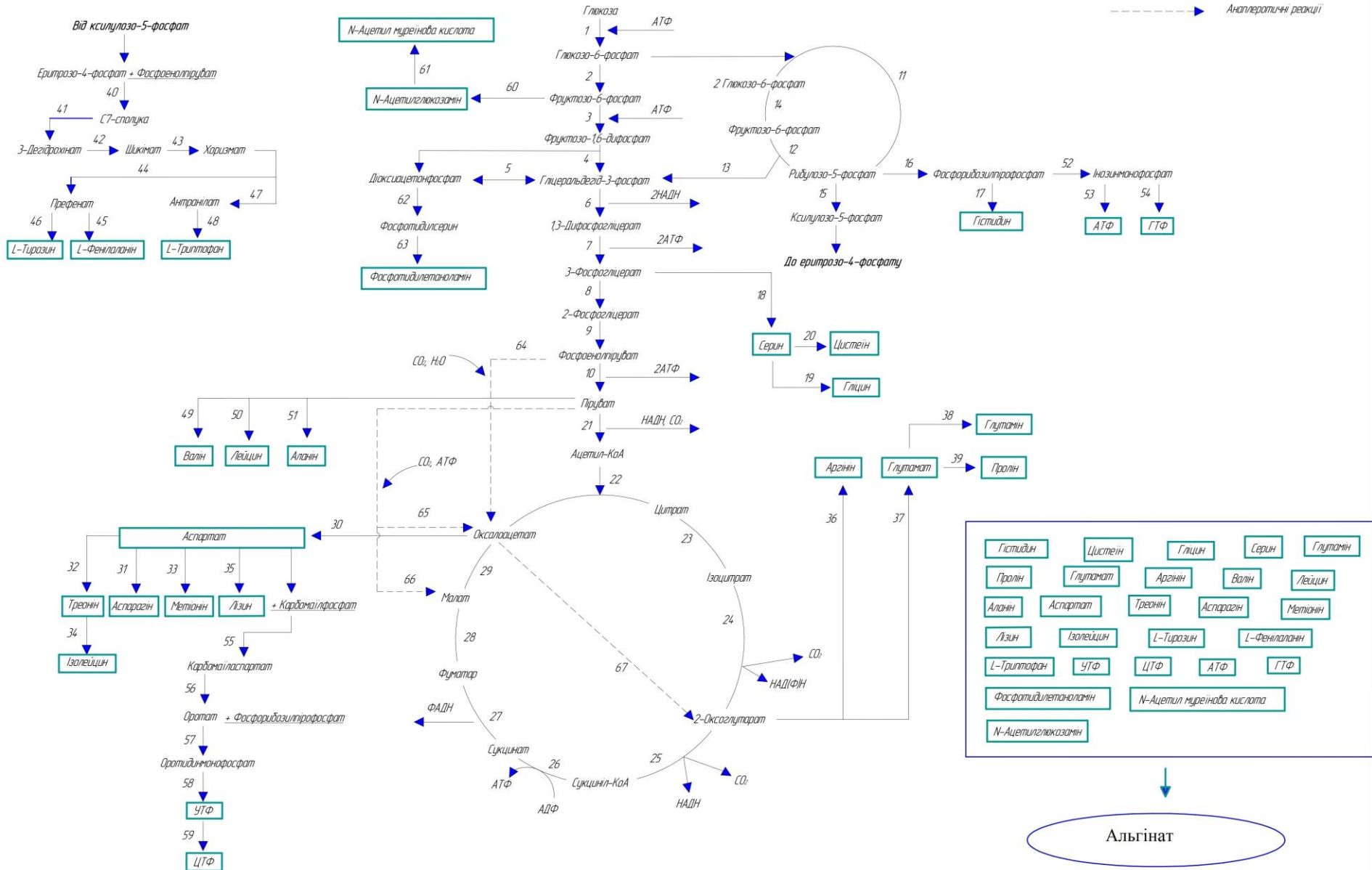
карбоксивінілтрансфераза (КФ 2.5.1.7), UDP-N-ацетиленолпірувоїлглюкозамінредуктаза (КФ 1.3.1.98) [45].

Синтез ліпідів

З діоксиацетонфосфату (гліколіз) синтезується фосфотидилсерин за участю ферментів: гліцерин-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.94), передбачуваний гліцерин-3-фосфат ацилтрансфераза (КФ 2.3.1.275), 1-ацилгліцерол-3-фосфатна О-ацилтрансфераза (КФ 2.3.1.51), CDP-дигліцеридсинтетаза (КФ 2.7.7.41), фосфатидилсеринсинтаза (КФ 2.7.8.8), який далі перетворюється на **фосфотидилетаноламін** за допомогою фосфатидилсериндекарбоксилазного профермента (КФ 4.1.1.65) [46].

Azotobacter vinelandii - продуцента альгінату

Умовні позначення:



РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Біосинтез у виробництві біотехнологічних продуктів є критичним етапом, де режими культивування, такі як рН, температура, інтенсивність перемішування та аерація, впливають на результат. Культивування *A. vinelandii* АТСС 9046 проводять з урахуванням фізіолого-біохімічних властивостей культури. Процес включає використання посівного апарату на середовищі Федорова з певними компонентами. Експерименти показали, що для отримання культуральної рідини з високою в'язкістю оптимальні умови включають вміст меляси, аерацію, температуру та тривалість культивування.

Збільшення вмісту меляси в середовищі, а також підвищення рівня аерації та тривалості культивування сприяє покращенню в'язкості культуральної рідини. Для культивування *A. vinelandii* АТСС 9046 в шейкерних колбах із метою отримання високої в'язкості культуральної рідини рекомендовано використовувати мелясу з концентрацією 60 г/л, аерацію на рівні 200 обертів на хвилину, температуру 25°C і тривалість культивування 114 годин.

З погляду на економічну вигоду при виробництві промислового в'язкого екзополісахариду (ЕПС), однією з проблем є тривалий час біосинтезу. Це особливо помітно при вирощуванні в колбах на гойдалках, де це пов'язано з характеристиками масообміну. Однак, це можна обійти, використовуючи ферментатор з примусовою аерацією та активним змішуванням середовища. У ферментаторі процес культивування відбувається за таких умов: 300 обертів на хвилину для змішування, 25–40% аерації, температура 25°C, рН 7,0, з загальною тривалістю 42 годин. Ці параметри є ідеальними, оскільки збільшення температури до 35°C та зниження аерації та переми

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ			
							40	
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Дядюк Є. І.				РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							40	109
Керівник	Буценко Л.М.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

шування негативно впливають на в'язкість [48, 49].

При виборі ферментера однією з основних вимог є наявність механізму змішування з можливістю регулювання швидкості обертання. Це важливо, оскільки під час ферментації необхідно поступово збільшувати швидкість обертання через зростання в'язкості культурної рідини. Для ефективного змішування рекомендується використовувати турбінну мішалку з магнітним приводом, яка забезпечує високу швидкість обертання та одночасне подрібнення твердих частинок.

Критично важливою є наявність датчика для контролю рівня розчиненого кисню, оскільки на ранніх етапах клітини *A. vinelandii* E 1 чутливі до високих концентрацій O_2 . Для уникнення пригнічення росту культури необхідно підтримувати концентрацію O_2 на рівні 25-40%.

Конструкція змішувача та аераційної системи ферментера має бути такою, щоб мінімізувати утворення піни під час аерації та перемішування культурної рідини. Це дозволяє ефективніше використовувати об'єм ферментера, завантажуючи його до 80% від загального об'єму. Крім того, така конструкція забезпечує стабільний рівень культурної рідини та асептичний захист, що є особливо важливим у періодичному режимі ферментації.

Беручи до уваги аналіз різних типів ферментерів, у цьому проекті пропонується використання комбінованого типу ферментера, оснащеного барботером та змішувачем [50].

5.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Клітини *Azotobacter vinelandii* – це облигатні аероби, тому для росту і біосинтезу альгінату потребують стабільно постійної подачі стерильного повітря. Оскільки атмосферне повітря містить у своєму складі часточки пилу та різноманітні мікроорганізми, то перед подачею таке повітря необхідно очистити за допомогою різних фільтрів, які разом із іншим обладнанням об'єднані у систему кондиціонування [48, 51]:

- На першому етапі здійснюється забір атмосферного повітря через повітрозбірник за допомогою турбокомпресору, на висоті 2-3 м від найвищої точки будівлі. Оскільки висота ферментера об'ємом 10,0 м³ – 8,7 м, а також висоту поверху – 11 м, косий дах будівлі ~1,5 м, забір повітря виконують на висоті ~ 15 м.
- Порції повітря потрапляють на фільтри грубої очистки, де видаляються грубі фракції пилу. Цей етап необхідний щоб захистити від механічних пошкоджень фільтри основної і тонкої очистки, а також інші вузли системи. Фільтри виготовляють із нітронового/ поліестерового волокна, що дає змогу забезпечити довговічність і пористість готових фільтрів.
- Турбокомпресор стискає повітря до 0,35—0,5 МПа, для забезпечення подолання опору фільтрувальних матеріалів.
- Калорифер нагріває стиснене повітря до 120–250°C, а потім охолоджує і за допомогою краплевловлювача видаляє зайву вологу, що утворилася під час нагрівання.
- Підготоване таким чином повітря потрапляє на головні фільтри, де відбувається основна фільтрація. Тканина фільтрів вироблена з скловолокна із порами діаметром 15 до 5 мкм. (ефективність видалення до 98% мікроорганізмів).

- Фінішна очистка перед потраплянням повітря у виробниче обладнання
Фільтрація здійснюється на фільтрах тонкої очистки HEPA (виготовлених із поліпропілену, із волокнами розміром 0,5-5 мкм і відстанню між ними близько 5-50 мкм.), ефективність яких складає 99,999%. Маленький розмір волокон та їхнє хаотичне розташування роблять такі фільтри найбільш ефективними. Фільтри HEPA відносяться до фільтрів абсолютного очищення та максимально корисні як останній етап очищення повітря у системі вентиляції.
- Очищене повітря крізь магістральні трубопроводи направляється у безпосередньо у виробниче обладнання (інокулятори/ферментери) [48, 51].

5.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

Завжди початковим етапом біотехнологічного виробництва є санітарно-гігієнічна підготовка всіх складових частин технологічного процесу, включаючи персонал, оскільки саме він є найбільш критичним фактором, який впливає на якість готового продукту. Важливо пам'ятати, що під час санітарно-гігієнічної підготовки основна увага персоналу зосереджена на виконанні процедур, що дозволяють уникнути або скоротити до мінімуму ризик забруднення продукту сторонніми мікроорганізмами та перехресної контамінації. Зазвичай це забезпечується суворим дотриманням рутинних процедур очистки обладнання і робочих поверхонь, а також шляхом дезінфекції. Мийний засіб - це речовини органічної та неорганічної природи чи комбінація таких речовин, що складається із мила та/або поверхнево-активних речовин, які призначені для очищення і прання. Дезінфекція – це комплекс процедур, що дозволяють знищувати потенційно патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми, їхні спори та токсини. Операції мийки / дезінфекції облад-

нання і поверхонь є послідовними та взаємодоповнючими і дозволяють забезпечити встановлено в конкретних умовах рівень чистоти на виробництві, для отримання стабільно прогнозованого результату.

