

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

«До захисту в ЕК»
Декан факультету
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

«__» червня 2024 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

«__» червня 2024 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: «Одержання полігидроксиалканоатів культивуванням *Cupriavidus necator*»

Виконав: здобувач(ка) 4 курсу, групи 1

ЗЮЗЬКО Олена Леонідівна
(ПРІЗВИЩЕ, Ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СТАБНІКОВ Віктор Петрович
(ПРІЗВИЩЕ, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент _____
(ПРІЗВИЩЕ Ім'я)

(підпис)

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

Здобувач(ка) _____
(підпис)

Олена ЗЮЗЬКО

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра Біотехнології та 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 та мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2024 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ЗЮЗЬКО Олени Леонідівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Одержання полігидроксиалканоатів культивуванням *Cupriavidus necator*»

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

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 29.03.2024 року № № 238-кс

2. Строк подання здобувачем роботи _____

2. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Cupriavidus necator*; цільовий продукт: полігидроксибутират; геометричний об'єм ферментера: 20м³; коефіцієнт заповнення: 0,55.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ, характеристика цільового продукту, обибір біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування, біосинтез цільового продукту, обґрунтування технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва та охорона

5. Перелік графічного матеріалу

Лист 1. Технологічна схема, формат аркушу А1

Лист 2 Апаратурна схема, формат аркушу А1

6. Консультанти розділів роботи

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

6. Дата видачі завдання 01.03.2024

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	ВСТУП	29.03.2024	виконано
2	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	29.03.2024-30.03.2024	виконано
3	РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	01.04.2024-06.04.2024	виконано
4	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	07.04.2024-12.04.2024	виконано
5	РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	13.04.2024-16.04.2024	виконано
6	РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	16.04.2024-23.04.2024	виконано
7	РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	24.04.2024-01.05.2024	виконано
8	РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	01.05.2024-10.05.2024	виконано
9	РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	11.05.2024-13.05.2024	виконано
10	РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	14.05.2024-20.05.2024	виконано
11	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	29.03.2024-23.05.2024	виконано
12	ГРАФІЧНИЙ МАТЕРІАЛ. АПАРАТУРНО-ТЕХНОЛОГІЧНА СХЕМА	01.05.2024-10.05.2024	виконано

Здобувач _____
(підпис)

Олена ЗЮЗЬКО
(Ім'я ПРІЗВИЩЕ)

Керівник роботи _____
(підпис)

Віктор СТАБНІКОВ
(Ім'я ПРІЗВИЩЕ)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена вибору біологічного агента для одержання внутрішньоклітинних полігідроксіалканоатів (ПГА) – полімерів, які здатні накопичуватися у клітинах мікроорганізмів та використовуються, для отримання біопластиків. Проаналізувавши літературні дані, було встановлено, що *Cupriavidus necator* АТСС 17697 здатний найкраще накопичувати внутрішньоклітинні ПГА. Існують різні модифікації даного біополімеру: 3-гідроксибутират (ЗНВ), 3-гідроксивалерат (ЗНУ), 3-гідроксигексаноат (ЗНН) тощо. У даній роботі описано біосинтез полігідроксибутирату.

Технологічна схема біосинтезу полігідроксибутирату включає допоміжні роботи (приготування та стерилізація запасного розчину мікроелементів, приготування титрувальних агентів, приготування та стерилізація поживних середовищ для вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу). Технологічний процес включає в себе 4 стадії вирощування посівного матеріалу (вирощування інокуляту в колбах на качалках, посівних апаратах об'ємом 20 л, 200 та 2 м³) та виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 20 м³.

Контроль виробництва складається з мікробіологічної та технологічної частини. Під час мікробіологічного контролю перевіряють поживні середовища на стерильність та слідкують за чистотою посівного матеріалу та культуральної рідини. Технологічний контроль включає перевірку концентрації вуглецю, азоту та визначення концентрації полігідроксибутирату.

Кваліфікаційну роботу було виконано згідно отриманого варіанту завдань. Робота складається з вступу, п'яти розділів, списку використаної літератури з 110 найменувань. Загальний обсяг роботи – 128 сторінок, 16 рисунків, 17 таблиць, 2 схеми.

Ключові слова: *Cupriavidus necator*, біопластик, внутрішньоклітинні полігідроалканоати, полігідроксибутират, фруктоза, відходи, знешкодження.

ABSTRACT

This diploma project is devoted to the selection of a biological agent for the production of intracellular polyhydroxyalkanoates (PHAs), polymers that can accumulate in microbial cells and are used to produce bioplastics. After analyzing the literature data, it was found that *Cupriavidus necator* ATCC 17697 is the best able to accumulate intracellular PGAs. There are various modifications of this biopolymer: 3-hydroxybutyrate (3HB), 3-hydroxyvalerate (3HV), 3-hydroxyhexanoate (3HH), etc. This paper describes the biosynthesis of polyhydroxybutyrate.

The technological scheme of polyhydroxybutyrate biosynthesis includes auxiliary works (preparation and sterilization of a reserve solution of trace elements, preparation of titration agents, preparation and sterilization of culture media for inoculum cultivation and production biosynthesis). The technological process includes 4 stages of inoculum cultivation (inoculum cultivation in flasks on rockers, inoculum apparatus of 20 l, 200 and 2 m³) and production biosynthesis in a 20 m³ fermenter.

Production control consists of a microbiological and a technological part. During microbiological control, the culture medium is checked for sterility and the purity of the seed and culture liquid is monitored. Technological control includes checking the concentration of carbon and nitrogen and determining the concentration of polyhydroxybutyrate.

This diploma project was completed in accordance with the assignment. The work consists of an introduction, five chapters, and a bibliography of 110 titles. The total volume of the work is 128 pages, 16 figures, 17 tables, 2 diagrams.

Keywords: *Cupriavidus necator*, bioplastic, intracellular polyhydroalkanoates, polyhydroxybutyrate, fructose, waste, disposal.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	18
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	18
2.2 Перевірочний розрахунок складу поживного середовища.....	26
2.3. Морфолого-культуральні ознаки.....	29
2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	32
2.5. Таксономічний статус біологічного агента.....	32
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	33
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	33
3.2 Розрахунок потужності виробництва.....	35
3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.....	35
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу полігидроксибутирату.....	36
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	41
4.1 Шлях катаболізму ростового субстрату.....	41
4.2 Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	43
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	46
5.1 Обґрунтування способу культивування та типу ферментера.....	46
5.2 Особливості підготовки аераційного повітря.....	47
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	48
5.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища.....	57
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	65
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	72
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	87
8.1. Мікробіологічний контроль.....	87
8.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища.....	87
8.1.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури.....	87
8.2. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю... ..	89
8.2.1. Визначення концентрації джерела вуглецю.....	89
8.2.2. Визначення концентрації джерела азоту.....	91
8.3. Концентрація цільового продукту.....	91

<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>				
Змн.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата
		<i>Зюзько О.Л.</i>		
		<i>Стабніков В.П.</i>		
		<i>Н. Контр.</i>		
		<i>Затв. Стабніков В.П.</i>		
ЗМІСТ			Літера	Арк
			6	127
				Кафедра БТМ ⁶

8.4. Карта постадійного контролю.....	92
РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	104
9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва полігідроксибутирату на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	104
9.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	106
9.3. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....	107
9.4. Система знешкодження та утилізації газоподібних відходів.....	113
9.5. Система знешкодження твердих відходів.....	113
9.6. Система екологізації виробництва методи щодо зменшення кількості відходів.....	113
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	115

ВСТУП

Швидкий технологічний прогрес, щорічне збільшення чисельності населення та необдумане поводження з ресурсами планети, призвело до появи нових екологічних проблем.

Сьогодні неможливо уявити сучасний світ без пластику. Цей матеріал продовжує активно входити у наше життя через дешевизну та фізико-хімічні характеристики [1].

У 2018 році у світі було вироблено понад 359 мільйонів тонн пластику. У США використовується близько 34,5 млн тонн пластику, а на переробку іде лише 8%. Прогнозують щорічне зростання виробництва пластику на 6,5% наступні 5 років [2].

У період з 2021 – 2023 статистика продовжує погіршуватися, адже за даними науковців на кожну людину припадає додатковий 1 кілограм пластику, це зумовлено підвищеним попитом на пакувальні матеріали, зокрема плівки та пакети [3].

Основна проблема хімічних пластмас, які виробляються на нафтохімічній основі – стійкість до високих та низьких температур, ультрафіолетового випромінювання, хімічних розчинників та тиску [4].

Пластмаси з часом руйнуються і при цьому розпадаються на безліч дрібних фрагментів. Найбільше страждає океан, адже 12 млн тонн пластику туди потрапляє, у 90% водних птахів, у шлунку є пластик. Мешканці прибережних районів щоранку прибирають пляжі від тон сміття. Сучасні дослідження показують, що у третині риби, яку виловлюють у Великій Британії, міститься пластик, який потрапляє в організм людини, при споживанні такої риби [5].

Дослідники почали зосереджувати свою увагу на біополімерах (полінуклеотиди, полісахариди, поліфосфати, поліаміди, поліоксоефіри, поліфеноли). Проте, найбільшій увазі заслуговують полігідроксіалканоати. Вони

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розраб</i>		<i>Зюзько О.Л.</i>			ВСТУП	<i>Літера</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Пров</i>		<i>Стабніков В.П.</i>					8	127
<i>Н. Контр.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затв.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>				8		

мають такі ж фізико-хімічні характеристики як хімічні пластмаси, але через своє біологічне походження здатні до розкладання, як в ґрунті так і у воді, в присутності кисню чи без.

Тому пошук альтернативи нафтохімічним пластмасам, які є шкідливими не лише при виготовленні, а й при утилізації є актуальною проблемою біотехнології. В останні роки науковці зосередили увагу на відкритті біорозкладних полімерів, переважно на полігідроксіалканоатах (РНА), їх похідних та співполімерах [6].

Починаючи з 1 січня 2022 року, на території України почала діяти заборона на розповсюдження пластикових пакетів. Законодавством заборонено розповсюджувати в магазинах та об'єктах ресторанного господарства поліетиленові пакети товщиною 50 мкм [3].

На жаль, в Україні виробництво полігідроалканоатів не реалізовано, а екологічні проблеми поглиблюються. Тому можна реалізувати пробне виробництво, щоб зробити поступовий перехід до біорозкладних матеріалів.

Актуальність зумовлена невинним поширенням пластикових відходів на території нашої країни, які не розкладаються, а лише накопичуються. Більшість відходів складають поліетиленові пакети, пакування для продуктів харчування та пластикові пляшки, тому необхідно замінити якусь частину цих матеріалів на біорозкладні.

Новизна роботи. Штам *Cupriavidus necator* ATCC 17697 здатний запасати понад 90% ПГБ у вигляді гранул та накопичувати 9,9 г/л полігідроксипутирату при рості на фруктозі. Ця концентрація є досить високою, тому даний штам перспективно використовувати для промислового виробництва біопластиків.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ

Біопластики – це полімери, які здатні розкладатися грибами, бактеріями й водоростями та утворені повністю з відновлювальних природніх речовин, розкладання яких є менш шкідливим, ніж розкладання нафтохімічних пластмас. Одним з перспективних видів біопластику є полігидроксіалканоат, який має біологічне походження й розкладається мікроорганізмами [7].

Полігидроксіалканоати (РНА) – клас полімерів, які накопичуються в клітинах різних мікроорганізмів, архей, бактерій, як грам-позитивних як і грам-негативних (рис. 1.1), вперше РНА були виявлені у формі полі(3-гідроксибутирату) (РНВ) Лемуаньом у 1925 році, у бактерій *Bacillus megaterium*. Найбільш важливими виробниками РНА є *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas oleovorans* або *Pseudomonas putida* [8,9].

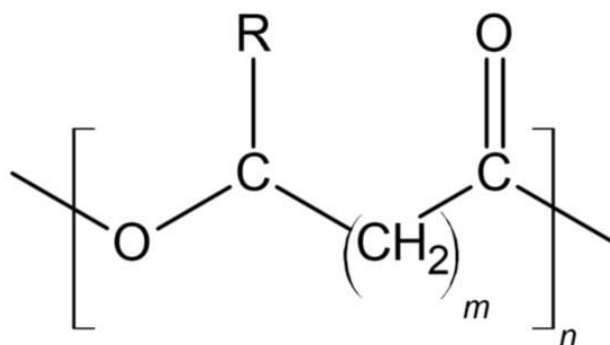


Рис. 1.1. Загальна структура полігидроксіалканоати (РНА) [10]

У формулі, зображеній на (рис 1.1), група R – алкільна група, від якої й залежить назва та властивості біополімеру. Наприклад, якщо група R представлена метилом (CH₃), то полімер називатиметься полі(3-гідроксибутират), якщо R буде (C₄H₉), то полімер буде мати назву полі(3-гідроксигептаноат) тощо. Тому хімічна структура та застосування РНА залежать від складу та розміру замісників бічного ланцюга [11].