Біосинтез альгінату реалізується за допомогою вирощування культури *Azotobacter vinelandii* і передбачає суворого дотримання встановлених умов чистоти і контролю за стерильністю культури, оскільки контамінація сторонньою мікрофлорою призведе до серйозних наслідків і збитків.

Оскільки робочі поверхні знаходяться у постійному контакті із хімічними речовинами, то після завершення технологічного процесу, залишкові кількості сировини або субстанцій можуть важко видалятися через конструктивні особливості обладнання і як наслідок стати як джерелом забруднення, так і стати субстратом для розвитку чужорідної мікрофлори. Тому мийні і дезінфікуючі засоби мають володіти наступними вимогами аби забезпечити максимально доступний рівень очищення і дезінфекції:

- Не мати корозійної активності проти оброблюваних поверхонь;
- ефективно знищувати різноманітні види мікроорганізмів;
- бути безпечними для продукту, не впливати на смак, колір і запах;
- Швидко і легко розчинятися у воді під час приготвування робочих розчинів;
- не мати токсичного ефекту на здоров'я персоналу.

Приклади миючих і дезінфікуючих засобів, які пропонується використати під час біосинтезу альгінату представлено нижче по тексту:

Стериллін – засіб для гігієнічної обробки рук. Він містить екстракти обліпихи й імбиру, тому не пересушує шкіру, зберігаючи руки м'якими та ніжними, без подразнень і лущення. Ефективно знищує мікроби та бактерії, забезпечує надійний захист від вірусів. Не залишають неприємного відчуття липкості.

Засобом для гігієнічної обробки слід покривати всю поверхню рук, включаючи долоні, зап'ястя, ділянки між пальцями та під нігтями. Стериллін втирається в шкіру до повного висихання. Склад: діюча речовина - етанол 70%, допоміжні речовини - гліцерин, екстракт обліпихи, екстракт імбиру, вода. Нанести невелику кількість засобу на долоні, ретельно розтерти до повного висихання рідини.

Миючий засіб HC-CL 45 – лужний непінний рідкий миючий у вигляді рідини світло-жовтого кольору. Використовується в системі СІР для очищення ємностей, танків, трубопроводів, виробничого обладнання, тари). Не пошкоджує поверхні з нержавіючої сталі, заліза, алюмінію, жовтої і червоної міді, полімерних матеріалів, гуми і вилужених металів. Склад: луг, компонент захисту поверхні, дезінфектант, інгібітор корозії. Концентрація робочого розчину 1-2 % [52].

Мийний засіб PUR-265 – непінний миючий засіб (на основі гідроксидів натрію та калію) для мийки з поверхонь обладнання. Використовується для видалення жирових забруднень органічного походження, видаляє відкладення за короткий проміжок часу. Ефективний у воді при низьких температурах, не дає змогу утворюватися солей жорсткості. Толерантний до поверхонь із сталі, пластику, гуми. Рекомендований для миття обладнання, ємностей, апаратів, ліній розливу, трубопроводів. Рекомендований до використання у СІР мийках. Робочі концентрації: 0,5-2%. Оптимальна температура: 30-60 °С [53].

Засіб дезінфекційний «Максисан». Розчин прозорий, легко змиваються, не залишають патьоків і нальоту, не фіксують органічні забруднення на оброблюваних об'єктах. Комплекс чотирьох четвертинних амонієвих сполук і допоміжних компонентів. Розчин ефективний при високому білковому навантаженні. Відсутня корозійна дія на метали (в т. ч. алюмінію), скло, полімерні матеріали, гуму, деревину, на лакофарбове і гальванічне покриття.

Максисан має бактерицидну (включаючи мікобактерії туберкульозу, *P. aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* і *S. aureus Methicillin Resistant*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* 0157: H7, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella dysenteriae*, *Enterococcus faecium Vancomycin Resistant* *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*), віруліцидну (в т.ч. вірусів гепатитів, герпесу, грипу, СНІДу, рота-, коронавірус, збудників «пташиного грипу»), фунгіцидну (патогенні гриби і цвіль) і спороцидну дії. Використовують засіб у вигляді робочих розчинів в концентрації 0,04% - 0,25%. Рекомендована витрата робочого розчину – 100 мл/м² (протирання, зрошення) [54].

Дезінфікуючий засіб БАЦИЛІКВІД – прозора рідина від жовтого до коричневого кольору. Склад: глутаровий альдегід, хелатний і антикорозійний комплекси, вода, стабілізатори. Використовують для дезінфекції трубопроводів, комунікацій, резервуарів, технологічного обладнання, апаратури, інвентарю, тари та поверхонь приміщень.

Видаляє різні типи забруднення, не фіксують органічні забруднення. Тolerантний до поверхонь з лудженого заліза, алюмінію, скла, гуми (в т. ч. силіконової), нержавіючої сталі (в т. ч. хромової, хромонікелевої, аустенітної), кислотостійких пластмас (в т. ч. поліетилен, поліпропілен, полівінілхлорид), фторопласту (тефлон, вірон), кераміки та поверхні з лакофарбовим, гальванічним, полімерним покриттям, з емалі, гуми. Засіб володіє винятково високою бактерицидною (в т. ч. туберкулоцидною), віруліцидною (включаючи поліовірус), фунгіцидною (в тому числі щодо дріжджових і цвілевих грибів) і спороцидною діями. Засіб не має селективної антимікробної дії. Застосовується у вигляді водних робочих розчинів 0,05-0,1% [55].

Враховуючи вище зазначену інформацію, організація санітарної обробки в тому числі шляхом пошуку і вибору оптимальних в кожній конкретній ситуації миючих і дезінфікуючих засобів, критично впливає на правильність

ведення біотехнологічного виробництва і на отримання якісного кінцевого продукту.

Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Назва засобу	Склад	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість	Джерело
Стериллін	етанол 70%, допоміжні речовини - гліцерин, екстракт обліпихи, екстракт імбиру, вода	Ефективно знищує мікроби та бактерії, забезпечує надійний захист від вірусів	засіб для гігієнічної обробки рук	Засіб і його розчини не ушкоджують вироби з металу, скла, гуми, полімерних матеріалів (в т. ч. поліетилену, поліуретану), деревини, кераміки, лакофарбове, гальванічне і полімерне покриття	-	05.05.2021 до 05.05.2026	38 грн	[51]
НС-CL 45 (виробник: HUNGARO CHEMICALS)	луг, компонент захисту поверхні, дезінфектант, інгібітор корозії	-	лужний непінний рідкий миючий. Використовується в системі СІР для очищення ємностей, танків, трубопроводів, виробничого обладнання, тари). Не пошкоджує поверхні з нержавіючої сталі, заліза, алюмінію, жовтої і червоної міді, полімерних матеріалів, гуми і вилужених металів		Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 1,0-2,0%.	Реєстрація не потрібна	2697 грн за 25 л	[52]
PUR-265 (виробник: ТОВ СІТІБІЗ)	натрію гідроксид, калію гідроксид,	-	Рекомендований для миття обладнання, ємностей, апаратів, ліній розливу, трубопроводів		Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 0,5-2,0%.	Не потребує реєстрації	840 грн за 10 кг	[53]

Продовження таблиці 5.1

Максисан (виробник: Інтердез)	Комплекс чотирьох четвертинних амонієвих сполук і допоміжних компонентів .	має бактерицидну (включаючи мікобактерії туберкульозу, , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> i <i>S. aureus Methicillin Resistant</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Escherichia coli</i> 0157: H7, <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Enterococcus faecium</i> <i>Vancomycin Resistant Salmonella enteritidis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>), віруліцидну (в т.ч. вірусів гепатитів, герпесу, грипу, СНІДу, рота-, коронавірус, збудників «пташиного грипу»), фунгіцидну (патогенні гриби і цвіль) і спороцидну дії	Розчин прозорий, легко змиваються, не залишають патьоків і нальоту, не фіксують органічні забруднення на оброблюваних об'єктах.. Розчин ефективний при високому білковому навантаженні		Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 0,04-0,25%.	Наказ № 602-123-20-5/3349	1350,0 грн за 1 л	[54]
БАЦИЛІКВІД СТЕРИЛ (виробник: ТОВ «ДАНА МЕДІКАЛ», Україна)	глутаровий альдегід, хелатний і антикорозійний комплекси, вода, стабілізатори	має бактерицидну (включаючи мікобактерії туберкульозу, , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> i <i>S. aureus Methicillin Resistant</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Escherichia coli</i> 0157: H7, <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Enterococcus faecium</i> <i>Vancomycin Resistant Salmonella enteritidis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>), віруліцидну (в т.ч. вірусів гепатитів, герпесу, грипу, СНІДу, рота-, коронавірус, збудників «пташиного грипу»), фунгіцидну (патогенні гриби і цвіль) і спороцидну дії	однорідна прозора рідина від жовтого до коричневого кольору		Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 1,0% - 10,0%.	Наказ від 27.07.2023 №1363 до 27.07.2028	660 грн за 1 л	[55]

5.3.2 Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва альгінату

Промислове культивування з метою виробництва альгінату займає 355 днів і передбачає підготовку інокуляторів 15 л, 120 л, 1250 л та ферментеру 10 000 л, реакторів-змішувачів для приготування / стерилізації композицій, установку для автоматичного перемішування колб, лабораторного боксу та обладнання для виділення (центрифуги і збірника культуральної рідини).

Необхідна також організація і підготовка таких чистих приміщення, як: мікробіологічна лабораторія (зберігання робочої культури *Azotobacter vinelandii*, бокси для роботи із мікроорганізмами, проведення аналізів для контролю якості), приміщення із автоматичною установкою для вирощування інокуляту у колбах-качалках, приміщення для вирощування інокуляту в інокуляторах. Прийmemo, що обладнання у приміщеннях буде розташовуватися на відстані 1,5 м одне від одного та від стін, щоб полегшити персоналу обслуговування і очистку. Розміри і об'єм одиниць обладнання наведено у табл. 5.2

Таблиця 5.2

Габаритні розміри виробничого обладнання

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Інокулятор	15	0,65	0,8
Інокулятор	120	0,55	0,95
Інокулятор	1250	1,5	2,55
Ферментер	10 000	1,8	8,7
Реактор змішувач	5	0,48	1,5
Реактор змішувач	15	0,4	0,57
Реактор змішувач	15	0,4	0,57
Реактор змішувач	15	0,4	0,57
Реактор змішувач	100	1,0	2,35
Реактор змішувач	150	0,73	2,4
Реактор змішувач	1000	0,97	2,4
Реактор змішувач	7000	2,4	3,8
Всього	19650	-	-

Згідно із даними із *табл. 5.2* загальний об'єм виробничого обладнання складає 19 650 л.