Взагалі ідентифіковано 150 різних структур РНА, які зазвичай

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>					
Змн.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата						
Розраб		Зюзько О.Л.			РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ					
Пров		Стабніков В.П.						Літера	Арк	Аркушів
									10	128
Н. Контр.								10		
Затв.		Стабніков В.П.						<i>Кафедра БТМ</i>		

класифікують на три категорії, залежно від кількості атомів вуглецю, які складають мономерну одиницю. scl-РНА (рис. 1.2) – це короткі ланцюги, котрі містять 3-5 атомів карбону та продукуються *Azohydromonaslata* і *Cupriavidus necator*, друга група mcl-РНА – середні ланцюги, які складаються з 6-14 атомів вуглецю та продукуються *Pseudomonas mendocina* і *Pseudomonas putida*, третя група lcl-РНА – довгі ланцюги, які містять більше 15 атомів вуглецю та продукуються *Aureispira marina* та *Shewanella oneidensis*. Від довжини ланцюга залежать фізико-хімічні властивості полігідроксіалканоатів [12].

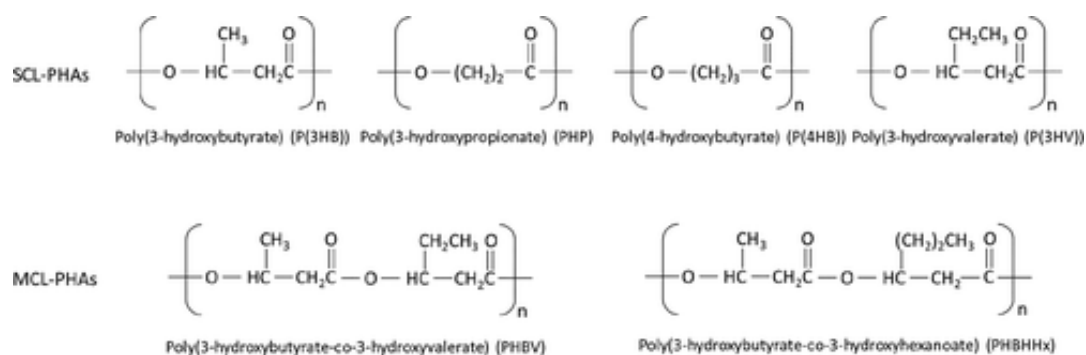


Рис. 1.2. Зображення біополімерів з коротким (scl-РНА) та середнім (mcl-РНА) ланцюгом [13]

scl-РНА – жорсткий та крихкий полімер, який через свою кристалічну будову важко піддається обробці. Використовується для виробництва пакувальних матеріалів для продуктів харчування а та для виготовлення одноразових предметів. Також властивості scl-РНА покращують, шляхом включення до полімеру 3-гідроксивалерату, що призводить до утворення сополімеру полі-3-гідроксибутирату-3-гідроксивалерату. Утворений сополімер характеризується більшою міцністю, гнучкістю та краще піддається термічній обробці. mcl-РНА – це кристалічний полімер середньої довжини, які за природою є еластомерами, тому відрізняються властивостями від scl-РНА. РНА середньої довжини характеризуються більшою гнучкістю, вони є менш кристалічними та мають нижчу температуру плавлення, яка складає 42-65 °С. Якщо температура буде перевищена, то полімери стають аморфними та липкими [14]. mcl-РНА

використовують для виробництва хірургічних ниток, імплантів, виробництва ліків тощо [15,16].

До scl-PHA належать такі мономери, як 3-гідроксибутират (ЗНВ) або 3-гідроксивалерат (ЗНУ), до mcl-PHA мономери 3-гідроксигексаноат (ЗНН), 3-гідроксіоктаноат (ЗНО), 3-гідроксидеканоат (ЗНД) або 3-гідроксидодеканоат (ЗННД) [17]. Залежно від довжини ланцюга різняться властивості PHA. Зокрема, температура плавлення: scl-PHA=179°C, mcl-PHA=80°C, PHB-ко-PHV=137-170°C [18].

Ключовими ферментами, які забезпечують полімеризацію PHA з використанням (R)-3-гідроксиацил-КоА як субстрату є PHA-синтази. Залежно від субстратної специфічності, складу субодиниць і послідовності амінокислот вони поділяються на 4 групи (рис. 1.3). PHA-синтази, які полімеризують scl-PHA належать до I, III IV групи, mcl-PHA полімеризують синтази II групи. PHA-синтази I (знайдені у *C. necator*) і II групи (знайдені у *Pseudomonas*) містять одну субодиницю PhaC, а синтази III (має субодиниці PhaC і PhaE) і IV (має субодиниці PhaC і PhaR) груп складаються з двох субодиниць. Синтази III класу навні в *Allochromatium vinosum*, а синтази IV класу – в *Bacillus megaterium* [19].





Class	Subunits	Species	Substrate
I	 ~60-73 kDa	<i>Ralstonia eutropha</i>	3HA _{acetyl} -CoA (-C3-C5) 4HA _{acetyl} -CoA 5HA _{acetyl} -CoA, 3MA _{acetyl} -CoA
II	 ~60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3HA _{acetyl} -CoA (-C5)
III	 ~40 kDa ~40 kDa	<i>Allochromatium vinosum</i>	3HA _{acetyl} -CoA (3HA _{acetyl} -CoA [-C6-C8], 4HA-CoA, 5HA-CoA)
IV	 ~40 kDa ~22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA _{acetyl} -CoA

Рис.1.3. Основні класи PHA-синтаз [19]

Утворення PHA відбувається в три етапи, вихідною речовиною для біосинтезу є ацетил-КоА. На першому етапі за допомогою ферменту ацетил-

КоА-ацетилтрансферази відбувається конденсація двох молекул ацетил-КоА, після чого утворюється сполука ацетоацетил-КоА, яка відновлюється до (R)-3-гідроксибутирилу-КоА за допомогою ацетоацетил-КоА-редуктази. Третя реакція є ключовою, адже під час неї під дією РНА-синтази відбувається полімеризація (R)-3-гідроксибутирилу-КоА до РНА. На схемі (рис. 1.4) відображені описані реакції [20].

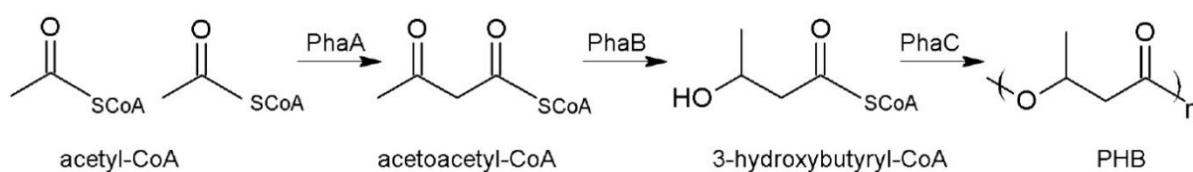


Рис. 1.4. Схема біосинтезу полігідроксіалканоату (РНА) [20]

Бактерії накопичують РНА у формі внутрішньоклітинних гранул, для запасів енергії та вуглецю, який виступає альтернативним джерелом жирних кислот, котрі метаболізуються в стресових умовах. Процес накопичування відбувається лише тоді, коли вуглець є в надлишку, а поживна речовина, котра потрібна для росту, присутня в середовищі культивування в обмеженій кількості. До таких речовин належать N, O, P, S або Mg [12]. Проте є й штами бактерій, які синтезують РНА, навіть тоді, коли речовина, яка забезпечує ріст не перебуває в нестачі [21]. Якщо вихідна сполука для отримання РНА буде містити багато вуглецю, то як виробника біопластмас візьмуть *Alcaligenes latus* або *Paracoccus denitrificans*, а якщо у середовищі буде не вистачати N, O, P тощо, то візьмуть мікроорганізм, який буде синтезувати РНА при нестачі всіх потрібних речовин для росту, наприклад *Cupriavidus necator* [22].

РНА, полімолочна кислота і полібутиленсукцинат є «зеленими» полімерами майбутнього, які з часом замінять синтетичні пластики [22].

Найпоширенішими відновлювальними матеріалами для виробництва біопластиків є крохмаль, сироватковий білок, целюлоза, пектин, соєвий білок, желатин, хітин, колаген та рослинні олії [23]. РНА є альтернативою традиційним пластмасам, адже вони також є термостабільними, мають подібні фізико-хімічні

властивості з пластмасами синтетичного походження та здатні розкладатися мікроорганізмами. Більш того, полігидроксіалканоати отримують шляхом мікробної ферментації з відновлювальних джерел вуглецю, переважно з цукру, олії та газів, на відміну від синтетичних полімерів, які отримують з викопного палива [8].

Полігидроксіалканоати – це унікальне вирішення екологічних проблем, зокрема, проблеми непереробних відходів. РНА широко використовуються в медицині, сільському господарстві, харчовій та фармацевтичній промисловості, завдяки своїй термостійкості, механічним та фізико-хімічним властивостям, а також за рахунок здатності до біологічного розкладання [16]. Мікроорганізми розкладають РНА за рахунок синтезу РНА-гідролаз та РНА-деполімераз. При потраплянні в ґрунт, повне розкладання РНА на воду і вуглекислий газ відбувається протягом семи місяців [24]. Швидкість деградації РНВ в анаеробних стічних водах складає до кількох місяців, а в морській воді кілька років. На ілюстрації (*рис.1.5*) відображено розклад пляшки, яка створена з природного кополімеру полі(3-гідроксибутирату-3-гідроксивалеріату) у стічних водах в аеробних умовах, розклад відбувався при температурі 20 °С, зразки фотографували на 1, 2, 4, 6, 8 та 10 тижні, якщо дивитися зліва направо.

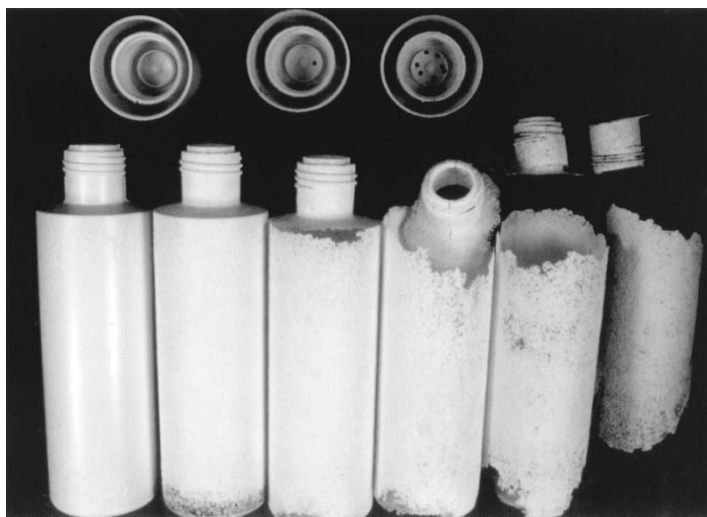


Рис 1.5. Деградація пляшки з РНВ-3ГВ у стічних водах в аеробних умовах при 20°С [25]

Не зважаючи на перевагу біопластиків, не можна повністю замінити синтетичні пластмаси, котрі шкодять навколишньому середовищу. Тому що

широке поширення РНА все ще не можливе через високу собівартість їх виробництва, що призводить до більшої вартості продукції виготовленої з біопластику, порівняно з синтетичними формами. Встановлено, що вартість РНА перевищує в 3-4 рази вартість синтетичних форм пластмас.

Вартість зумовлена тим, що для виробництва біопластику використовують субстрати високої чистоти, зокрема, глюкозу, виробництво відбувається в режимі періодичного культивування з певною періодичністю та постійним підживленням, також потрібна велика кількість розчинників та роботи персоналу для подальшої обробки отриманих сполук. Науковці вже почали працювати над методами зниження собівартості РНА, що призведе до підвищення попиту на цей біополімер на біомедичному ринку, при виробництві пакувальних матеріалів тощо [15].

Низька токсичність, імунотолерантність та здатність до біорозкладання, зумовлюють різні сфери використання РНА.

РНА в сільському господарстві: біорозкладні пластики застосовують для мульчування (покриття поверхні ґрунту для захисту його від перегрівання та пересихання) ґрунту, час на який вистачить плівки, залежить від кліматичних умов та кількості урожаю. Бактерії, які виробляють РНА, застосовують як стимулятори росту рослин, адже вони здатні протистояти стресовим умовам, зокрема нестача вуглецю, коливання вологості та температури [11].

РНА в медицині: в медичних цілях переважно використовують гомополімер РНВ та кополімер РНВ-ко-РНУ. У наш час з цих біополімерів виготовляють серцеві клапани, судинні трансплантанти. Широко використовуються в фармацевтичній галузі, зокрема при виготовленні капсульних оболонок, мікроносіїв для протипухлинної терапії. Також біополімери застосовують для виготовлення шовних ниток, операційних тампонів. Новим напрямком є створення кісткових пластин та спинномозкових тканин з РНА [18].

РНА в пакуванні: основна частина всього виробленого біопластику припадає на виготовлення упаковок ($\approx 40\%$, 1,6 млн тонн). РНА використовують

для виробництва упаковок для харчових продуктів і напоїв, через газову непроникність біопластику. Також вироби з біопластику широко використовують в автомобільній промисловості, у виробках домашнього побуту, в будівельній галузі тощо [11].

На сьогоднішній день понад 25 світу займаються виготовленням біопластиків. Нижче представлено кілька компаній, які займаються виробництвом РНВ, кополімерів та поліефірів.

Genecis Bioindustries – канадська компанія, яка розташована в Онтаріо та є однією з найновітніших компаній, яка виробляє кополімери РНВ-3ГВ. Для виробництва беруть органічні відходи, які кислотогенні бактеріальні колонії використовують для виробництва жирних кислот, які в свою чергу перетворюють на кополімер РНА. Виробництво відбувається у великому пілотному реакторі, пластик вилучають з клітин хімічним шляхом. З 2021 року компанія на нову заводі планувала щотижня перетворювати 3 тони пластику на РНВ-3ГВ. Виготовлений пластик застосовують для виробництва упаковок харчових продуктів, кавових стіків, ниток для 3Д-друку [26].

Bluepha – китайська компанія, яка має гасло: «пластик має бути від природи і повертатися до природи». Компанія займається виробництвом кополіефірів, використовуючи рекомбінантний штам бактерії *C.necator*. Обсяг виробництва – 1000 т/р [27]. Компанія використовує альтернативні джерела вуглецю (кухонні відходи, сільськогосподарські культури тощо) як субстрати, вирощування відбувається у морській воді (рис. 1.6). Поліефіри виготовлені компанією, легко розкладаються як у воді так і ґрунті, протягом 3–6 місяців. Виготовлений пластик застосовують для виробництва текстилю, гранул для акваріуму, полімерних плівок та фарб для 3Д-друку [28].

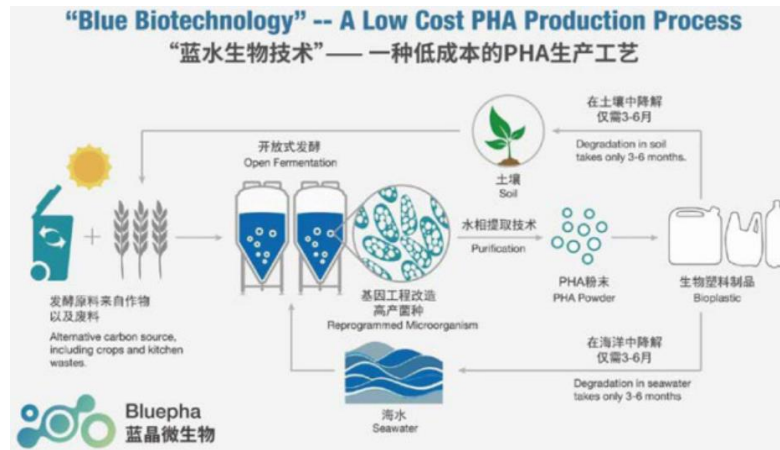


Рис. 1.6. Схема виробництва РНА компанією Bluepha [29]

Biomer – німецька компанія (м. Швальбах), стала однією з перших, яка почала виробляти РНВ за допомогою штаму *Azohydromonas australica* (раніше *Alcaligenes latus*) на сахарозі. Розробники довели, що *A. australica* швидко накопичувала РНА та утворювала каталітично активну біомасу, проте у 90-х роках минулого століття ця технологія не набула широкого поширення, через низьку конкурентоспроможність, яка була пов’язана з низькими цінами на сирю нафту, з якої виготовляли штучні пластмаси [29].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

У наш час все більшою проблемою стає накопичення синтетичного пластику, який не розкладається, тому науковці почали досліджувати біорозкладні пластики. Найкращим вирішенням даної проблеми стало використання полігидроксіалканоатів (РНА), адже окрім біорозкладання вони володіють схожими властивостями із синтетичними пластиками [11].

Всього виділено понад 300 видів гетеротрофних грамнегативних та грампозитивних мікроорганізмів, які здатні накопичувати РНА, наприклад *Methylobacterium* sp., *C. necator*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *A. beijerinckii*, *A. vinelandii*, *A. macrocytogenes* і *P. extorquens* тощо. Здатність найкраще накопичувати РНА спостерігається в бактерій *Halomonas*, *R. eutropha* (*C. necator*), *E. coli* та *Pseudomonas* [30,31].

Для того, щоб підібрати поживне середовище для виробництва цільового продукту, необхідно розібратися з умовами утворення ПГА.

Як відомо накопичення ПГА відбувається як результат впливу стресових факторів на мікроорганізм, зокрема, обмеження азоту, фосфору або ж кисню [24].

Також важливу роль у накопиченні ПГА відіграє концентрація та походження джерела вуглецю, доступність поживних речовин, температура та рН.

Субстрат. Від субстрату залежить вартість ПГА, тому дешева сировина є привабливою для дослідників. Бактерії можуть продукувати ПГА на різних субстратах. Вуглецевими субстратами можуть бути відновлювальні джерела

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>					
Змн.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата						
Розраб		Зюзько О.Л.			РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА					
Пров		Стадніков В.П.						Літера	Арк	Аркушів
Н. Контр.									18	128
Затв.		Стадніков В.П.						<i>Кафедра БТМ</i>		
					18					

енергії, зокрема, сахароза, крохмаль, целюлоза, тригліцериди, геміцелюлоза, пшениця; субпродукти – патока, молочна сироватка, гліцерин, кукурудзяний екстракт, рисові висівки; органічні кислоти – пропіонова кислота, 4-гідроксимасляна кислота; відходи – стічні води, води з виробництва пальмової олії, активний мул. Глюкоза та сахароза використовуються переважно для промислового виробництва ПГА [25].

Вплив рН. Дослідники не мають єдиної думки, щодо вибору оптимального значення рН. Наприклад, вважають, що оптимальне значення рН для вироблення ПГА має бути на рівні 6,0 – 7,5. У дослідженні спостерігали, як зміна рН, впливає на кількість вироблених ПГА бактерією *S. taiwanensis* 184. Рівень рН підтримували на рівні 6,0; 7,0 та 8,0. При рН 7,0 спостерігався найбільший вміст ПГА на рівні 43,04%. Даний експеримент довів, що кількість накопиченого біополімеру чутлива до значення рН [26].

Деякі вчені дійшли висновку, що найоптимальнішим значення рН має бути на рівні 7,0, адже саме при такому показнику активні ферменти, які беруть участь в накопиченні ПГА. Проте, є й дослідження де найбільша концентрація цільового продукту була при рН 8,0-9,0 [27].

Техніка культивування. Для підвищення продуктивності ПГА, використовують техніку періодичного культивування з підживленням, оскільки швидкість виробництва ПГА, може бути придушена концентрацією субстрату. Аеробне культивування з періодичним додованням джерела вуглецевого живлення, дозволяє збільшити вміст ПГА. Успішно застосовується ферментація в три етапи: перший етап – періодичне культивування під час якого клітини мікроорганізму адаптуються, другий етап – періодичне культивування, під час якого збільшується загальна біомаса, третій – збільшення накопичення ПГА, шляхом обмеження азоту в середовищі [28,29].

Перший етап вибору біологічного агенту базується на порівнянні їхніх показників біосинтезу полігідроксіалканоатів. Для порівняння було взято три штами *S. necator*.

У статті [28] спостерігали за синтезом РНВ, на прикладі штаму *C. necator* ATCC 17697, як ростовий субстрат використали глюкозу. Культивування проводили у біореакторі за допомогою порційної ферментації, протягом 76 годин. Процес накопичення ПГА зупинився через 25 годин після початку культивування, адже вичерпався весь сульфат амонію, тому була здійснена ще одна порційна ферментація, додали фруктозу 20 г/л та 1,5 г/л амоній сульфату. Після 33 годин культивування залишкова біомаса залишалася постійною, а загальна біомаса збільшувалася за рахунок накопичення ПГА. Загалом утворилося 14,4 г/л біомаси та 9,9 г/л ПГА.

У даному дослідженні [32] спостерігали за накопиченням ПГА, на прикладі штаму *C. necator* DSM 545. Як ростовий субстрат використали фруктозу, а також екстракт червоного яблука. Суть дослідження полягала у тому, щоб показати, що ПГА можна отримати з відновлювальних джерел енергії, у даному випадку з фруктів та овочів, які є харчовими відходами. Зібрані овочі та фрукти обробляли та піддавали екстракції. Найкращі показники накопичення ПГА спостерігалися при використанні екстракту дині та яблука, для порівняльної таблиці взяті показники при рості на екстракті яблука, адже даний фрукт є типовим для нашої місцевості. Екстракт червоного яблука містить високу концентрацію відновлюючих цукрів, а також додатковий азот та фосфор. На діаграмі (рис. 2.1.1) можна спостерігати кількість утворених ПГА за 96 годин культивування у поживному середовищі DMSZ-81 з додаванням екстрактів різних фруктів та овочів. При культивуванні *C. necator* DSM 545 з екстрактом червоного яблука було утворено 7,4 г/л ПГА за 96 годин.

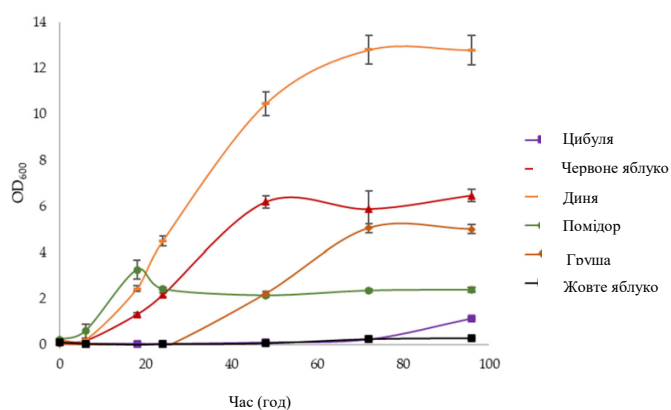


Рис. 2.1.1. Графік росту *C. necator* DSM 545 протягом 96 годин, у колбах на середовищі DMSZ-81 з додаванням різних екстрактів [32]

У статті [31] спостерігали як накопичує ПГА *C. necator* Н16, використовуючи як джерело вуглецю, олію ятрофи. Цікавим є те, що на 38 годину культивування додали 1,18 г/л етанолу та спостерігали, що почав збільшуватися вихід ПГА. Не вдалося встановити точний зв'язок між накопиченням ПГА та додаванням етанолу, проте вважають, що додавання етанолу активізує алкогольдегідрогеназу та виробляється ацетил-КоА та НАД(Ф)Н. НАД(Ф)Н інгібує ЦТК, це призводить до вищої кількості ацетил-КоА в біосинтетичному шляху ПГА. Також зменшується кількість вільного КоА, через інгібування ЦТК. Це сприяє утворенню вільного КоА-інгібованого ферменту кетотіолази, що призводить до синтезу більшої кількості ПГА. При культивуванні *C. necator* Н16 на олії ятрофи було утворено 3,5 г/л ПГА за 69,5 годин.

Всі отримані дані були систематизовані (табл. 2.1) та свідчать, що найбільшу кількість ПГА – 9,1 г/л синтезується штамом *C. necator* ATCC 17697, але тривалість культивування та поживні середовища для культивування були різними. Тому потрібно розрахувати вартість поживних середовищ, на яких культивували мікроорганізм (табл. 2.2).

Таблиця 2.1

Порівняння показників біосинтезу полігідроксіалканоатів різними біологічними агентами

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год	Концентрація ПГА, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Cupriavidus necator</i> ATCC 17697	Фруктоза (NH ₄) ₂ SO ₄ KH ₂ PO ₄ NaH ₂ PO ₄ MgSO ₄ ·7H ₂ O FeSO ₄ ·7H ₂ O MnCl ₂ ·4H ₂ O CaCl ₂ ·2H ₂ O CuCl ₂ ·2H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O H ₃ BO ₃ CoCl ₂ ·6H ₂ O NiCl ₂ ·6H ₂ O Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O Для підживлення: Фруктоза (NH ₄) ₂ SO ₄	20 1,5 4,35 4,35 0,5 0,2 0,003 0,2 0,001 0,01 0,03 0,02 0,002 0,003 20 1,5	76	9,9	Культивування проводили у біореакторі BioFlo 110, об'ємом 6 л (рН 7,0±2, t°=30°C, аеробні умови). Додавання нової дози сульфату амонію (1,5 г/л) та фруктози (20 г/л) на 25 годину культивування	Nygaard D., Yashchuk O., Nosedo D.G. <i>et al.</i> Improved fermentation strategies in a bioreactor for enhancing poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production by wild type <i>Cupriavidus necator</i> from fructose. <i>Helicon</i> . 2021, 7(1):1–11 doi: 10.1016/j.helicon.2021.e05979
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Екстракт червоного яблука Фруктоза NH ₄ Cl KH ₂ PO ₄ NaH ₂ PO ₄ ·7H ₂ O MgSO ₄ ·7H ₂ O NaHCO ₃	27 30 1 2,3 2,9 0,5 0,5	96	7,4	Культивування проводили у колбах Ерленмейєра об'ємом 100, t°=30°C, аеробні умови)	Costa P., Basaglia M., Casella S. and Favaro L. Polyhydroxyalkanoate production from fruit and vegetable waste processing. <i>Polymers</i> . 2022, 14 (24):5529. doi: 10.3390/polym14245529

Закінчення таблиці 2.1.