Для того, щоб розрахувати кількість мийних та дезінфікуючих засобів, порібно оцінити розміри виробничих приміщень. Схематичне зображення приміщення для промислового виробництва культуральної рідини *A. vinelandii* наведено нижче на *рис. 5.1*

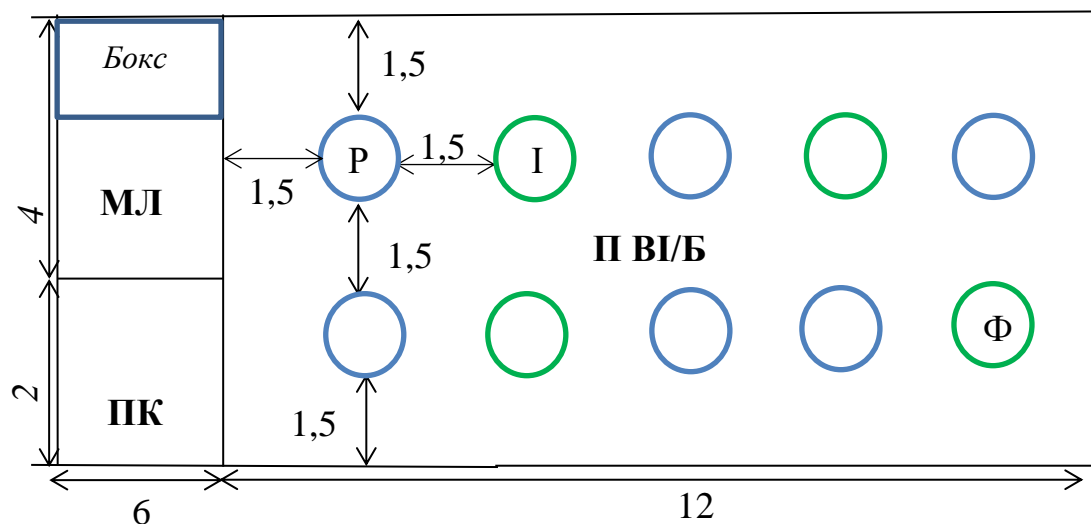


Рис. 5.1 Схематичне зображення виробничих приміщень

П ВІ/Б – приміщення вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу;

МЛ – мікробіологічна лабораторія;

ПК – приміщення з качалками.

І, Р, Ф, – інокулятор, реактор-змішувач, ферментер

Далі розрахуємо площі всіх складових виробничих приміщень. Так як необхідне щоденне миття підлоги для підтримання чистоти виробничих приміщень, то сумарна кількість складе 355. Генеральне прибирання виконується зазвичай 2 рази на місяць – тому в загальному це 24 рази. Наступним етапом розрахуємо кількості миючих засобів для обробки стін та підлоги. Згідно із *рис. 2.1*, враховуючи висоту приміщень 2,5 м, площа підлоги приміщення вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу складає 72 м^2 ($12 \text{ м} \times 6 \text{ м}$), площа стін – $((12 \text{ м} \times 2,5 \text{ м}) \times 2 + (6 \text{ м} \times 2,5 \text{ м})) \times 2 = 90 \text{ м}^2$, загальна площа – $72 \text{ м}^2 + 90 \text{ м}^2 = 162 \text{ м}^2$. Для мікробіологічної лабораторії площа підлоги складає $6 \text{ м} \times 4 \text{ м} = 24 \text{ м}^2$, площа стін – $((4 \text{ м} \times 2,5 \text{ м}) \times 2 + (6 \text{ м} \times 2,5 \text{ м})) \times 2 = 50$

м², загальна площа – 74 м². Для приміщення з качалками площа підлоги складає 2 м x 6 м = 12 м², площа стін – ((2 м × 2,5 м) × 2 + (3 м × 2,5 м)) × 2 = 25 м², загальна площа – 37 м².

Загальна площа поверхні обробки миючими засобами наведена в *табл.*

5.3

Таблиця 5.3

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Приміщення вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу	72	90	162
Мікробіологічна лабораторія	24	50	74
Приміщення з качалками	12	25	37
Разом	108	165	273

Наступним кроком буде розрахунок періодичності миття обладнання. Оскільки загальний об'єм культуральної рідини становить 625 272 л, а об'єм культуральної рідини за 1 цикл дорівнює 5892 л/цикл, то кількість виробничих циклів (циклів миття) становить: 625 272 л / 5892 л/цикл = 106 циклів. Варто врахувати додаткове миття після останнього циклу і загальна кількість буде становити 107. Тоді загальний об'єм миття:

$$19,65 \times 107 = 3347 \text{ м}^3$$

Таблиця 5.4

Розрахунок площ миття / дезінфекції під час виробничого процесу

Об'єкт	Площа / об'єм об'єкту, м ² / м ³	Періодичність миття / дезінфекції під час виробничого процесу	Загальна площа об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання	19,65 м ³	107	2102,55 м ³
Підлога	108 м ²	355	38 340 м ²
Стіни, двері, вікна	165 м ²	24	3960 м ²

Наступним кроком є розрахунок об'ємів робочих розчинів мийних / дезінфікуючих засобів, із врахуванням витрат близько 100 мл робочого розчину на 1 м² на площі поверхні, згідно із інформацією із інструкцій по експлуата-

ції. Враховуючи дані із *табл. 5.4*, загальний об'єм миття для обладнання складає $2102,55 \text{ м}^3$. Для зменшення витрат води і мийного засобу, а також з метою підвищення ефективності мийки обладнання, робочі розчини миючих засобів подаються разом із водою через СІР-мийки, що в свою чергу економить до 50 % миючих засобів і води. Таким чином для одного циклу миття знадобиться: $19650 \text{ л} \times 0,5 = 9825 \text{ л}$ робочого розчину миючого засобу, а на весь період виробничого процесу: $9825 \text{ л} \times 107 = 1\,051\,275 \text{ л}$. Загальна площа всіх поверхонь складає: $38\,340 \text{ м}^2 + 3\,960 \text{ м}^2 = 42\,300 \text{ м}^2$, а загальна витрата миючого / дезінфікуючого розчинів становить: $42\,300 \text{ м}^2 \times 100 \text{ мл} = 4230,0 \text{ л}$. Вартість мийних і дезінфікуючих засобів, а також витрати для миття і дезінфекції представлено у *табл. 5.5*.

Витрати і вартість мийних / дезінфікуючих засобів під час виробництва альгінату

Назва	Концентрація робочого розчину, %	Об'єкт миття / дезінфекції	Площа /об'єм миття / дезінфекції об'єкту, м ³ /м ²	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного/ дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Сумарна вартість миття /дезінфекції під час виробництва, грн
НС-CL 45 ¹	2,0 %	Обладнання	19,65 м ³	1 051 275	107,88	2,16	2 270 754
PUR-265 ²	1,25 %	Обладнання	19,65 м ³	1 051 275	84,0	1,05	1 103 838
Максисан ³	0,25 %	Обладнання / Стіни/підлога/ вікна	42 300 м ²	4230	1350,0	3,37	14 255
БАЦИЛІКВІД СТЕРИЛ ⁴	5 %.	Обладнання / Стіни/підлога/ вікна	42 300 м ²	4230	660,0	33	139 590

Примітка. Вартість засобів наведено станом на квітень 2025 р. 1- klineko.com.ua/shhelochnye-sredstva/hc-cl-45/ 2- https://primaterra.ua/ua/p2277683872-kislotnoe-sredstvo_dlya.html?srsId=AfmBOopbQxgGML0cMu2e_y9HgmoqenODGHK7xvBpG3wq-GX0oQt4UtK4I 3- <https://interdez.com.ua/product/maksisan-unvcpd> 4 - <https://prom.ua/ua/p887510839-batsilikvid-long-kontsentrat.html>

* **розрахунок вартості 1 л робочого розчину описано для мийного засобу «НС-CL 45 »:** Ціна 1 л становить 107,88 грн, концентрація його робочого розчину – 2,0 %, тому в 1000 мл робочого розчину міститься 2,0 мл (0,02 л) концентрату. Таким чином вартість 2,0 % розчину становить: 107,88 грн × 0,02 л = 2,16 грн/л.

5.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 10,0 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Підготовка посівного матеріалу відбувається у три стадії (в колбах на качалці, у посівних апаратах об'ємом 15 л, 120 л і 1250 л).

Згідно із інформацією із статті [1], склад поживного середовища має такий вигляд (г/л):

- сахароза – 20,0;
- K₂HPO₄ – 0,66 г/л;
- KH₂PO₄ – 0,16 г/л,
- CaSO₄·2H₂O – 0,05,
- NaCl – 0,2 г/л,
- MgSO₄·7H₂O – 0,2 г/л,
- Na₂MoO₄·2H₂O – 0,0029 г/л,
- FeSO₄·7H₂O – 0,027 г/л
- рН середовища – 7,0.

Підтримання стерильності під час вирощування культуральної рідини *A. vinelandii* і біосинтезу має критичне значення для отримання високого виходу альгінату. Однією із складових комплексного забезпечення чистоти процесу є підтримання стерильності поживного середовища. Щоб досягнути запланованого результату, компоненти поживного середовища розподіляють на композиції, для правильного вибору режимів стерилізації.

Посівний матеріал у колбах на качалках потребує невеликого об'єму поживного середовища, який зручно стерилізувати в автоклаві. Для всіх інших стадій одержання інокуляту та виробничого біосинтезу, підготовку компонентів середовища доцільно здійснювати в реакторах-змішувачах або інокуляторах/ферментерах. Сахароза стерилізуватиметься окремо через її тер-

молабільність. Окремо готують запасний розчин $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ і стерилізують в автоклаві.

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

На цьому етапі, щоб отримати необхідний об'єм інокуляту, потрібно приготувати 680 мл стерильного поживного середовища. Підготовлене середовище розливаємо у 5 стерильних качалочних колб об'ємом по 750 мл. Стерилізацію компонентів середовища в автоклаві проводимо таким чином:

Композиція А: сахароза (режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа, час 20 – 30 хв).

Композиція Б: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131°С, 40 хв, тиск 0,15 МПа).

Композиція В: $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131°С, 40 хв, тиск 0,15 МПа).

Таблиця 5.6

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 710 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Сахароза	20,0	14,2	А	0,31
Вода		0,31		
K_2HPO_4	0,66	0,46	Б	0,2
KH_2PO_4	0,16	0,11		
Вода		0,2		
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05	0,03	В	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	0,14		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,027	0,01		
NaCl	0,2	0,14		
Вода		0,2		
Усього			0,710	

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

Підготовка посівного матеріалу передбачає приготування 7,01, 62,62 л, 622 л стерильного поживного середовища.

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 15 л

Для цієї стадії необхідно 7,01 л поживного середовища. Композиція А стерилізується у реакторі об'ємом 5 л. Композиція Б стерилізуються в автоклаві.

Композиція А: сахароза (режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа, час 20 – 30 хв).

Композиція Б: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (режим стерилізації: 131°С, 40 хв, тиск 0,15 МПа).

Таблиця 5.7

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 15 л ($K_3 = 0,6$)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 7,01 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Сахароза	20,0	140,2	А	4,0
Вода	3,7			
Конденсат			0,3	
K_2HPO_4	0,66	4,63	Б	3,01
KH_2PO_4	0,16	1,12		
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,05	0,35		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	1,4		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,027	0,19		
NaCl	0,2	1,4		
Вода	3,01			
Усього			7,01	

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 120 л

Для цієї стадії необхідно 62,62 л поживного середовища, склад і умови стерилізації композицій аналогічні пункту 2.2.2. Композиція А стерилізується у реакторі об'ємом по 100 л. Композиція Б стерилізується у автоклаві.