	CaCl ₂ ·2H ₂ O Цитрат заліза(III) амонію MnCl ₂ ·4H ₂ O CuCl ₂ ·2H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O H ₃ BO ₃ CoCl ₂ ·7H ₂ O NiCl ₂ ·6H ₂ O Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O рибофлавін тіамін-HCl·2H ₂ O нікотинова к-та піридоксин-HCl біотин фолієва кислота вітамін B12	0,01 0,05 0,003 0,001 0,01 0,03 0,02 0,002 0,003 0.0000005 0.0000025 0.0000025 0.0000025 0.00000005 0.00000001 0.00000005	96	7,4	Культивування проводили у колбах Ерленмейєра об'ємом 100, t°=30°C, аеробні умови)	Costa P., Basaglia M., Casella S. and Favaro L. Polyhydroxyalkanoate production from fruit and vegetable waste processing. <i>Polymers</i> . 2022, 14 (24):5529. doi: 10.3390/polym14245529
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Олія ятрофи Сечовина Етанол KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O MgSO ₄ ·7H ₂ O MnCl ₂ ·4H ₂ O CuSO ₄ ·5H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O H ₃ BO ₃ CoCl ₂ ·7H ₂ O NiCl ₂ ·6H ₂ O Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	12,5 1 1,18 1,5 9 0,2 0,003 0,001 0,01 0,03 0,02 0,002 0,003	69,5	3,5	Культивування проводили у колбах на качалці об'ємом 100 мл при 200 об/хв (рН 7,5, t°=30°C, аеробні умови)	Batcha A.F, Prasad D.M, Khan M.R and Abdullah H. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by <i>Cupriavidus necator</i> H16 from jatropha oil as carbon source. <i>Bioprocess Biosyst Eng</i> . 2014, 37(5):943-51. doi: 10.1007/s00449-013-1066-4.

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для вирощування продуцентів ПГА

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6
<i>Cupriavidus necator</i> ATCC 17697	Фруктоза	20	100	2,00	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5	22	0,033	2
	KH ₂ PO ₄	4,35	144	0,6264	3
	NaH ₂ PO ₄	4,35	126	0,567	4
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	17	0,0085	5
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02	39	0,00078	6
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,003	168	0,000336	7
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,02	49	0,00098	8
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,001	245	0,000245	9
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	87	0,00087	10
	H ₃ BO ₃	0,03	44,8	0,001344	11
	CoCl ₂ ·7H ₂ O	0,02	1000	0,02	12
	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,002	320	0,00064	13
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,003	475	0,001425	14
	Середовище для підживлення				
	Фруктоза	20	100	2,00	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5	22	0,033	2
	Вартість 1 л середовища – 5,27 грн				
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Екстракт червоного яблука	27	908,31	7,83	15
	Фруктоза	30	102	3,06	1
	NH ₄ Cl	1	80	0,08	16
	KH ₂ PO ₄	2,3	144	0,3312	3
	NaH ₂ PO ₄	2,9	126	0,3654	4
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	17	0,0085	5
	NaHCO ₃	0,5	39	0,0195	17
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,01	49	0,00049	8
	Цитрат заліза (III) амонію	0,05	540	0,027	18
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,003	168	0,00504	7
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,001	245	0,00245	9
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	87	0,0087	10
	H ₃ BO ₃	0,03	44,8	0,01344	11
	CoCl ₂ ·7H ₂ O	0,02	1000	0,2	12
	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,002	320	0,0064	13
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,003	475	0,01425	14
Рибофлавін	0.0000005	1200	0,0000006	19	

Закінчення таблиці 2.2.

1	2	3	4	5	6
	Тіамін-НСІ·2Н ₂ О	0.0000025	1651	0,000004	20
	Нікотинова к-та	0.0000025	249	0,0000006	21
	Піридоксин-НСІ	0.0000025	780	0,000002	22
	Біотин	0.000000005	2160	0,000000005	23
	Фолієва к-та	0.00000001	7500	0,000000008	24
	Вітамін В12	0.0000005	900	0,0000005	25
Вартість 1 л середовища – 11,98 грн					
Cupriavidus necator H16	Олія ятрофи	12,5	80	1,2	26
	Сечовина	1	39,60	0,0396	27
	Етанол	1,18	78	0,19	28
	КН ₂ РО ₄	1,5	144	0,216	3
	NaH ₂ PO ₄	9	126	1,134	4
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	17	0,0034	5
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,003	168	0,000504	7
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,001	135	0,000135	29
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	87	0,00087	10
	H ₃ BO ₃	0,03	44,8	0,01344	11
	CoCl ₂ ·7H ₂ O	0,02	1000	0,02	12
	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,002	320	0,0064	13
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,003	475	0,001425	14	
Вартість 1 л середовища – 2,81 грн					

Примітка: ціни наведено станом на 16.03.2023: 1 - <https://www.systopt.com.ua/item-fruktoza>; 2 -

<https://marganec.prom.ua/p469050-sulfat-amoniyu-amonij.html?&primelead=MS45>, 3 -

<https://www.systopt.com.ua/item-kalij-fosfornokyslyj-1-zamishhenyj>, 4 - <https://www.systopt.com.ua/item-natrij-fosfornokyslyj-fosfat-natriyu-odnozamishhenyj-b-v>, 5 - <https://flagma.ua/uk/sulfat-magniyu-magniy-sirchanokisliyj-7-vodniyj-o13623082.html>, 6 - <https://prom.ua/ua/p273592540-zhelezo-sernokisloe-zheleznyj.html?&primelead=MS45>, 7 - <https://marganec.prom.ua/ua/p277934134-marganets-hloristyj-vodniyj.html>,

8 - <https://tov-srp.com/product/kalczij-hloristyj/>, 9 - <https://soda.kiev.ua/ua/p39523455-hlorid-medi.html>, 10 - <http://surl.li/fnekl>, 11 - <http://surl.li/fnemb>, 12 - <http://surl.li/fnemf>, 13 - <https://harkiv-torg.com.ua/ua/p800669553-hlorid-nikelya-geksagidrat.html>, 14 - <http://surl.li/fneqi>, 15 - <https://sb.prom.ua/ua/p1663324362-yabluchnij-poroshok.html>, 16 - <http://surl.li/fnewj>, 17 - <https://marganec.prom.ua/ua/p1612550870-pishevaya-soda-gidrokarbonat.html?&primelead=My42>, 18 - <https://www.olx.ua/d/uk/obyavlenie/zhelezo-iii-limonnoammiachnoe-zelenoe-ammoniy-zhelezo-iii-tsitrat-zel-IDKB9Kz.html>, 19 - <https://www.systopt.com.ua/item-vitamin-v2-ryboflavin>, 20 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-vitamin-v1-tiamin>, 21 - <https://www.systopt.com.ua/item-nikotynova-kyslota>, 22 - <https://www.systopt.com.ua/item-vitamin-b6-pirydoksyn>, 23 -

<https://www.systopt.com.ua/item-vitamin-n-biotyn>, 24 - <https://www.systopt.com.ua/item-foliyeva-kyslota-vitamin-v9>, 25 - <https://www.systopt.com.ua/item-vitamin-v12-kobalamin>, 26 - <https://www.alibaba.com/product-detail/biodiesel-crude-jatropha-acid-oil-for-50035597005.html?spm=a2700.7724857.0.0.66ce215cY1Adbu>, 27 -

<https://www.systopt.com.ua/item-sechovyna>, 28 - <https://prom.ua/ua/p1344865879-spirt-etiloviy-tehnicheskij.html>, 29 - <https://marganec.prom.ua/ua/p384765140-sulfat-medi-mednyj.html?&primelead=MS45>.

Щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент, необхідно розрахувати умовну вартість 1 г ПГА і кількість утвореного біопластику для кожного з проаналізованих штамів (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г ПГА, синтезованого на різних поживних середовищах

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація ПГА, г/л	Умовна вартість 1 г ПГА, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного ПГА за годину, г/год
<i>Cupriavidus necator</i> ATCC 17697	5,27	9,9	0,53	76	0,13
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	11,98	7,4	1,62	96	0,08
<i>Cupriavidus necator</i> H16	2,81	3,5	0,80	69,5	0,05

За результатами порівняння, найкращим продуцентом цільового продукту є *C. necator* ATCC 18697. Саме цей штам синтезує найбільшу кількість РНВ за годину за заданих умов культивування, проте умовна вартість 1 г ПГА, найменша у штаму *C. necator* H16, але з таблиці бачимо, що вихід цільового продукту найменший. Тому для подальшої роботи, було обрано *Cupriavidus necator* ATCC 18697.

Але як зазначалося на початку розділу є й інші мікроорганізми, які синтезують ПГА та здатні накопичувати їх у значно вищій кількості. Наприклад, *Azohydromonas australica* DSM 1124 утворює 20,55 г/л ПГА за 69 годин, при багаторазовому серійному культивуванні [33].

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування *Cupriavidus necator* ATCC 17697 – продуцента внутрішньоклітинних полігідроалканоатів.

Тривалість культивування 76 год, концентрація ПГА в культуральній рідині становить 9,9 г/л, а концентрація біомаси – 14,4 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу цільового продукту. Як джерело вуглецю для одержання ПГА використовується фруктоза.

Розрахуємо скільки вуглецю міститься в 9,9 г полігидроксибутирату. З літературних джерел молекулярна маса біополімеру становить 1710 кДа. 1кДа дорівнює 10 г/моль, тому молекулярна маса ПГБ 17100 г/моль. Кількість атомів вуглецю з формули підрахувати неможливо, адже цільовий продукт є полімером. Проте, можна підрахувати кількість атомів вуглецю у мономері та поділити масу всього ПГБ на молекулярну масу одного мономеру. Помножимо кількість мономерів на кількість атомів вуглецю, отримаємо молярну масу вуглецю у полімері. Порахувавши отримаємо число 9552 г/моль. Складемо пропорцію, знаючи що у 17100 г полігидроксибутирату міститься 9552 г вуглецю. Тому, в 9,9 г ПГБ міститься $(9,9 \times 9552) / 17100 = 5,5$ г вуглецю.

Далі розрахуємо у скількох грамах фруктози міститься 5,5 г вуглецю, враховуючи, що вміст вуглецю у фруктозі становить 72 г/моль. Тому, у 180 г фруктози міститься 72 г вуглецю, а 5,5 г вуглецю міститься у $(5,5 \times 180) / 72 = 13,75$ г.

Потреби для синтезу біомаси. Як джерело вуглецю для одержання ПГА використовується фруктоза. У біомасі міститься 50% Карбону, отже вміст Карбону в 14,4 г біомаси становить $14,4 \times 0,5 = 7,2$ г. Ця кількість Карбону міститься у $(14,4 \times 180) / 72 = 36$ грамах фруктози. Враховуючи 40% втрати субстрату на «холосте окиснення», для одержання 14,4 г біомаси у середовище необхідно внести $(36 \times 0,4) + 36 = 50,4$ г/л фруктози.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреба для синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 10% Нітрогену. Таким чином, у 14,4 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 1,44 г. Продукцент лізину асимілює як джерела азотного живлення мінеральний (амонійний) Нітроген. Для одержання ПГА в промислових умовах використовується середовище, яке містить як джерело мінерального Нітрогену сульфат амонію – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Розрахуємо кількість сульфату амонію, необхідну для одержання 14,4 г/л біомаси. Молекулярна маса $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ становить 132. Отже, у 132 г сульфату амонію міститься 28 г Нітрогену (N), тоді 1,44 г Нітрогену буде міститись у $(132 \times 1,44) / 28 = 6,8$ г солі. Для одержання 14,4 г/л біомаси вміст $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у середовищі культивування повинен становити 6,8 г/л

Згідно [1] концентрація сульфату амонію у середовищі для культивування *S. necator* АТСС 17697 становить лише 3 г/л, що недостатньо для синтезу 14,4 г/л біомаси. Це може бути зумовлено тим, що ПГА здатні накопичуватися в клітинах лише за несприятливих умов, зокрема такою умовою є нестача джерела азотного живлення.

Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі

У біомасі міститься близько 3 % Фосфору (за елементом P). Отже, для синтезу 14,4 г/л біомаси вміст Фосфору у середовищі повинен становити $14,4 \times 0,03 = 0,43$ г/л. Джерелами Фосфору у промисловому виробництві лізину є однозаміщений Калій та Натрій фосфорнокислий – KH_2PO_4 і NaH_2PO_4 .

Вміст Фосфору у NaH_2PO_4 – $31 / 120 = 26$ %, а у KH_2PO_4 становить $31 / 136 = 23$ %. Отже, у NaH_2PO_4 міститься у $26 / 23 = 1,1$ рази більше Фосфору, ніж у Na_2HPO_4 . Прийmemo вміст Фосфору (P) у KH_2PO_4 за 1 (одиницю), тоді вміст P у NaH_2PO_4 буде 1,1. Отже, можемо записати $2,1 \times x = 0,43$, звідки $x \approx 0,2$.

Таким чином, вміст P у вигляді KH_2PO_4 становить 0,2 г/л, а у вигляді NaH_2PO_4 – $0,2 \times 1,1 \approx 0,22$ г/л. Відповідно, концентрація цих солей у середовищі становить $(136 \times 0,2) / 31 \approx 0,9$ г/л та $(120 \times 0,22) / 31 \approx 0,9$ г/л. Отже, середовище для культивування продуцента ПГА містить по 0,9 г/л KH_2PO_4 і NaH_2PO_4 .

Інші компоненти середовища

Джерелами необхідних для росту бактерій елементів, таких як Натрій є NaH_2PO_4 та $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Кальцію – $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Хлору – $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, та $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Магнію – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Сульфур у – $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeSO_4 та $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Заліза – FeSO_4 .

2.3. Морфолого-культуральні ознаки

Cuprivadius necator (раніше *Wautersia eutropha*, *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*) – β -протеобактерія, грам-негативна, паличкоподібної форми із заокругленими кінцями (рис.2.3.1), палички короткої форми. *C. necator* рухливий, рухається за допомогою перитрихіальних джгутиків. Джгутиків зазвичай від 2 до 10 (рис. 2.3.2) [34,35].

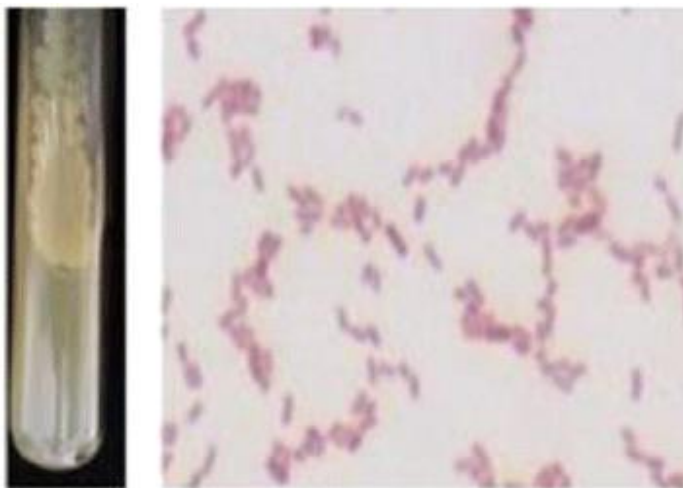


Рис. 2.3.1. Колонії *C. necator* на скошеному агарі та при фарбуванні за Грамом (збільшення 1000х) [36]

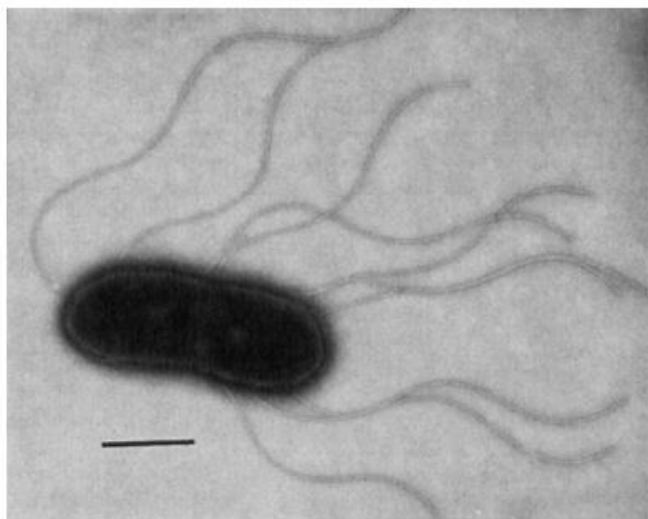


Рис. 2.3.2. Електронна мікроскопія *C. necator* [35]

Клітини мають розмір $0,5-0,8 \times 2-5$ мікрон і розташовуються поодиночі, попарно і в коротких ланцюжках. Неспороутворюючі, розмножуються шляхом бінарного поділу.

Особливістю *C. necator* є здатність до накопичення внутрішньоклітинних РНА у формі гранул (рис.2.3.3.), які називають карбоносомами. Карбоноси - складноорганізовані субклітинні органели. Внутрішньоклітинні гранули РНА зазвичай мають розмір 0,2-0,5 мкм [37, 38].

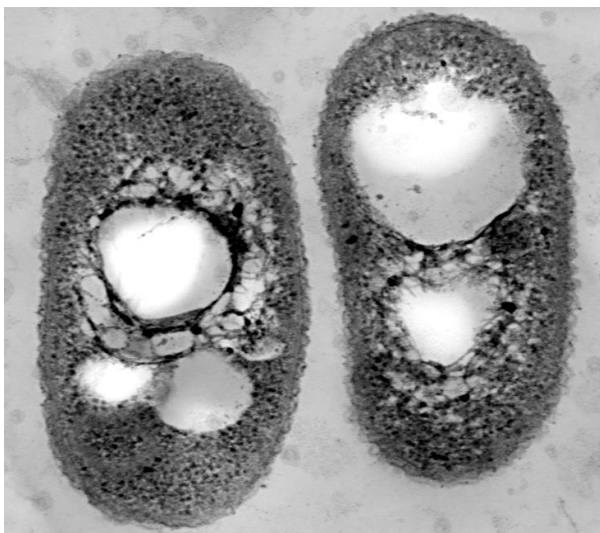


Рис. 2.3.3. Клітини *Cupriavidus necator*, що містять 37 % гранул РНА (за збільшення у 65000х) [39].

У клітини *C. necator* може накопичуватися до 10% РНА при рості на повних поживних середовищах та до 80% РНА при рості на середовищах, де достатня кількість вуглецю, але обмежена кількість азоту [40].

Карбоноси забезпечують захист клітин від осмотичного шоку, УФ-випромінювання, окиснення та несприятливих температур. Також беруть участь у споруляції, утворенні цист, контролі екскреції екзополісахаридів [39].

Виявлення ПГА. Для того, щоб виявити бактерії, які синтезують ПГА, а також сам біополімер використовують метод фарбувальної флуоресценції. На агаризованих середовищах використовують барвник, котрий носить назву нільський синій. Мікроорганізми, котрі синтезують ПГА, при рості на агаризованому середовищі з цим барвником, поглинають фарбу. Цей барвник проникає у включення, в яких знаходиться ПГА. Потім ці сполуки при потраплянні на них УФ-променів довжиною 312 нм, відбивають помаранчевий колір і генерується помаранчева флуоресценція. Цей метод дозволяє не лише

виявити ПГА й організми, які його синтезують, а також вказує на кількість синтезованого біополімеру. Чим вища флуоресценція, тим більша кількість синтезованого біополімеру. Згідно з дослідженням, яке провели вчені у статті [41], можна спостерігати яскраву флуоресценцію, яку демонструє ізолят 16а, котрий ідентифіковано як *Stenotrophomonas maltophilia* HA-16, порівняно із зразком 8, що вказує на високу кількість отримання ПГА даним ізолятом (рис. 2.3.4.) [41].

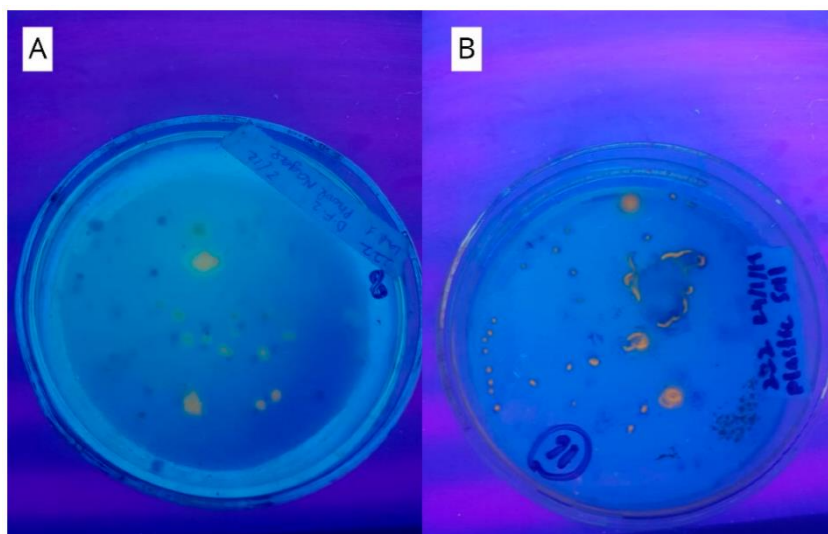


Рис. 2.3.4. Ізоляти, які продукують ПГА, інокульовані на агаризованому середовищі для виявлення ПГА під дією УФ-променів: А) ізолят 8; В) ізолят 16а [41]

S. necator утворює гладкі колонії, які досягають 1–2 мм протягом 48 годин при 30 °С на кров'яному агарі [42].

При рості на середовищі Лурія-Бертані при 37 °С протягом 24 годин, колонії не пігментовані, забарвлення з'являється лише після накопичення РНА [43].

При рості на триптоказо-соєвому агарі (TSA) протягом 24 годин, при 30°С утворюють круглі, гладкі, опуклі та прозорі колонії діаметром 0,5 мм [43].

На поживному агарі протягом 2 дні, при 27°С колонії досягають 2-4 мм, брудно-білі, блискучі, слизові, гладкі, опуклі з цілим краєм [35].

2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки

Факультативний аероб. *C. necator* виконує аеробне дихання, проте здатний існувати й за низьких концентрацій кисню. Анаеробне дихання здійснюється шляхом денітрифікації нітрату до газоподібного азоту [36].

Мезофіл. Мікроорганізм для якого температурний оптимум 20-42 °С. Найбільш оптимальною температурою для *C.necator* є 27°С. Інтенсивний ріст спостерігається й при 37°С, при 15°С ріст відбувається із затримкою. При температурі 55°С ріст не спостерігається [35].

Лугостійкий нейтрофіл. Алкалофіл. *C. necator* може існувати при рН 5,5-9.2, але найкраще росте в середовищах, де значення рН нейтральне 7.0.-8.0.

3% розчин NaCl інгібує ріст *Cupriavidus necator*. Найкращий ріст спостерігається в присутності 1% NaCl [44].

Факультативний хемолітотроф. Залежно від джерела вуглецю *C.necator* може бути автотрофом (якщо росте на суміші CO₂ та H₂) та гетеротрофом (якщо використовуються органічні сполуки). Як джерело вуглецю здатний використовувати фруктозу, глюкозу, фумарат, аспартат, глюконат, лактат, арабінозу, L-глутамат, L-лейцин. Фіксація CO₂ відбувається шляхом Кальвіна-Бассема. Особливістю *C. necator* є здатність рости на альтернативних джерелах вуглецю таких як, олія авокадо, вінанс, відходи цукрової промисловості, масло кавової гущі тощо [45,46,47].

2.5. Таксономічний статус біологічного агента

Філогенетичну класифікацію *C. necator* наведено відповідно до другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [48].

Домен – *Bacteria*

Тип – *Proteobacteria*

Клас – *β-Proteobacteria*

Порядок – *Burkholderiales*

Родина – *Burkholderiaceae*

Рід – *Cupriavidus*

Вид – *necator*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Основною проблемою сучасності є накопичення великої кількості відходів, зокрема пластикових. На жаль, екологічні проблеми потрібно вирішувати, адже етап, коли їм можна було запобігти, давно пройдений. Історія застосування пластику бере свій початок ще з кінця XIX століття, а масовий випуск почався з середини XX століття. Пластикові відходи невпинно розповзаються планетою, за даними на 2021 рік їх кількість становить 139 мільйонів тонн, адже 40% пластику використовується одноразово. Тому дана проблема привертає увагу, адже пластик забруднює планету починаючи від гірських вершин і закінчуючи дном Світового океану [49-51].

Проблема пластикових відходів не оминула й Україну. Також існує проблема переробки відходів у нашій державі, адже у країнах ЄС переробці підлягає 70% пластикових матеріалів, а в Україні лише 6%. Проте, підприємства нашої держави активно впроваджують технології переробки, повторного використання матеріалів, а також створення біорозкладної тари [52,53].

Одним із рішень боротьби з відходами є їх повторне використання. Більшість пластикової тари підлягає обробці. Кожна пластикова упаковка має знак екологічного маркування, який показує чи можна переробляти даний виріб та як споживачі можуть використовувати даний тип полімеру. На сьогодні в Україні переробляється приблизно 180 тисяч тонн пластику, що становить 10-12% [54].