Таблиця 5.8

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 120 л ($K_3 = 0,6$)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 62,62 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Сахароза	20,0	1,25 кг	А	60,0
Вода	54,6			
Конденсат			5,4	
K_2HPO_4	0,66	41,32	Б	2,62
KH_2PO_4	0,16	10,01		
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,05	3,13		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	12,52		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,027	1,69		
NaCl	0,2	12,52		
Вода	2,62			
Усього	62,62			

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1250 л

Для цієї стадії необхідно 622 л поживного середовища, склад і умови стерилізації композицій аналогічні пункту 2.2.2. Композиція А стерилізується у реакторі об'ємом по 1000 л, композиція Б у реакторі об'ємом 15 л

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1250 л ($K_3 = 0,6$)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 622 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Сахароза	20,0	12,44 кг	А	612,0
Вода		556,4		
Конденсат			55,6	
K_2HPO_4	0,66	410,52	Б	10,0
KH_2PO_4	0,16	99,52		
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,05	31,1		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	124,4		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,027	16,79		
NaCl	0,2	124,4		
Вода		9,1		
Конденсат			0,9	
Усього			622,0	

5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Для цієї стадії необхідно 5952,0 л поживного середовища, тому є потреба у використанні установки безперервної стерилізації. Склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.2.2. Композиція А готується у реакторі об'ємом по 7000 л, композиція Б у реакторі об'ємом 150 л, а стерилізація відбувається в УБС.

Композиції стерилізації компонентів для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10,0 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5952 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Сахароза	20,0	119,04 кг	А	5752,0
Вода		5229,1		
Конденсат			522,9	
K ₂ HPO ₄	0,66	3,92 кг	Б	100,0
KH ₂ PO ₄	0,16	952,32		
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0,05	297,6		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	1,19 кг		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,027	160,7		
NaCl	0,2	1,19 кг		
Вода		91,0		
Конденсат			9,0	
Усього			5952,0	

5.5 Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Щоб не дати утворитися фосфатним солям, композицію перед стерилізацією будемо підкислювати 6%-им розчином соляної кислоти до рН 4,0-4,5. Вирощування продуценту і біосинтез альгінату *A. vinelandii* вимагає підтримання рН на рівні 7,0, тому ще необхідно попередньо підготувати 6%-вий розчину натрію гідроксиду. Дані необхідних кількостей розчинів NaOH та HCl приведено у табл. 5.11

Розраховані об'єми та особливості приготування 6 % р-нів NaOH та HCl

Об'єм середовища, л	6% NaOH		6 % HCl	
	Об'єм, мл	Особливості приготування	Об'єм, мл	Особливості приготування
7,01	14,02	У колбі на 20 мл	14,02	У реакторі на 15 л
62,62	125,24	У колбі на 200 мл	125,24	
622	1244	У колбі на 2 л	1244	
5952,0	11 904	У реакторі на 15 л	11 904	

Таким чином технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, вимагає включення додаткових стадій приготування і стерилізації 6% розчинів NaOH і HCl.

Необхідно передбачити такі реактори, об'ємами::

- 5 л, 15 л, 100 л, 150 л, 1000 л, 7000 л – для приготування та стерилізації композицій.
- 2x15 л – для приготування та стерилізації 6 % р-нів NaOH та HCl.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Узагальнений перелік обладнання, використовуваного для біосинтезу альгінату наведено у табл. 6.1. Відповідне обладнання представлене у графічній частині (апаратурна схема).

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування позиції	Кількість	Характеристика обладнання
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник із шахтою вентиляційною D 630. Розміри: 630 x 2200 мм [56].
Ф-2	Фільтр грубого очищення	1	Касетний фільтр Вентс ФБ. Розміри: 400x200. Пропускна здатність: 500 м3/год. Перепад тиску: 50 Па. Клас фільтрації G4 [57].
К-3	Компресор стиснення	1	Компресор CORMAK THEOR 30 -10. Продуктивність компресора: 3200 л/хв. Тиск компресора: 10 бар. Споживана потужність: 22,0 кВт. Габарити: 1380x850x1160 мм [58].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач. DAIKIN FDXM35F3/RXS35L3 Потужність: 3,4 кВт. Робочий діапазон: -10~+46°C. Габарити: 200x750x620 мм [59].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер Лідер 2700. Виробник: Україна. Об'єм: 2700 л. Матеріал: сталь. Робочий тиск: 10 бар. Робоча температура: 5.. +40 °С. Вага: 1540 кг [60].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник-охолоджувач. DAIKIN FDXM35F3/RXS35L3 Потужність: 3,4 кВт. Робочий діапазон: -15~+18°C. Габарити: 200x750x620 мм [59].

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ			62		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ			Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Дядюк Є. І.								62	109
Консульт.								Кафедра БТМ		
Керівник	Буценко Л.М.									
Н. Контр.										
Зав. каф.	Стабніков В.П.									

Продовження табл. 6.1

Ф-7	Фільтр головного очищення	1	Фільтр повітряний панельний гофрований Aerofilter ФВП-Г (G4) Виробник: Україна. Матеріал: поліестер. Розміри: 500×250 мм [61].
РЗ-8	Реактор-змішувач для підготовки композиції А		Реактор-змішувач BSF-5L. Виробник: Henan Weifan Equipment Co., Ltd.. Об'єм: 5 л Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний: сорочкою, мішалкою, датчиками температури, рН, СІР мийкою. Розміри: 450x480 x1500 мм [62].
I-9	Інокулятор	1	Інокулятор BLBIO-XGJG-2-A-15. Об'єм: 15 л. Виробник: Vailun Biotechnology (Jiangsu) Co., Ltd., Китай. Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний: сорочкою, мішалкою, датчиками температури, кисню, рН. Габарити: 600x650x800 мм [63].
IФ-10, IФ-11, IФ-12, IФ-13	Індивідуальний фільтр	4	Фільтр ФЯС-У. Е(*)006.1П. Виробник: Фолтер. Матеріал: мініплісована скловолокниста тканина; Номінальна продуктивність: 900 [64].
Д-14, Д-15, Д-16, Д-17, Д-18	Ваговий дозатор для компонентів середовища і NaOH	5	Дозатор ваговий ВД-1н 30 кг. Виробник: ABC Tech, Україна. Тип матеріалу: харчова нержавіюча сталь AISI 304. Діапазон зважування: 1 кг - 30 кг. Точність: 0,2% або ± 20г на 15кг [65].
ВН-19 ВН-20 ВН-21 ВН-22 ВН-23 ВН-24 ВН-25	Відцентровий насос для перекачування	7	Насос відцентровий LEO 3.0 AJDm75/4H. Потужність: 750 Вт. Торгова марка: Leo. Продуктивність: 30 л/хв. Матеріал: AISI 304 сталь. [66].
РЗ-26	Реактор-змішувач для підготовки композиції А	1	Реактор-змішувач LEXSR-100L. Виробник: Китай. Об'єм: 100 л Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний: сорочкою, мішалкою, датчиками температури, рН, СІР мийкою. Розміри: 1050x690x2350 мм [67]
I-27	Інокулятор	1	Інокулятор FD-1.2В. Об'єм: 120 л. Виробник: Prolitech . Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, датчиками температури, кисню, рН. Габарити: 550x950 мм [68]

Продовження табл. 6.1

РЗ-28	Реактор-змішувач для підготовки композиції А	1	Реактор-змішувач . Виробник: Wincanton Engineering. Об'єм: 1000 л Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, якірною мішалкою), датчиками температури, рН, СІР мийкою. Розміри: 970x1450 мм [69].
РЗ-29	Реактор-змішувач для підготовки композиції Б	1	Реактор-змішувач РА-15. Виробник: Китай. Об'єм: 15 л Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний: сорочкою, мішалкою, датчиками температури, рН, СІР мийкою. Розміри: 400x 575 мм [70]
ПА-30	Посівний апарат	1	Посівний апарат ФР. Об'єм: 1250 л. Виробник: Об'єм: 120 л. Виробник: Prolitech . Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, датчиками температури, кисню, рН. Розміри: 1530x2530мм [71]
РЗ-31	Реактор-змішувач для підготовки композиції А		Реактор-змішувач. Об'єм: 7000 л Матеріал корпусу: 304 L нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, мішалкою, датчиками температури, рН, СІР мийкою. Габарити: 1890x2400x3800 мм [72]
РЗ-32	Реактор-змішувач для підготовки композиції Б	1	Реактор-змішувач LEXSR-150L. Виробник: Китай. Об'єм: 150 л Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний: сорочкою, мішалкою, датчиками температури, рН, СІР мийкою. Розміри: 730x730x2400мм [67]
УБС-33	Установка безперервної стерилізації	1	Матеріал: нержавіюча сталь; потужність – 15 м ³ /год; температура стерилізації – 131 С; містить 2 теплообмінника. Виготовлення на замовлення.
Ф-34	Ферментер 10 м ³	1	Ферментер. Об'єм: 10000 л. Виробник: ХімМаш, Україна. Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, мішалкою, датчиками температури, кисню, рН. Габарити: 1800x8700 мм [73]

Закінчення табл. 6.1

РЗ-35	Реактор-змішувач для підготовки 6 % розчину HCl	1	Реактор-змішувач РА-15. Виробник: Китай. Об'єм: 15 л Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний: сорочкою, мішалкою, датчиками температури, рН, СІР мийкою. Розміри: 400x 575 мм [70]
РЗ-36	Реактор-змішувач для підготовки 6 % розчину NaOH	1	Реактор-змішувач РА-15. Виробник: Китай. Об'єм: 15 л Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний: сорочкою, мішалкою, датчиками температури, рН, СІР мийкою. Розміри: 400x 575 мм [70]
ВН-37	Відцентровий насос для перекачування культуральної рідини у збірник	1	Насос відцентровий LEO 3.0 2ACm150. Потужність: 1500 Вт. Торгова марка: Leo. Продуктивність: 160 л/хв. Матеріал валу: AISI 304 нержавіюча сталь. Максимальний тиск: 5 бар [74].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.

Загальна технологічна схема виробництва альгінату *A. vinelandii* АТСС 9046 містить допоміжні (ДР) та основні роботи (ТП). Стадії допоміжних робіт включають в себе: підготовка стерильного аераційного повітря, підготовку титрувальних розчинів HCl та NaOH, приготування запасного розчину $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, а також приготування та стерилізацію поживних середовищ. Підготовка посівного матеріалу і виробничий біосинтез належать до стадій технологічного процесу.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря відбирають за допомогою повітрязабірника (ПЗ-1) у найвищій точці – на висоті 15 м (висота поверху – 6 м, кількість поверхів – 1, косий дах будівлі (~1,5 м), + 2-3 метри), де розміщують обладнання для стиснення та очищення повітря.