Зокрема корпорація «Оболонь» одною з перших почала переробляти пластикові відходи і за 18 років такої ініціативи було перероблено 13318 тонн пластику, це приблизно 380 млн бутілок [55]. Також популярності набуває пакування, яке біологічно розкладається у ґрунті та воді. Починаючи з 1 лютого 2022 року на території нашої країни почала діяти постанова уряду, яка

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>		
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розраб</i>		<i>Зюзько О.Л.</i>			РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ		
<i>Пров</i>		<i>Стабніков В.П.</i>					
						33	128
<i>Н. Контр.</i>					33		
<i>Затв.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>			<i>Кафедра БТМ</i>		

заборонила безкоштовне розповсюдження пластикових пакетів, замість них почали з'являтися біорозкладні. Дана ініціатива стимулює виробників модернізувати технології виробництва пластикових пакетів, а також переходити до біорозкладних матеріалів. За 2022 українські супермаркети збільшили продаж біорозкладних пакетів у 13-15 разів [52,56].

Компанія «Кока-Кола Беверіджис Україна» є одним з лідерів випуску газованих напоїв та відповідає за виробництво, пакування та розповсюдження безалкогольних напоїв. Станом на 2023 рік в Україні підприємство представлено 12 регіональними підрозділами з головним офісом і заводом у селі Велика Димерка Київської області [57].

Стратегія підприємства – «Світ без відходів» спрямована на скорочення відходів, реалізацію проектів зі збору сміття та боротьбу з відходами, а також реалізацію схем повторної переробки відходів. До 2030 року компанія планує переробляти таку ж кількість бутілок, яка продається [58].

Як зазначалося раніше у світі набуває популярності виготовлення пляшок з ПГБ, адже вони розкладаються протягом 8-10 тижнів, як у воді так і у ґрунті [59].

Так як діяльність «Кока-Кола Беверіджис Україна» спрямована на вирішення екологічних проблем та у даної компанії є інтерес щодо використання екологічної тари, то подальші розрахунки буде проведено саме для цього підприємства.

Станом на 2019 рік, за результатами діяльності підприємства утворилося 1923 тони відходів. На пластикові відходи припадає 272 тони, що становить 14,1% від загальної кількості. Компанія переробляє 37,8% пластикових відходів у вторинну тару і це складає 102,8 тони [57].

Перехід на інші пакувальні матеріали передбачає не лише використання вторинної тари, а й застосування біодеградабельних пакувальних матеріалів, котрі через певний час розкладаються без переробки.

Компанія випускає як газовану так і негазовану продукцію. Згідно даних, які наведені у звіті зі сталого розвитку, негазована продукція у пластиковій тарі

складає 18,21% від загального обсягу виробництва напоїв. До негазованої продукції відноситься природна питна вода VonAqua®, FUZE TEA® зі смаками лимону, персика, лісових ягід та зелений чай зі смаком лайма, а також сік Rich® 14 смаків в асортименті. Негазована вода VonAqua® займає 9,2% від числа випущених негазованих напоїв. На початкових етапах виробництва замінимо одну четверту частину виробництва пластикової тари для негазованих напоїв біодеградабельним пластиком це буде становити 2,3%. Так як «Кока-Кола Беверіджис Україна» за рік утворює 272 тони пластикових відходів 2,3% від загального обсягу буде становити 6256 кг пластику. Саме таку кількість кілограмів замінимо біодеградабельним матеріалом.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Цільовий продукт – полігидроксibuтират синтезується продуцентом *S. necator* ATCC 17697 у кількості 9,9 г/л. Знаючи концентрацію цільового продукту у культуральній рідині, можемо розрахувати річний об'єм культуральної рідини, необхідної для отримання 6256 кг ПГБ:

$$\frac{6256000}{9,9} = 631919,19 = 631919 \text{ л на рік}$$

Врахуємо сумарні втрати цільового продукту при виділенні – 30%, потрібно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{кр} = \frac{631919,2}{1-0,3} \approx 902741,7 \text{ л} = 902,7 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Для того, щоб замінити частину пластикового пакування для компанії «Кока-Кола Беверіджис Україна Лімітед», необхідно 902,7 м³ культуральної рідини, враховуючи її втрати при виділенні.

Приймаємо, що для отримання 902,7 м³ культуральної рідини. Нам необхідно 330 трудоднів – T_{рд}. Тому кількість культуральної рідини за день – V_д буде становити:

$$V_{д} = \frac{V_{кр}}{T_{рд}} = \frac{902,7}{330} \approx 2,74 \text{ м}^3$$

Тепер розрахуємо кількість культуральної рідини за цикл – V_{крц}:

$$V_{\text{крц}} = \frac{K_1 \cdot V_D \cdot T_{\text{цф}}}{24} = \frac{1,1 \cdot 2,74 \cdot 86}{24} \approx 10,78 \text{ м}^3,$$

де ТЦФ – робочий цикл ферментера, який включає тривалість виробничого культивування – 76 годин, та допоміжні операції для підготовки ферментера – 10 годин, а саме: миття та огляд – 2 год, перевірку на герметичність – 2 год, стерилізацію – 2 год, охолодження – 1 год, завантаження середовища – 1,5 год, засів – 0,5 год та вивантаження культуральної рідини – 1 год; K_1 – коефіцієнт запасу, який враховує ймовірність нестерильних операцій – $K_1=1,1 \dots 1,5$.

Тепер розрахуємо кількість циклів – $N_{\text{ц}}$:

$$N_{\text{ц}} = V_{\text{кр}} / V_{\text{крц}} = 902700 / 10780 = 84 \text{ цикли}$$

Розрахуємо геометричний об'єм ферментера, який необхідний для отримання $10,78 \text{ м}^3$ культуральної рідини:

$$V_{\Gamma} = \frac{V_{\text{цк}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{10,78}{0,55} \approx 19,6 \text{ м}^3,$$

де $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення ферментера, який дорівнює 0,55.

Отже, обираємо найближчий за геометричним об'ємом стандартний ферментер об'ємом $V_{\Phi} = 20 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення – $K_{\text{зап}}$:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{цк}}}{V_{\Phi}} = \frac{10,78}{20} \approx 0,54 \text{ – не перевищує заданого значення.}$$

Отже, для отримання $10,78 \text{ м}^3$ культуральної рідини обираємо ферментер об'ємом 20 м^3 .

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу полігідроксибутирату

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 10,78 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

Розрахуємо кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом, при чому врахуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які знаходяться в межах від 10 – 15%:

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\Phi}} = \frac{10,78}{1 - 0,1} \approx 11,97 \text{ м}^3,$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 11,97 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,54/5$ розрахуємо можливий геометричний об'єм ферментера, який становить:

$$V_{\Phi} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\text{зап}}} = \frac{11,97}{0,55} \approx 21,76 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 20 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\Phi}} = \frac{11,97}{21,76} = 0,55 \text{ м}^3.$$

Так як уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує не перевищує заданих меж для аеробних процесів (0,55 – 0,65), отже об'єм ферментера вибрано вірно.

Кількість посівного матеріалу складає 10% від об'єму поживного середовища. Тому кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1+X_{\Phi}} = \frac{11,97}{1+0,1} \approx 10,88 \text{ м}^3,$$

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

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 11,97 - 10,88 = 1,09 \text{ м}^3.$$

Для одержання 1,09 м³ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу 10%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1-E_{\text{ін}}} = \frac{1,09}{1-0,1} \approx 1,2 \text{ м}^3.$$

Знаючи, що кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища, розрахуємо його об'єм:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1+X_{\text{па}}} = \frac{1,2}{1+0,1} \approx 1,09 \text{ м}^3,$$

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

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 1,2 - 1,09 = 0,11 \text{ м}^3 = 110 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 1,2/0,55 = 2,2 \text{ м}^3$.
Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 2,0 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{1,2}{2,0} = 0,6.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує не перевищує заданих меж для аеробних процесів (0,55 – 0,65).

Для одержання 110 л інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу 10%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{110}{1 - 0,1} \approx 122,0 \text{ л.}$$

Знаючи, що кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища, розрахуємо його об'єм:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{122,0}{1 + 0,1} \approx 111,0 \text{ л,}$$

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

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 122,0 - 111,0 = 11,0 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 122,0/0,55 = 221,8 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 200 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{122,0}{200} = 0,61.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує не перевищує заданих меж для аеробних процесів (0,55 – 0,65).

Для одержання 11 л інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу 10%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = \frac{V_{\text{пм3}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{11,0}{1 - 0,1} \approx 12,2 \text{ л.}$$

Знаючи, що кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища, розрахуємо його об'єм:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{12,2}{1 + 0,1} \approx 11,1 \text{ л,}$$

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

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 12,2 - 11,1 = 1,1 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 12,2/0,55 = 22,1 \text{ л}$.
Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 20,0 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{12,2}{20,0} = 0,61.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує не перевищує заданих меж для аеробних процесів (0,55 – 0,65).

Щоб одержати 1,1 л посівного матеріалу для засіву малого інокулятора використаємо качалочні колби. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм4}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{1100}{750 \times 0,2} = 7.$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 7 качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу полігидроксибутирату у ферментері об'ємом 20 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,55 буде проходити у 4 етапи. Нам потрібно встановити ферментер для виробничого біосинтезу об'ємом 20 м^3 , посівний апарат об'ємом 2 м^3 , інокулятори об'ємом по 200 та 20 л, а також 7 качалочних колб.

Для зручності висновків стосовно кількості стадій і об'ємів підготовки посівного матеріалу представимо у вигляді *табл. 3.1.4*.

Таблиця 3.1.4.

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

№ стадії	Об'єм культуральної рідини, $V_{кр}$, $м^3/(л)$	Уточнений об'єм культуральної рідини, $V_{роб}$, $м^3/(л)$	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$, $м^3/(л)$	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$, $м^3/(л)$	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$	Геометричний об'єм ферментера, $V_{ф}$, $м^3/(л)$
V	10,78	11,97	1,09	10,88	0,55	20
IV	1,09	1,2	110 л	1,09	0,55	2
III	110 л	122 л	11 л	111,0 л	0,55	200 л
II	11 л	12,2 л	1,1л	11,1 л	0,55	20 л
I	1,1 л	1,1 л	-	1,1 л	0,2	7 колб

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агенту

Ростовим субстратом для біосинтезу полігідроалканоатів мікроорганізмом *Cupriavidus necator* H16 є фруктоза. В обраній статті формою ПГА є полігрокисибутирату (полі- β -гідроксибутирату), тому розглянемо утворення саме цієї форми біорозкладного полімеру [28].

Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes фруктоза буде розщеплюватися до гліцеральдегід-3-фосфату [60], який далі буде окиснюватися до пірувату шляхом Ембднера-Меєргофа-Парнаса [61].

Фруктоза під дією ферменту фруктокінази (КФ 2.7.1.4) перетворюється на фруктозо-6-фосфат. Утворений фруктозо-6-фосфат під дією фруктозо-1,6-дифосфатази I (КФ 3.1.3.11) перетворюється на фруктозо-1,6-дифосфат. Останній під дією ферменту класу ліаз фруктозо-дифосфат альдолази класу II (КФ 4.1.2.13) перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат.

Утворений гліцеральдегід-3-фосфат залучається до подальшого розщеплення субстрату шляхом гліколізу.

До подальшого катаболізму гліцеральдегід-3-фосфат залучається під дією ферменту гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (фосфорилази) (КФ 1.2.1.12) та перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат. Ферментативна дія фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) зумовлює перетворення 1,3-дифосфогліцерату на 3-фосфогліцерат. Дія 2,3-дифосфогліцератзалежної фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.11) зумовлює перетворення 3-фосфогліцерату на 2-фосфогліцерат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) відбувається перетворення 2-фосфогліцерату на фосфоенолпіруват. Останній у свою чергу під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40) перетворюється на піруват.

Тому на основі даних, що представлені у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, катаболізи фруктози штамом *Cupriavidus necator* H16 можна подати у

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>					
Змн.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата						
Розраб		Зюзько О.Л.			РОЗДІЛ 4 БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ					
Пров		Стабніков В.П.						Літера	Арк	Аркушів
									41	127
Н. Контр.								41 <i>Кафедра БТМ</i>		
Затв.		Стабніков В.П.								

вигляді схеми, яка наведена нижче (рис.4.1).

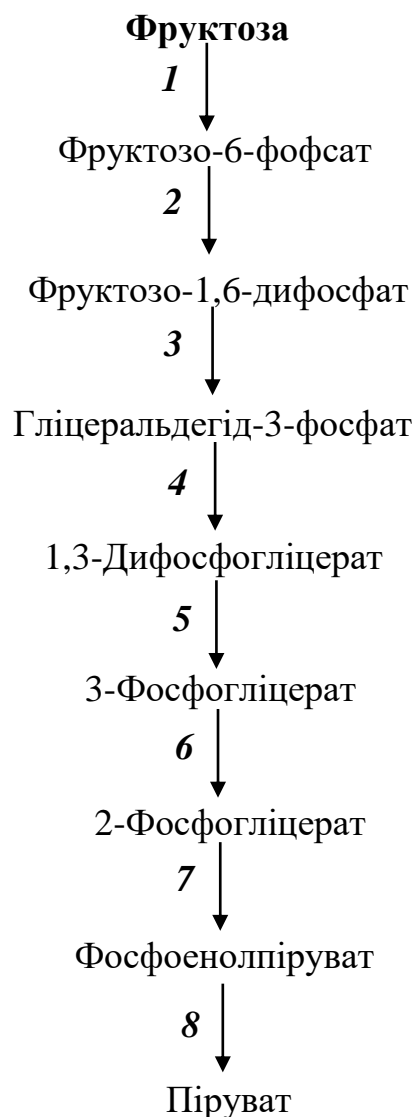


Рис.4.1. Катаболізм фруктози штамом *C. necator* H16 наведений згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Ферменти: 1 – фруктокіназа (КФ 2.7.1.4); 2 – фруктозо-1,6-дифосфатаза I (КФ 3.1.3.11); 3 – фруктозо-дифосфат альдолаза класу II (КФ 4.1.2.13); 4 – гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа (фосфорилаза) (КФ 1.2.1.12); 5 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 6 – 3-дисфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 7 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 8 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *C. necator* Н16 з використанням фруктози як джерела вуглецю, внаслідок катаболізму ростового субстрату буде утворюватися ацетил-КоА, який буде залучатися до циклу трикарбонних кислот (ЦТК) та для подальшого утворення цільового продукту біосинтезу.

Анаплеротичними реакціями, які будуть забезпечувати поповнення інтермедіатів ЦТК при рості на вуглеводневих субстратах, будуть піруваткіназа, яка буде забезпечувати утворення оксалоацетату з пірувату, під дією ферменту піруваткарбоксілази (КФ 6.4.1.1) та фосфоенолпіруваткарбоксікіназній реакції, яка буде забезпечувати утворення оксалоацетату з фосфоенолпірувату, під дією вуглекислого газу та ферменту фосфоенолпіруваткарбоксікінази (КФ 4.1.1.49).

ЦТК починає функціонувати із ацетил-КоА, який утворюється з пірувату, який утворився в гліколітичному циклі перетворення ростового субстрату. Окрім ЦТК, ацетил-КоА залучається до утворення цільового продукту біосинтезу, а саме полігидроксибутирату (полі- β -гидроксибутирату).

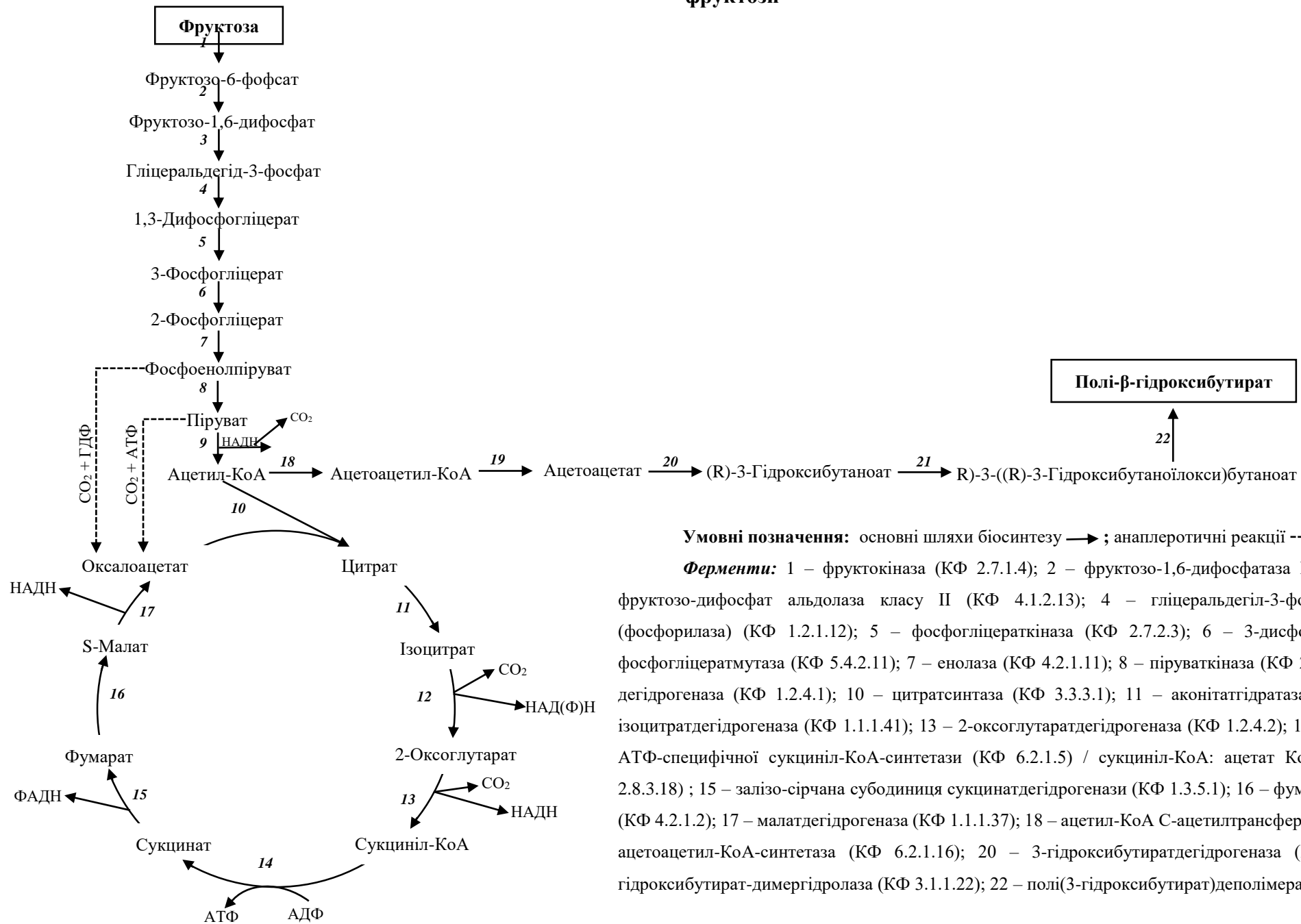
У ЦТК ацетил-КоА під дією цитратсинтаза (КФ 3.3.3.1) перетворюється на цитрат. Фермент аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3) перетворює цитрат на ізоцитрат. У свою чергу ізоцитрат під дією ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.41) трансформується до 2-оксоглутарату. Ферментативна дія 2-оксоглутаратдегідрогенази (КФ 1.2.4.2) спонукає утворення сукциніл-КоА з 2-оксоглутарату. 2-оксоглутарат за рахунок бета-субодиниці АТФ-специфічної сукциніл-КоА-синтетази (КФ 6.2.1.5) або сукциніл-КоА: ацетат КоА-трансферази (КФ 2.8.3.18) перетворюється на сукцинат. Залізо-сірчана субодиниця сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.5.1) спонукає утворення фумарату з сукцинату. Далі фумарат під дією фумаратгідратази, класу I (КФ 4.2.1.2) перетворюється на малат. Останній під дією малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37) перетворюється на оксалоацет [62].

Із ацетил-КоА розпочинаються реакції отримання цільового продукту. Ферментативна дія ацетил-КоА С-ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.9) зумовлює

перетворення ацетил-КоА на ацетоацетил-КоА. Фермент ацетоацетил-КоА синтетаза (КФ 6.2.1.16) перетворює ацетоацетил-КоА на ацетоацетат. Останній під дією 3-гідроксибутират дегідрогенази (КФ 1.1.1.30) переходить у (R)-3-гідроксибутаноат. (R)-3-гідроксибутаноат за рахунок ферментативної дії гідроксибутират-димер гідролази (КФ 3.1.1.22) перетворюється в (R)-3-((R)-3-гідроксибутаноїлокси)бутаноат. Полі(3-гідроксибутират) деполімераза (КФ 3.1.1.75) зумовлює перетворення останнього на полі- β -гідроксибутират [63].

Узагальнена схема біосинтезу цільового продукту, включаючи катаболізм ростового субстрату, наведена на *рис. 4.2*.

Рис.4.2. Схема біосинтезу полігідроксибутирату продуцентом *Cupriavidus necator* Н16 починаючи з катаболізму ростового субстрату – фруктози



Умовні позначення: основні шляхи біосинтезу →; анаплеротичні реакції --->.

Ферменти: 1 – фруктокіназа (КФ 2.7.1.4); 2 – фруктозо-1,6-дифосфатаза I (КФ 3.1.3.11); 3 – фруктозо-дифосфат альдолаза класу II (КФ 4.1.2.13); 4 – гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа (фосфорилаза) (КФ 1.2.1.12); 5 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 6 – 3-дифосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 7 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 8 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 9 – піруват дегідрогеназа (КФ 1.2.4.1); 10 – цитратсинтаза (КФ 3.3.3.1); 11 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 12 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.41); 13 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа (КФ 1.2.4.2); 14 – бета-субодиниця АТФ-специфічної сукциніл-КоА-синтетази (КФ 6.2.1.5) / сукциніл-КоА: ацетат КоА-трансфераза (КФ 2.8.3.18); 15 – залізо-сірчана субодиниця сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.5.1); 16 – фумаратгідратаза, клас I (КФ 4.2.1.2); 17 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 18 – ацетил-КоА С-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.9); 19 – ацетоацетил-КоА-синтетаза (КФ 6.2.1.16); 20 – 3-гідроксибутиратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.30); 21 – гідроксибутират-димергідролаза (КФ 3.1.1.22); 22 – полі(3-гідроксибутират)деполімераза (КФ 3.1.1.75).

РОЗДІЛ 5

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Cupriavidus necator H16 – біологічний агент, який за звичайних умов здійснює аеробне дихання, найкращі показники росту спостерігаються за значення рН=7,0 та температурі 27 – 30°C. Дані умови є комфортними для розвитку більшості штамів мікроорганізмів, тому існує високий ризик контамінації. Для цього нам потрібно забезпечити **асептичні умови** отримання цільового продукту. Для цього буде здійснюватися стерилізація ферментерів, інокуляторів, посівних апаратів, поживних середовищ та комунікацій.

1. Враховуючи, що *C. necator* ATCC 17697 є аеробним мікроорганізмом, у ферментер має відбуватися **подача кисню**. Такі умови забезпечуються шляхом оснащення ферментеру барботерами та турбінними мішалками [64].

2. Обираємо **глибинний спосіб** культивування, адже біосинтез продукту має відбуватися в асептичних умовах, які неможливо забезпечити поверхневим культивуванням. Також глибинний спосіб культивування має ряд переваг, зокрема менша трудомісткість процесу, використання менш громіздкого обладнання, менша ймовірність контамінації, легкість автоматизації процесу та його контролю, а також більший вихід продукції [65].

3. Культивування будемо здійснювати **періодичним способом**, адже цільовий продукт є вторинним метаболітом та утворюється у стаціонарній фазі росту мікроорганізму [65].

Так як *C. necator* ATCC 17697 є аеробним штамом, тому йому необхідна аерація середовища. Для забезпечення аерації ферментери оснащують барботером.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>					
Змн.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата						
Розраб		Зюзько О.Л.			РОЗДІЛ 5 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ					
Пров		Стабніков В.П.						Літера	Арк	Аркушів
									46	127
Н. Контр.								<i>Кафедра БТМ</i>		
Затв.		Стабніков В.П.								

Для того, інтенсифікації масообміну та для забезпечення розчинення кисню у всьому середовищі потрібно встановити мішалку. Найчастіше використовують мішалки лопатеві, турбінні, пропелерні та аерліфтні. Встановлюємо лопатеву, адже в процесі культивування не підвищується в'язкість середовища, не утворюється міцелій та утворені метаболіти не підвищують в'язкість середовища. Лопатева мішалка найпростіша за своєю конструкцією та є найдешевшою.

Для контролю рівня рН середовища, ферментер необхідно оснастити відповідним датчиком на якому буде відображатися показник кислотності середовища.

Для підтримання сталої температури необхідно встановити датчик температури.

5.2. Особливості підготовки аераційного повітря

Враховуючи, що *C. necator* ATCC 17697 – продуцент внутрішньоклітинних полігідроксибутиратів є аеробом, для ефективного біосинтезу потрібне ефективне забезпечення мікроорганізму розчиненим киснем. Враховуючи, що попередньо ми обрали глибинний спосіб культивування, необхідно забезпечити асептичність процесу, тому аераційне повітря має бути стерильним. Тому, якщо процеси мікробного синтезу здійснюються в асептичних аеробних умовах, нам потрібно у ферментер безперервно подавати стерильне повітря.