ДР 1.2. Очищення повітря від грубих часток

Попереднє очищення повітря проводять у фільтрі (Ф-2), що забезпечує ступінь очищення до 90%, затримуючи при цьому частинки діаметром 50 мкм.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Стискання повітря здійснюють у компресорі (К-3), щоб забезпечити аерацію та подолати гідравлічний тиск стовпа рідини у ферментері. Умови процесу: тиск – 0,35 МПа, температура – до 250°C.

ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи

Стиснене повітря, утворене при компресуванні, (від ДР 1.3) надходить до теплообмінника-охолоджувача (Т-4), де охолоджується до температури 25-30°C. Згодом зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де проходить усунення пульсацій руху повітря. На даному етапі показник воло

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Дядюк Є. І.			Літ.	Арк.	Акрушіт
Консульт.						66	109
Керівник		Буценко Л.М.			Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. каф.		Стабніков В.П.					

гості зменшується до 60%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Охоложене повітря (від ДР 1.4) надходить до теплообмінника-нагрівача (Т-6), де нагрівається до температури 45-50°C. На даному етапі показник вологості зменшується до 50%.

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Нагріте повітря (від ДР 1.5) надходить до головного фільтра очистки (Ф-7), який ставлять біля ферментаційних відділень. На даному етапі ступінь очищення складає 95%.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 1.6) через трубопроводи подається безпосередньо в індивідуальні фільтри кожного з інокуляторів до ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 5.7, ТП 6.1. Ступінь кінцевої очистки повітря складає 99,999% та КУО < 1.

ДР 2. Підготовка титрувальних агентів

ДР 2.1. Підготовка 6%-го розчину HCl

ДР 2.1.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища в інокуляторах об'ємом 15, 120, 1250 л і ферментері на 10 м³

Для того, аби приготувати 13287,26 л 6%-го розчину HCl потрібно у реактор-змішувач (РЗ-37) об'ємом 15 л додати 11132,57 мл води дистильованої через лічильник і додати за допомогою мірного циліндра на 2500 мл при постійному перемішуванні 2154,69 мл 37%-го розчину соляної кислоти (Кх).

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 15,0 л.

Для приготування 14,02 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 0,84 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 20 мл і за допомогою мірного циліндра на 15 мл додають 14,02 мл питної води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 120,0 л.

Для приготування 125,24 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 7,51 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 150 мл і за допомогою мірного циліндра на 150 мл додають 117,72 мл питної води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 1250,0 л.

Для приготування 1244,0 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 74,64 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2 л і за допомогою мірного циліндру на 1000 мл додають 1169,36 мл питної води, перемішують до повного розчинення. Стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.2.4. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у ферментері об'ємом 10,0 м³.

Для приготування 11904 л 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 714,24 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у реактор-змішувач (РЗ-38) об'ємом 15 л і за допомогою лічильника додають 11 189,76 мл питної води, перемішують до повного розчинення. Стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3. Приготування і стерилізація запасного розчину Na₂MoO₄·2H₂O

ДР 3.1. Приготування і стерилізація запасного розчину молібдату натрію для вирощування інокуляту у колбах на качалках

За використання технічних вагів зважують 1 г Na₂MoO₄·2H₂O. Наважку переносять до колби об'ємом 250 мл, додають 99 мл питної води, відміряної мірним циліндром, перемішують, закривають ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4. Приготування і стерилізація поживних середовищ

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

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 14,2 г сахарози і переносять у колбу об'ємом 500 мл, додають за використання мірного циліндра на 500 мл дистильовану воду об'ємом 310 мл, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві (0,05 МПа) протягом 30 хв (Кт, Км).

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,46 гідроортофосфату калію і 0,11 г дигідроортофосфату кальцію і переносять у колбу об'ємом 500 мл, додають за використання мірного циліндра на 200 мл дистильовану воду об'ємом 200 мл, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км).

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0,03 г сульфату кальцію, 0,14 сульфату магнію, 0,01 г сульфату заліза, 0,14 г хлориду натрію, переносять у колбу об'ємом 200 мл, додають за використання мірного циліндра на 100 мл дистильовану воду об'ємом 80 мл, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км).

ДР 4.1.4. Змішування композицій А, Б і В

У колбу об'ємом 1000 мл в асептичних умовах зливають простерилізовані композиції А (від ДР 4.1.1), Б (від ДР 4.1.2) і В (від ДР 4.1.3). Після завершення процесу здійснюють мікробіологічний контроль.

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 15 л

Приготувати треба 7,01 л ПС.

ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 140,1 г сахарози і переносять у реактор-змішувач (РЗ-8) об'ємом 10 л, додають через лічильник 4,0 л питної води, вмикають перемішувач. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури на рівні 40 °С. Отриманий розчин перекачують в інокулятор (І-9) на 10 л. Стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв (Кт, Км).

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 4,63 г гідроортофосфату калію, 1,12 г дигідроортофосфату кальцію, 0,35 г сульфату кальцію, 1,4 г сульфату магнію, 0,19 г сульфату заліза, 1,4 г хлориду натрію і переносять у колбу об'ємом 4000 мл, додають за використання мірного циліндра дистильовану воду об'ємом 3010 мл, додають 6 % розчин НСІ від ДР 2.1.1. до рН 4,0-4,5, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км).

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 120 л

Приготувати треба 62,62 л ПС.

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1,25 кг сахарози і переносять у реактор-змішувач (РЗ-26) об'ємом 100 л, додають через лічильник 54,6 л питної води, вмикають перемішувач. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури на рівні 40 °С. Отриманий розчин перекачують в інокулятор (І-27) на 120 л. Стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв (Кт, Км).

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 41,32 г гідроортофосфату калію, 10,01 г дигідроортофосфату кальцію, 3,13 г сульфату кальцію, 12,52 г сульфату магнію, 1,69 г сульфату заліза, 12,52 г хлориду натрію і переносять у колбу об'ємом 4000 мл, додають за використання мірного циліндра дистильовану

воду об'ємом 2620 мл, додають 6 % розчин HCl від ДР 2.1.1. до рН 4,0-4,5, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км).

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 1250 л

Приготувати треба 622 л ПС.

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 12,44 кг сахарози і переносять у реактор-змішувач (РЗ-28) об'ємом 1000 л, додають через лічильник 556,4 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури на рівні 40 °С. Отриманий розчин перекачують в інокулятор (ПА-30) на 1250 л. Стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв (Кт, Км).

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 410,52 г гідроортофосфату калію, 99,52 г дигідроортофосфату кальцію, 31,1 г сульфату кальцію, 124,4 г сульфату магнію, 16,79 г сульфату заліза, 124,4 г хлориду натрію і переносять у реактор-змішувач (РЗ-29) об'ємом 15 л, додають через лічильник 9,1 л питної води, додають 6 % розчин HCl від ДР 2.1.1. до рН 4,0-4,5, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури на рівні 40 °С. Стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км).

ДР 4.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 10,0 м³

Приготувати треба 5089 л ПС.

ДР 4.5.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 119,04 кг сахарози і переносять у реактор-змішувач (РЗ-31) об'ємом 10000 л, додають через лічильник 5229,1 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення ком-

понентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури на рівні 40 °С.

ДР 4.5.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 3,92 кг гідроортофосфату калію, 952,32 г дигідроортофосфату кальцію, 297,6 г сульфату кальцію, 1,19 кг сульфату магнію, 160,7 г сульфату заліза, 1,19 кг хлориду натрію і переносять у реактор-змішувач (РЗ-32) об'ємом 150 л, додають через лічильник 91 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури на рівні 40 °С.

ДР 4.5.3. Стерилізація композиції А і Б в УБС

Одержані розчини (від ДР 4.5.1 і ДР 4.5.2) перекачують відцентровим насосом у реактор УБС-33, де проходить стерилізація гострою парою за температури 131 °С протягом 5-7 хвилин.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

Посівний матеріал готують глибинним способом вказати кількість стадій.

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Культуру мікроорганізму *A. vinelandii* АТСС 9046 зберігають та пересівають у пробірках зі скошеним МПА (м'ясо-пептонний агар) при температурі 4 °С. Всі роботи з культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Для отримання робочої культури, необхідно колекційну культуру, що зберігається в пробірках з скошеним м'ясо-пептонний агар, розсіяти на чашки Петрі з поживним середовищем такого ж складу до ізольованих колоній, вирощуючи бактерії при температурі 30⁰С упродовж 24 год. Пробірки візуально контролюють на однорідність морфологічних ознак.

ТП 5.3. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Ізольовані колонії з чашок Петрі пересівають петлею в пробірки зі скошеним м'ясо-пептонним агаром.

Одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки. Використовуються колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Тривалість вирощування – 24 години при 30⁰С.

ТП 5.4. Отримання посівного матеріалу в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 1000 мл із стерильною композицією А, Б і В (від ДР 4.1.4), додають запасний розчин від ДР 3.1, перемішують і розливають по 142 мл у 5 стерильних качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірки з робочою культурою *A. vinelandii* вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і переносять у колби. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Штами вирощують у колбах на качалці (200 об/хв) упродовж 33 год. Після перевірки посівного матеріалу на відсутність сторонньої мікробіоти, в лабораторному боксі посівний матеріал зливають в стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 5.5. Приготування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 15 л

Для одержання інокуляту, у інокулятор (І-9) в якому міститься стерильний розчин композиції А (від ДР 4.2.1), подають самоплином стерильний розчин композиції Б (від ДР 4.2.2) та через засівну колбу стерильний розчин молібдату натрію (від ДР 3.1). Після цього вносять розчин гідроксиду натрію для вирівнювання рН середовища до 7,0 (від ДР 2.2.1) та вносять посівний матеріал від ТП 5.4 через засівну колбу. Культивування проводиться протягом 33 год при 30⁰С, рН 7,0 при постійному перемішуванні (700 об/хв) і подачі стерильного повітря від ДР 1.7.

ТП 5.6. Приготування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 120 л

Для одержання інокуляту, у інокулятор (І-27) в якому міститься стерильний розчин композиції А (від ДР 4.3.1), подають самоплином стерильний розчин композиції Б (від ДР 4.3.2) та через засівну колбу стерильний розчин молібдату натрію (від ДР 3.1). Після цього вносять розчин гідроксиду натрію для вирівнювання рН середовища до 7,0 (від ДР 2.2.2) та вносять посівний

матеріал від ТП 5.5 через трубу перетискування. Культивування проводиться протягом 33 год при 30°C, рН 7,0 при постійному перемішуванні (700 об/хв) і подачі стерильного повітря від ДР 1.7.

ТП 5.7. Приготування посівного матеріалу в посівному апараті 1250 л

Для одержання інокуляту, в посівному апараті (ПА-30) із композицією А від ДР 6.4.1 подають самоплином стерильний розчин композиції Б (від ДР 4.4.2) та через засівну колбу стерильний розчин молібдату натрію (від ДР 3.1). Після цього вносять розчин гідроксиду натрію для вирівнювання рН середовища до 7,0 (від ДР 2.2.3) та вносять посівний матеріал через трубу перетискування від ТП 5.6. Культивування проводиться протягом 33 год при 30°C, рН 7,0 при постійному перемішуванні (700 об/хв) і подачі стерильного повітря від ДР 1.7.

ТП 6. Біосинтез

ТП.6.1. Виробниче культивування

У попередньо простерилізований ферментер (Ф-34) об'ємом 10 м³ подають стерильне поживне середовище від ДР 4.5.3. Після цього вносять розчин гідроксиду натрію для вирівнювання рН середовища до 7,0 (від ДР 2.2.4) та вносять посівний матеріал через трубу перетискування від ТП 5.7.

Культивування проводять протягом 65 год при 30°C, рН 7,0 і при постійному перемішуванні (700 об/хв) і подачі стерильного повітря від ДР 1.7. Культивування припиняють при досягненні концентрації альгінату 3,3 г/л у культуральній рідині.

РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ АЛЬГІНАТУ

Виходячи із даних, представленою у роботі [1], альгінат отримують із культуральної рідини після вирощування штаму *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046. Щоб виділити альгінат із культуральної рідини використовують технологію осадження ацетоном, що описано у патенті US 10,889,657 B2 [75]. Це дає ряд переваг, оскільки осад альгінату не є липким/желеподібним, на відміну від більш широко використовуваного осадження етанолом (відомого з поточних процесів екстракції альгінату, що застосовуються для збирання морських водоростей). Інші речовини, такі як діетиловий ефір, не утворює осад і не змішується з водою; бутанол утворює двофазну систему желеподібної консистенції; ДМСО (диметилсульфоксид) дозволяє альгінату випадати в осад, але він утворює липкий гель, а ДМСО не є летким, тому його не можна легко відокремити від альгінату; етиленгліколь не випадає в осад і утворює гомогенний гель. Встановлено, що додавання приблизно 50% ацетону при перемішуванні викликає утворення пухнастого осаду солей альгінату, який залишається для подальшого сушіння.

На першому етапі культуральну рідину центрифугують (7650 об/хв, протягом 10 хвилин) [76], щоб отримати так званий «гранульований осад», що містить речовини, що складаються в основному із екзополісахаридів (50 %), і меншу частину, менше ніж 10%, що складається з ліпідів та/або інших компонентів, більш гідрофобних, ніж екзополісахариди. Перевагою центрифугування є повна автоматизація процесу за якого кількість затриманих та незруйнованих клітин більша, порівняно з фільтрацією чи флоатацією [75].

Було виявлено, що позаклітинні полімерні речовини, отримані з «гранульованого осаду», що містить основну частину екзополісахаридів і незначну частину ліпідів, забезпечують дуже ефективну волостійкість. Після отримання

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Дядюк Є. І.				РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ АЛЬГІНА- ТУ	Літ.	Арк.	Акрощів
Консульт.							75	109
Керівник	Буценко Л.М.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

мання осаду, його підсушують в камері вакуум-сушки (за температури 50-60 °C), видаляючи воду до вмісту приблизно 25-30%.

На наступному етапі до підсушеної маси додають 1-5 % $\text{Na}(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$. Це необхідно для того аби зв'язати альгінат і полегшити процес осадження ацетоном. Отриману суміш альгінату амонію передають на стадію осадження ацетоном.

Осадження альгінату відбувається за допомогою кількарязового додання 35 % ацетону за постійного перемішування (600-1000 об/хв). Ацетон вважається досить оптимальним методом обробки, оскільки його легко переробити за допомогою дистиляції/мембранного відділення та аналогічних методів; також це природна сполука, тому вона не створює серйозних проблем, якщо в продукті залишаються сліди. Ефективність осадження досягає 80 %. Після закінчення процесу розчинник частково випаровують за допомогою нагрівання суміші, що залишається у вигляді волокнистої суспензії маси натрієвої солі екстрагованого альгінату.

Після закінчення осадження суспензію центрифугують при 2000-6000 об/хв, протягом 10-45 хвилин, і осад збирають для подальшої обробки.

Отриману таким чином масу альгінату охолоджують і поміщають у камеру вакуумної сушки, щоб отримати максимально висушену Na -альгінатну фібрилярну масу. Це робиться з метою перешкоджанню руйнуванню готового продукту [1]. Отримані волокна біополімера мають довжину від 1-2 мм до кількох 1-5 см, товщину 2-250 мкм (наприклад, 10-100 мкм), і волокна можуть мати жовтуватий вигляд. Слід зазначити, що такий альгінат зазвичай містить слідові кількості нерозчинника, такі як 0,0001-0,1 мас. % ацетону.

Таким чином у процесі виробництва можна виділити кілька основних етапів:

- 1) центрифугування культуральної рідини, щоб отримати суміш екзополісахариду та інших речовин із культуральної рідини – «осад» (4000 об/хв, протягом 10-20 хвилин);

2) підсушення «осаду» в камері вакуум-сушки при $T=50-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (до вмісту води 25-30%);

3) отримання суміші альгілату амонію для покращення осадження (додаванням до «осаду» екзополісахариду 1-5 % $\text{Na}(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$);

4) осадження альгілату амонію ацетоном за постійного перемішування (600-1000 об/хв);

б) осадження маси натрію альгілату центрифугуванням (2000-6000 об/хв, 10-45 хвилин);

7) охолодження маси натрію альгілату до кімнатної температури і вакуумна сушка при температурі $60-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3-5 год), з метою остаточного видалення залишків рідини і довготривалого зберігання готового продукту.

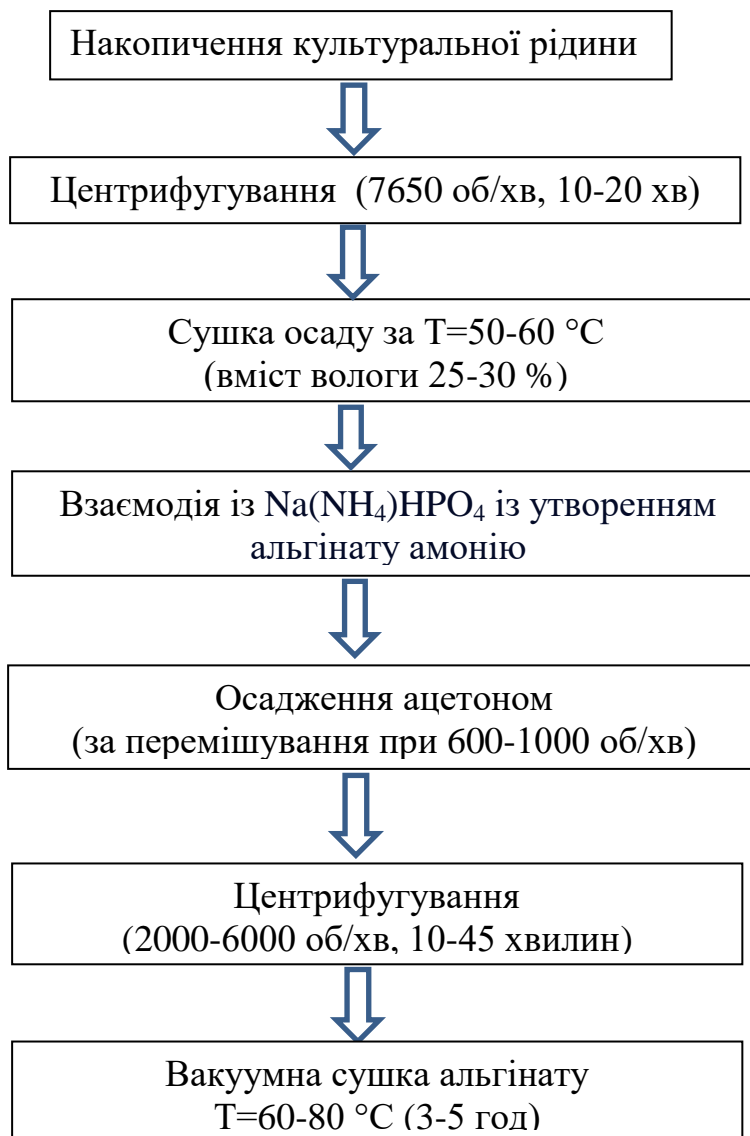


Рис 8.1. Схематичне зображення процесу виділення і очищення альгілату

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Мікробіологічний контроль

Протягом процесу культивування періодично (кожні 8 год) відбирають проби поживних середовищ, посівного матеріалу, культуральної рідини для мікробіологічного контролю, а також для контролю показників росту і біосинтезу: концентрації альгінату та біомаси, контролю рівня джерела вуглецю (сахарози) у середовищі.

9.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури

Для контролю чистоти культуральної рідини застосовують метод мікроскопії під світловим мікроскопом. Це включає використання фіксованого мазка і об'єктива з 90-кратним збільшенням. Якщо виявлено клітини з нехарактерною морфологією, проводять висівання культуральної рідини на щільні поживні середовища.

При цьому для кожного зразка використовують по дві чашки Петрі діаметром 9 см, в які вносять 1 мл зразка та 15-20 мл розплавленого поживного середовища. Для вирощування бактерій може бути використане середовище МПА / ГКА, а для грибів – середовище із сусло-агаром (СА). Температура поживного середовища при цьому не повинна перевищувати 45°C. Інкубацію проводять при 37°C протягом 24 годин для бактерій та при 25°C протягом 48-72 годин для виявлення дріжджів та міцеліальних грибів [76].

Після закінчення періоду інкубації чашки перевіряють на наявність сторонньої мікрофлори. На чашках із посівами інокуляту культуральної рідини мають бути виявлені виключно колонії *Azotobacter vinelandii*.

Azotobacter vinelandii – грамнегативні бактерії, що утворюють витягнуті клітини овальної форми розмірами 2x5 мкм (рис. 9.1). Джгутиків не утворюють, до руху ковзанням не здатні.

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Дядюк Є. І.				РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							79	109
Керівник	Доценко Л.М.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

Клітини *A. vinelandii* не здатні до утворення спор, проте у процесі своєї життєдіяльності можуть утворювати цисти у відповідь на несприятливі умови навколишнього середовища [77, 78].

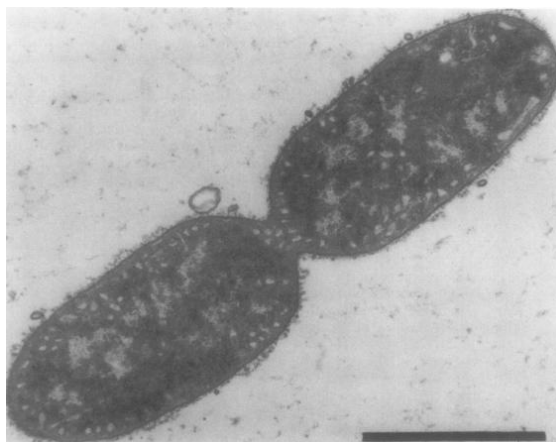


Рис. 9.1. Клітини *Azotobacter vinelandii* перед закінченням поділу

На щільних поживних середовищах утворюють плоскі колонії білого кольору з більш прозорими краями, зазвичай глянцеві. Псевдоміцелію не утворює [77, 78].

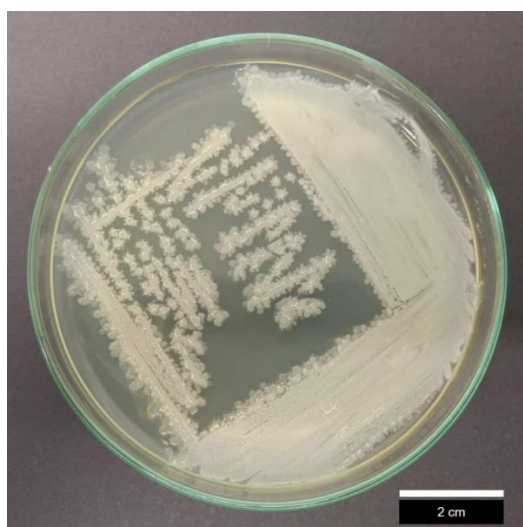


Рис. 9.2. Колонії *A. vinelandii* на щільному поживному середовищі

Колонії *A. vinelandii* здатні до росту на манітолі, рамнозі та інших карбогідратах, асимілює глюкозу, сахарозу, фруктозу. Можуть також використовувати у якості джерела вуглецю різні органічні кислоти та спирти, наприклад гліцерин. Як джерело азоту також здатен використовувати сульфат амо-

нію. У якості запасної речовини акумулює полі- β -гідроксималяну кислоту [77, 78].

9.3 Визначення концентрації альгінату

Концентрацію альгінату вимірювали гравіметрично. Зразки культурального бульйону (30 мл) змішували з сумішшю (6 мл) Na_4EDTA (0,1 моль/л) і NaCl (1,0 моль/л) і потім центрифугували при $7650 \times g$ протягом 10 хв. 3:1 холодного пропан-2-олу/вода додавали до супернатанту і промивали його. Отриманий осад фільтрували через Millipore 0,45 мкм через фільтрувальний папір, висушений до 80°C до постійної маси та зважували залишок [1].

9.4 Визначення концентрації джерела вуглецевого (глюкоза) і азотного живлення (дріжджовий екстракт) у поживному середовищі

Пробопідготовка. З метою проведення подальших аналізів необхідно отримати 20 мл центрифугованої від біомаси культуральної рідини, тобто супернатанту. Врахувавши частку біомаси у культуральній рідині (близько 10 мл), приймаємо, що об'єм проби із ферментера становитиме 30 мл. Відібрану пробу необхідно процентрифугувати при 5000 об / хв протягом 45 хв. Одержаний супернатант використовується для визначення вмісту джерел азоту та вуглецю.

Для визначення концентрації сахарози обираємо метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) із рефрактометричним детектором. В основі обраного методу лежить принцип розділення речовин шляхом їх взаємодії зі стаціонарною фазою (матеріал колонки) та мобільною фазою (розчин, взятий до аналізу) [79].

ВЕРХ-аналіз сахарози проводили на системі ВЕРХ DIONEX UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), обладнаній рефрактометричним детектором (R1-101, Shodex, Японія). Умови аналітичного детектора рефрактометра були наступними: колонка Carbo BC-100 Calcium $300 \times 7,8$ мм, діаметр 10

мкм (Waters, США); температура колонки 80 °С; рухома фаза Milli-Q вода; швидкість потоку 0,4 мл·хв⁻¹.

Стандартні зразки порівняння готували шляхом додавання визначеної кількості сахарози до 50 мМ фосфатного буферного розчину (рН 6,5). Після цього 500 мкл зразків, що містили різні концентрації сахарози, поміщали у колонку та здійснювали аналіз, як описано вище [80].

9.5 Визначення концентрації біомаси

Біомасу оцінювали гравіметрично. Десять мілілітрів культурального бульйону змішували з 1 мл Na₄EDTA (0,1 моль л⁻¹) і 1 мл NaCl (1,0 моль л⁻¹). Розчин центрифугували при 7650×g протягом 10 хв. Осад тричі промивали дистильованою водою. Отриману гранулу сушили при 90 °С до постійної ваги [1].

9.6. Карта постадійного контролю

Дані щодо проведення постадійного контролю виробництва альгінату *A. vinelandii* АТСС 9046 наведено у табл.

9.1.

Таблиця 9.1

Карта постадійного контролю виробництва альгінату

Номер позиції (контрольної точки) та її назва	Об'єкт, обраний для контролю та показник	Засоби та методики контролю	Періодичність здійснення контролю та відбору аналізованих проб	Нормоване значення показника контролюваного об'єкту
1	2	3	4	5
Кт 1.1 <i>Забір атмосферного повітря</i>	Повітрозабірник Висота забору повітря	-	Під час купівлі та при встановленні	H = 15 м
Кт 1.2 <i>Очистка від грубих домішок</i>	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через фільтр грубої очистки	E = 90%
Кт 1.3 <i>Стиснення повітря</i>	Стиснене повітря Тиск, температура	Манометр, термометр	Після компресування	P = 0,35-0,5 МПа, t = 120-250°C
Кт 1.4 <i>Охолодження і видалення зайвої вологи</i>	Охоложене повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	t = 25-35°C, W = 60%
Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після нагрівання	t = 40-50°C, W = 50%
Кт 1.6 <i>Очищення у головному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через головний фільтр	E = 95%

Кт, Км 1.7 <i>Очищення в індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження через індивідуальний фільтр	E = 99,999%, КУО - 0
Кх, Км 2.1.1 <i>Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища в інокуляторах об'ємом 15, 120, 1250 л і 10 м³</i>	Розчин соляної кислоти	фізико-хімічний метод	визначення концентрації після приготування розчину	C = 6%
Кт, Кх, Км 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3, <i>Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду для підлучення середовища в інокуляторі об'ємом 15, 120, 1250 л</i>	Розчин натрію гідроксиду Тиск, час, концентрація, асептичність	Манометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, C = 6%, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 2.2.4 <i>Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду для підлучення середовища в інокуляторі об'ємом 10,0 м³</i>	Розчин натрію гідроксиду Тиск, час, концентрація, асептичність	Манометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °C τ = 40 хв, C = 6%, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 3.1 <i>Приготування і стерилізація запасного розчину молібдату натрію</i>	Запасний розчин молібдату натрію Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках (композиції А)</i>	Композиція А Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

Кт, Км 4.1.2 і 4.1.3 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках (композиції Б і В)</i>	Композиція Б і В Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1, 4.3.1, 4.4.1 <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ для інокулятора об'ємом 15, 120, 1250 л (композиція А)</i>	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	P = 0,05 МПа, t = 112 °С τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2, 4.3.2, 4.4.2 <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ для інокулятора об'ємом 15, 120, 1250 л (композиція Б)</i>	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °С τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.5.3 <i>Стерилізація композиції А і Б в УБС</i>	Композиція А і Б	Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	t = 131 °С τ = 5-7 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>Azotobacter vinelandii</i> АТСС 9046 температура, час, мікробіологічна чистота	Холодильник, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожні 3-4 місяці	t = 2 – 4 °С, τ = 3 – 4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 5.2 <i>Одержання робочої культури</i>	Робоча культура A. vinelandii ATCC 9046 на чашках Петрі температура, час, мікробіологічна чистота	Термостат, мікробіологічний контроль	Температура контролюється під час вирощування безперервно, а після вирощування – мікробіологічний контроль	t = 30 °C, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.3 <i>Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах</i>	Робоча культура A. vinelandii ATCC 9046 температура, час, температура, час, мікробіологічна чистота	Термостат, мікробіологічний контроль	Температура контролюється під час вирощування безперервно, а після вирощування – мікробіологічний контроль	t = 30 °C, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.4 <i>Вирощування інокуляту у колбах на качалках</i>	Посівний матеріал температура, час, частота обертів мішалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, спектрофотометр, мікробіологічний контроль	Температура і частота обертів контролюється під час вирощування безперервно, а після вирощування – мікробіологічний контроль та визначення концентрації біомаси	t = 30 °C, τ = 33 год, n = 200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.5, 5.6, 5.7 <i>Вирощування інокуляту у посівних апаратах об'ємом 15, 120 і 1250 л</i>	Посівний матеріал температура, час, рН, частота обертів мішалки, частота розчиненого кисню, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Датчик температури, рО ₂ і рН, годинник, тахометр, ротаметр, спектрофотометр, мікробіологічний контроль	Температура, рН, концентрація кисню і частота обертів мішалки контролюється під час вирощування продуцента безперервно, а після вирощування – мікробіологічний контроль (також кожні 4 год) та визначення концентрації біомаси	t = 30 °C, τ = 33 год, рН = 7,0, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.1 <i>Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10,0 м³</i>	Культуральна рідина температура, час, рН, частота обертів мішалки, частота розчиненого кисню, концентрація біомаси і концентрація альгінату, мікробіологічна чистота	Датчик температури, рО ₂ і рН, годинник, тахометр, ротаметр, центрифуга, спектрофотометр, мікробіологічний контроль	Температура, рН, концентрація кисню і частота обертів мішалки контролюється під час вирощування продуцента безперервно, а після вирощування і кожні 4 год – мікробіологічний контроль та визначення концентрації біомаси	t = 30 °C, τ = 65 год рН = 7,0 n = 700 об/хв, Са = 3,3 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

Перелік літератури:

1. Díaz-Barrera A., Sanchez-Rosales F., Padilla-Córdova C., Andler R., Peña C. Molecular weight and guluronic/mannuronic ratio of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* at two bioreactor scales under diazotrophic conditions. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2021, 44(6):1275-1287. doi: 10.1007/s00449-021-02532-8.
2. Saji S., Hebden A., Goswami P., Du Ch. A Brief Review on the Development of Alginate Extraction Process and Its Sustainability. *Sustainability* 2022, 14(9), 5181; <https://doi.org/10.3390/su14095181>.
3. Hurtado A., Aljabali A. A. A., Mishra V., Tambuwala M. M., Serrano-Aroca Á. Alginate: Enhancement Strategies for Advanced Applications. *Int J Mol Sci*. 2022, 23(9):4486. doi: 10.3390/ijms23094486.
4. Urtuvia V., Maturana N., Acevedo F., Peña C., Díaz-Barrer A. Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017, 33(11):198. doi: 10.1007/s11274-017-2363-x.
5. Zhang S., Dong J., Pan R.e, Xu Z., Li M., Zang R. Structures, Properties, and Bioengineering Applications of Alginates and Hyaluronic Acid. *Polymers* 2023, 15(9), 2149; <https://doi.org/10.3390/polym15092149>
6. Hay I.D., Rehman Z.U., Moradali M.F. et al. Microbial alginate production, modification and its applications // *Microb. Biotechnol.* – 2013. – V.6, N 6. – P. 637–650.
7. Abdasalizadeh F., Moghaddam S.V., Alizadeh E. et al. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting // *Microbiology.* – 2020. – V 14. – P. 8 – 30.
8. Gomez C.G., Pérez Lambrecht M.V., Lozano J.E. Influence of the extraction–purification conditions on final properties of alginates obtained from

- brown algae (*Macrocystis pyrifera*) // Journal of Biological Engineering. – 2009. – V. 44, N 4. – P. 365 – 371.
9. Galindo E., Peña C., Núñez C., et al. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* // Microb. Cell. Fact. – 2007. – V. 6, N 7. – P. 168–180.
10. Справочник по гидроколлоидам / Г.О. Филлипс, П.А. Вильямс (ред.) Перевод с англ. под ред. А.А. Кочетковой и Л.А. Сарафановой. – СПб: ГИ-ОРД, 2006. – 536 с.
11. Pacheco-Leyva I., Pezoa F.G., Diaz-Barrera A. Alginate Biosynthesis *Azotobacter vinelandii*: Overview of Molecular Mechanism in Connection with the Oxygen Availability // International Journal of Polymer Science , 2016. – V.2016. – 12 p. - <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2062360>
12. Логинов Я. О. Биосинтез и свойства *Azotobacter vinelandii* ИБ 1: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. – Щелково, 2011. – 147 с.
13. García A. , Castillo T., Ramos D., Ahumada-Manuel C. L., Núñez C. , Galindo E., Büchs J., Peña C. Molecular weight and viscosifying power of alginates produced by mutant strains of *Azotobacter vinelandii* under microaerophilic conditions. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2020, 20:26:e00436. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00436
14. Sadoff H.L. Encysment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological reviews*. 1975, 39(4): 516-539. doi: 10.1128/br.39.4.516-539.1975
15. Pena C., Reyes C., Larralde-Corona P., Corkidi G., Galindo E. Characterization of *Azotobacter vinelandii* aggregation in submerged culture by digital image analysis. *FEMS Microbiology letters*. 2002, 207: 173-177. doi: 10.1016/s0378-1097(01)00572-9.
16. Noar J.D., Bruno-Barcena J.M. *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology*. 2018, 164: 421-436. doi: 10.1099/mic.0.000643.

17. *Azotobacter vinelandii* [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://archive.org/details/CMPUIJ434-macro>
18. Diaz-Barrera A., Soto E. Biotechnological uses of *Azotobacter vinelandii*: Current state, limits and prospects. *African journal of biotechnology*. 2010, 9(33): 5240-5250.
19. Mahdi S., Mukhtar H., Bashir H., Nawaz A. Optimization of growth conditions for *Azotobacter* species and their use as biofertilizer. *J Bacteriol Mycol Open Access*. 2018, 6(5): 274-278. doi: 10.15406/jbmoa.2018.06.00217.
20. Gomez-Pazarin K., Flores C., Castillo T., Buchs J., Galindo E., Pena C. Molecular weight and viscosifying power of alginates produced in *Azotobacter vinelandii* cultures in shake flasks under low power input. *J Chem Technol Biotechnol*. 2015, 91(5): 1485-1492. doi: 10.1002/jctb.4747.
21. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. Київ, НУХТ. 2010. С. 327.
22. He L., Shang Z., Liu H., Yuan Z.X. Alginate-Based Platforms for Cancer-Targeted Drug Delivery. *Biomed. Res. Int*. 2020, 2020, 1487259.
23. Shen H., Li F., Wang D., Yang Z., Yao C., Ye Y., Wang X. Chitosan-alginate BSA-gel-capsules for local chemotherapy against drug-resistant breast cancer. *Drug Des. Dev. Ther*. 2018, 12, 921–934.
24. Mollah M. Z. I., Zahid H. M., Z Mahal., Faruque M.R. I., Khandaker M. U. The Usages and Potential Uses of Alginate for Healthcare Applications. *Front. Mol. Biosci.*, 2021, Volume 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.719972>.
25. Alginate Market Size, Share, and Trends 2024 to 2034. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.precedenceresearch.com/alginate-market>
26. Інструкція на Гавіскон таблетки. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tabletki.ua/%D0%93%D0%B0%D0%B2%D0%B8%D1%81%D0%BA%D0%BE%D0%BD-%D0%BA%D0%BB%D1%83%D0%B1%D0%BD%D0%B8%D1%87%D0%BD%D1%8B%D0%B5/8219/>

27. Державний реєстр лікарських засобів України. Альгінат натрію. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=%E0%EВ%FC%E3%B3%ED%E0%F2>
28. Гастрит. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/tutorials-uk/vnutrishnya-meditsina/4-rozdil-zakhvoriuvannia-orhaniv-travlennia/4-02-hronichnij-gastrit/?srsltid=AfmBOoqQgXbDBLpSc2KyXb5PfOivBXabdkZL5cSAkGznJrRtRUrQMmL>
29. Чисельність населення України [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.ukrstat.gov.ua/>
30. Чисельність дітей та молоді в Україні [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://inmol.org/chyselnist-ditej-ta-molodi-v-ukraini/>
31. GLYCOLYSIS. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00010>
32. PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00030>
33. Histidine metabolism [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00340>
34. CITRATE CYCLE (TCA CYCLE) [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00020>
35. ALANINE, ASPARTATE AND GLUTAMATE METABOLISM [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00250>
36. GLYCINE, SERINE AND THREONINE METABOLISM [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00260>
37. CYSTEINE AND METHIONINE METABOLISM [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00270>
38. VALINE, LEUCINE AND ISOLEUCINE BIOSYNTHESIS. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00290>

39. LYSINE BIOSYNTHESIS. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00300>
40. ARGININE AND PROLINE METABOLISM. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00330>
41. ARGININE AND PROLINE METABOLISM. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00330>
42. PHENYLALANINE, TYROSINE AND TRYPTOPHAN BIOSYNTHESIS [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00400>
43. PURINE METABOLISM [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00230>
44. PYRIMIDINE METABOLISM [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00240>
45. AMINO SUGAR AND NUCLEOTIDE SUGAR METABOLISM. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00520>
46. PEPTIDOGLYCAN BIOSYNTHESIS [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00550>
47. GLYCEROPHOSPHOLIPID METABOLISM. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/avn00564>
48. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
49. Bandyopadhyay, S., Naik S. G., O'Carroll I. P., et al. Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an Obligate Aerobe Specialized To Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes // *Journal of Bacteriology*. – 2009. – V. 195. – P. 305 – 421.
50. *Azotobacter vinelandii* [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://archive.org/details/CMPUJ434-macro>
51. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.

52. Засіб мийний HC-CL 45. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://klineko.com.ua/shhelochnye-sredstva/hc-cl-45/>
53. Мийний засіб PUR-265 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://coagulant.com.ua/catalog/pur-265/>
54. Дезінфікуючий засіб МАКСИСАН [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/maksisan-unvcpd>
55. Бациліквід Стерил [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.danamedikal.com/bazilikvidsteril>
56. Шахта вентиляційна D 630 [Електронний ресурс] – режим доступу: https://ukrferma.com.ua/shakhta-ventyliatsiina-d-630-mm-220-v-z-servopryvodom/?gad_source=1&gclid=Cj0KCQiAsOq6BhDuARIsAGQ4-zhEhD-D7Ygrq0ZRGjyL0fl9ZFEHYXEI_dtmLG8DTP6x0tf9M5sMJwsaAjDCEALw_wcB
57. Касетний фільтр Вентс ФБ 400x200 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://vents-shop.com.ua/kasetniy-fltr-vents-fb-400-200-uk/>
58. Гвинтовий компресор CORMAK THEOR 30 -10 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kma.ua/uk/invertorni/4751-gvintovij-kompresor-z-invertorom-cormak-theor-30-10.html>
59. DAIKIN FDXM35F3/RXS35L3 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://daikin-market.kiev.ua/ua/t5467-daikin-fdxm35f3-rxs35l3.html>
60. Ресивер Повітряний Лідер 2700 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tusk.ua/product/resiver-vozdushnyij-lider-10-bar-2700-l-rv2700120001-dlya-kompressora/>
61. Фільтр повітряний панельний гофрований Aerofilter ФВП-Г (G4) 500x250 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://moystroy.com.ua/%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%80/filtr-povitryanyj-panelnyj-gofrovanyj-aerofilter-fvp-g-g4-500h250/>

62. Реактор-змішувач BSF-5L [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/stainless-steel-reactor/5l-double-layer-stainless-steel-reactor.html>
63. Інокулятор BLBIO-XGJG-2-A-15. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://blanc-labo.fr/wp-content/uploads/2017/11/CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016.pdf>
64. індивідуальний фільтр Фільтр ФяС-U. E(*)006.1П. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://folter.com.ua/catalog/fyasu15u16>.
65. Дозатор ваговий ВД-1Н 30 кг [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://abctech.com.ua/ua/p1187721211-vesovoj-dozator-dlya.html>
66. Насос відцентровий LEO 3.0 AJDm75/4H [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://sigma.ua/buy/nasos-tsentrobezhnuy-s-vneshnim-ezhektorom-leo-3-0-0-75kvt-hsmax-35m-hmax-50m-qmax-35l-min-775338/>
67. Реактор-змішувач LEXSR-100L [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ru.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/100l-150l-200l-300l-industrial-explosion-proof-jacketed-stainless-steel-reactor>
68. Інокулятор 120. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://prolitech.com.ua/emkost-fermentatsionnaya-fd-12b-120-l/?srsltid=AfmBOor7I7qoP3IpSDyIaP3Xz1PHYPdFQPcz5FZgRiS8wOqL1o7I2e-f>
69. Реактор-змішувач 1000 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://perryvidex.eu/ru/product/1000-ltr-atmo-bar-int-2-bar-jkt-0-75-agit-11245-01>
70. Реактор-змішувач РА-15 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://wise-master.com/znizhki/reaktor-laboratornij-15-l-zagalnij-obyem>
71. Інокулятор 1250. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-fermentator-1500-l-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rastenij/>
72. Реактор-змішувач 7000 л. [Електронний ресурс] – режим доступу:

- https://www.behaelter-kg.de/en/catalog/product/view/_ignore_category/1/id/292118/s/7000-liter-tank-aisi-304-9538-2/
73. Ферментер 10 м³. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://sales.tsbgalcontract.org.ua/auction/CSE001-UA-20240301-00414/>
74. Насос відцентровий LEO 3.0 2ACm150. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://sigma.ua/buy/nasos-tsentrobezchnyy-1-5kvt-hmax-57-5m-qmax-160l-min-leo-3-0-775295/>
75. Патент US 10,889,657 B2. ALGINATE EXTRACTION METHOD [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://wp-boomtime.s3.amazonaws.com/peacockmyerspc/patents/US10889657.pdf>
76. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
77. Noar J.D., Bruno-Barcena J.M. *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology*. 2018, 164: 421-436. doi: 10.1099/mic.0.000643.
78. Mahdi S., Mukhtar H., Bashir H., Nawaz A. Optimization of growth conditions for *Azotobacter* species and their use as biofertilizer. *J Bacteriol Mycol Open Access*. 2018, 6(5): 274-278. doi: 10.15406/jbmoa.2018.06.00217.
79. Steiner F., Paul C., Dong M. HPLC autosamplers: Perspectives, principles, and practices. *LCGC North America*. 2019, 37 (8): 514 - 529.
80. Zhuang N., Ma J., Yang L., Xue R., Qian X., Chen M., Jiang M. Rapid determination of sucrose and glucose in microbial fermentation and fruit juice samples using engineered multi-enzyme biosensing microchip. *Microchemical Journal*. 2021, 164, 106075. doi: 10.1016/j.microc.2021.106075.

ДОДАТКИ

Додаток 1