Виділяють такі основні стадії підготовки аераційного повітря:

- ✓ забір атмосферного повітря здійснюється через забірний пристрій, який знаходиться у найвищій точці відділення підготовки повітря – вище будівлі на 3 – 5 м, де розміщена система стиснення та очищення повітря;
- ✓ попереднє очищення повітря від пилу на плоских тканинних фільтрах грубого очищення;
- ✓ нагріваючись до температури 120...220°C, повітря стискується в компресорі або турбоповітродувках;

✓ потім відбувається охолодження повітря до температури «точка роси» й відбувається конденсація вологи повітря, для цього використовують водяні теплообмінники до яких відносяться апарати типу «труба в трубі» та кожухотрубні;

✓ відповідно далі повітря направляється до ресивера – пристрій, який забезпечує видалення конденсованої вологи та крапель мастила, які потрапили з компресора, а також зменшує пульсації руху повітря, які в майбутньому негативно впливають на роботу інших фільтрів очищення;

✓ стабілізація температури та тиску осушеного повітря, шляхом нагрівання його паром у теплообмінниках до температури 45-50°C;

✓ очищення повітря до показника очищення $E=95\%$ у головних емнісних набивних фільтрах, які встановлюються біля ферментаційних відділень;

✓ очищення повітря, яке пройшло через головні фільтри в індивідуальних фільтрах, які встановлюються на ферментері до показника $E=99,99\%$. Таке повітря передається за допомогою трубопроводів [66].

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Виробництво полігідроксibuтирату проводиться протягом 330 робочих днів, для цього нам потрібне наступне обладнання. Для вирощування інокуляту в реакторі об'ємом 20 л: реактор на 10 л для приготування композиції Б та інокулятор на 20 л. Для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 200 л: реактор на 10 л для приготування композиції А, реактор на 120 л для приготування композиції Б та інокулятор об'ємом 200 л. Для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 2 м³: реактор на 100 л для композиції А, реактор на 1,2 м³ для композиції Б та посівний апарат об'ємом 2 м³. Для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 20 м³: збірник об'ємом 0,5 м³ для композиції А, реактор на 15 м³ для композиції Б, а також виробничий ферментер об'ємом 20 м³. Додатково встановимо два збірники об'ємом по 50 л та 20 л для розчинів HCl та NaOH відповідно, які використаємо на етапі виробничого біосинтезу. А також два збірники на 50 л та 500 л для розчинів

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та фруктози, які використаємо для підживлення на етапі виробничого біосинтезу. Узагальнені дані наведені у *табл. 5.3.1*.

Таблиця 5.3.1

Габаритні розміри основного обладнання

Обладнання	Геометричний об'єм, м ³	Діаметр, м
Інокулятор	0,02	0,6
Реактор	0,12	0,56
Інокулятор	0,2	0,68
Реактор	0,1	0,57
Реактор	1,2	1,4
Посівний апарат	2	0,8
Збірник	0,5	0,8
Реактор	15	3,54
Ферментер	20	2
Реактор	0,05	0,75
Реактор	0,02	0,6
Збірник	0,05	0,75
Збірник	0,5	0,8
Всього:	39,76	

Тепер можемо розрахувати площу виробничого приміщення: в якому встановлені вище перелічені реактори та розташована контрольна лабораторія з автоклавом, боксом, холодильником тощо: $22,45 \cdot 12,89 = 289,38 \text{ м}^2$. Стіни миють на висоту 2,5 м.

Розрахуємо площу цеху, в якому будемо проводити виробничий процес: $18,95 \cdot 12,89 = 244,26 \text{ м}^2$.

Тепер необхідно розрахувати площу лабораторії в якій також знаходиться бокс: $12,89 \cdot 3,5 = 45,12 \text{ м}^2$.

Розрахуємо загальну площу стін, яка буде піддаватися миттю: враховуємо, що стіни миються на висоту 2,5 метри: $(12,89 \cdot 4 + 22,45 \cdot 2 + 2 \cdot 4) \cdot 2,5 = 261,15 \text{ м}^2$.

Узагальнені дані щодо розрахованої площі приміщень та стін наведені у *табл. 5.3.2*.

**Розрахунок загальної площі приміщень та стін для виробництва
ПГБ культури *S. necator* H16**

Приміщення	Обладнання	Площа приміщення, м²	Площа стін, м²
Цех з виробничого біосинтезу	Інокулятор на 20 л, реактор на 120 л, інокулятор на 200 л, реактор на 100 л, реактор на 1,2 м ³ , посівний апарат об'ємом 2 м ³ , збірник об'ємом 0,5 м ³ , реактор на 15 м ³ , ферментер об'ємом 20 м ³ , збірники об'ємом по 50 л та 20 л, збірники на 50 л та 500 л.	244,26	159,2
Лабораторія	Бокс, холодильники, лабораторний посуд, прилади для проведення контролю на чистоту та для ідентифікації тощо	45,12	101,95
Всього:		289,38	261,15

Тепер ми маємо всі дані, для того аби розрахувати кількість миючих та дезінфікуючих засобів. Обладнання необхідно обробляти та мити кожного виробничого циклу, тобто 92 рази на рік. Підлогу миємо та дезінфікуємо кожного робочого дня, тобто 330 разів на рік. Двері, вікна та стіни потрібно мити раз на місяць під час генерального прибирання, тобто 11 разів на рік.

Узагальнені дані щодо площі, яка буде піддаватися миттю та дезінфекції наведені у *табл. 5.3.3.*

Розрахунок загальної площі об'єктів, які будуть оброблятися за весь період виробництва ПГБ мікроорганізмом *S. necator* H16

Об'єкт, який потребує миття чи дезінфекції	Площа об'єкту, який обробляємо, м ²	Кількість циклів обробки за рік	Загальна площа об'єкту протягом року виробництва, м ²
Стіни, двері та вікна	261,15	11	2872,65
Підлога	289,38	330	96495,40
Обладнання	39,76	92	3657,92

Важливою частиною роботи будь-якого підприємства є постійна дезінфекція та боротьба з патогенною мікрофлорою. Тривала експлуатація приміщень призводить до накопичення патогенних та умовнопатогенних мікроорганізмів, які з часом звикають до діючих методів обробки, тому завданням будь-якого виробництва є розробка комплексних заходів, які будуть перешкоджати накопиченню сторонньої мікрофлори [67].

На території України всі мийно-дезінфікуючі засоби мають володіти не лише бактерицидними властивостями та відповідними фізико-хімічними показниками, а й бути не токсичними та не чинити шкідливого впливу на навколишнє середовище.

На сьогодні виникли нові проблеми при підборі мийно-дезінфікуючих засобів, адже до більшості з них, мікроорганізми адаптувалися, а також при тривалому використанні таких засобів, виникає шкідлива дія на організм людини. Тому важливо підібрати нешкідливий засіб [68].

Існують загальні вимоги до деззасобів, незалежно від місця його використання:

✓ застосовувати потрібно лише засоби, які належать до 3 або 4 класу токсичних речовин;

✓ засоби, які розташовані на підприємстві повинні мати маркувальні етикетки, в яких зазначена назва, відсоткова концентрація, дата приготування та термін придатності розчину;

✓ усі засоби, які використовуються в роботі, мають бути сертифікованими та зареєстрованими на території України та відповідати її Державним стандартам. Також необхідні детальні методичні рекомендації з використання;

✓ персонал, який має доступ до використання засобів, повинен пройти детальний інструктаж щодо роботи та приготування, таких засобів;

✓ під час приготування розчину необхідної концентрації важливо, щоб виконавець використовував ЗІЗ згідно вимог виробника [69].

Підприємство повинно мати три мийно-дезінфікуючі засоби, які будуть чергуватися кожен місяць, таким чином знижується ймовірність звикання мікроорганізмів до обробки. Нижче наведено опис та склад мийно-дезінфікуючих засобів та засобів для обробки рук персоналу. Оптимально обирати засоби, які є водночас як і мийними так і дезінфікуючими. Усі засоби, опис яких наведено, були обрані з Державного реєстру дезінфекційних засобів, тому всі вони дозволені до використання [70].

Засіб дезінфікуючий MDA 72 – ефективний засіб на основі ізопропілового спирту та комплексу ЧАС, використовують для обробки та знежирення рук персоналу, шкіри, поверхонь. Діє протягом трьох годин, не вимагає змивання. Активний проти вірусних, бактеріальних та грибкових збудників. Придатний лише для зовнішнього використання. Придатний для використання на всіх типах підприємств: фармацевтичної, хімічної, біотехнологічної, харчової промисловості, у закладах освіти, спортивно-оздоровчих, медичних, санаторно-оздоровчих закладах тощо [71].

Засіб дезінфекційний «SterillPlus» – на основі 70% ізопропілового спирту, ідеально підходить для обробки рук персоналу та поверхонь. Не дає ефекту липкості та не потребує змивання. Засіб потрібно нанести на руки та розтирати протягом 20-30 секунд. Володіє моментальним ефектом очищення

та активний проти 99,9% шкідливих мікроорганізмів. Дозволений до використання на підприємствах різних типів (промислових, біотехнологічних, хімічних харчових), а також у закладах освіти, охорони здоров'я, спорту, розвитку, харчування тощо [72].

Засіб дезінфекційний «Ароміл Гідрожель Рапід» (спирт етиловий 67,5-70,0%, перекис водню 0,1-0,2%) – готовий спиртовий прозорий розчин, який призначений для обробки рук персоналу, поверхонь та інвентарю на мікробіологічних, харчових, промислових підприємствах, закладах охорони здоров'я тощо.

Ефективний при дезінфекції невеликих за площею поверхонь та інвентарю. Широко використовується в санпропускниках медичних закладів, харчових, промислових, аграрних підприємствах тощо. Ефективний проти бактерій, включаючи туберкульозну паличку, вірусів та грибів. Чинить пролонговану антимікробну дію, яка зберігається протягом трьох годин. Не викликає алергічної реакції [73].

Засіб «Санокварт» (ЧАС) – рідкий концентрат на основі ЧАС з миючим та дезінфікуючим ефектом, підходить для очищення всіх поверхонь та обладнання. Вважається безпечним для персоналу та людей, які з ним контактують, адже його рецептура низькотоксична, бо не містить альдегідів, фенолів та не чинить сенсibilізуючої дії [75].

Ефективний проти бактерії, включаючи туберкульозну паличку, вірусів, зокрема вірусів гепатиту, ВІЛ та рота-вірусів, а також грибів роду *Candida*. Ідеально підходить для дезінфекції та миття інвентарю, виробів медичного призначення, поверхонь усіх типів – стіни, двері, підлога, стеля, обладнання, прибирального інвентарю тощо.

Поверхні обладнання дезінфікують шляхом їх обприскування робочим розчином або протиранням вологою ганчіркою, змоченою в робочому розчині. Поверхні приміщення (стіни, стелю, підлогу) протирають бавовняною безворсовою ганчіркою або за допомогою мопів (мікрофіброві насадки), при цьому витрати розчину становлять 12 мл на м². Інвентар дезінфікують шляхом

занурення в робочий розчин. Очищення можна проводити й у присутності сторонніх осіб.

Заборонено приймати розчин всередину та уникати контакту з очима. Місця контакту розчину зі шкірою потрібно ретельно промивати великою кількістю води, працювати у захисних засобах. Не можна використовувати із засобами, які містять аніонні ПАВ [76].

«Dezaldum 20» (алкілдиметилбензиламоній хлорид – 16,5–19,75%; глутаровий альдегід – 10,5–11,5%) засіб дезінфікуючий з мийним ефектом – призначений для миття та дезінфекції робочих поверхонь та обладнання на харчових, біотехнологічних, фармацевтичних, промислових підприємствах, а також закладах харчування, освіти, відпочинку, спорту та культури [77].

Ефективний проти грам (+) та грам (-) бактерій, чинить противірусну дію до різних вірусів, зокрема поліомієліту, грипу, ВІЛ, кору, паротиту, вірусних гепатитів, коронавірусу SARS-CoV-2, Коксакі та багатьох інших.

Використовують розчин шляхом протирання, обприскування, змочення або занурювання обладнання, поверхонь та інвентарю. Кількість концентрату для приготування та кількість води вказані в методичних рекомендаціях. Заборонено використовувати разом з натуральними та синтетичними милами.

Заборонений контакт засобу зі слизовими оболонками та вживання всередину. У разі потрапляння засобу до шлунково-кишкового тракту, негайно звернутися до лікаря. Працювати з розчином потрібно із ЗІЗ [78].

Засіб дезінфекційний «Дезаква –Аноліт» (хлорноватиста кислота, високоактивні кисневі сполуки хлору, вільні радикали хлору та кисню (HClO ; ClO_2 ; ClO^- ; O_3 ; H_3O^{+2} ; H_3O^{+} ; O_2 ; Cl_0 ; NaCl) – анодна рідина, яку отримують шляхом електролізу кухонної солі та води, в результаті чого в анодній зоні концентруються сильні окисники: хлоридні радикали – діоксид хлору та гіпохлоритна кислота, а також кислотні радикали – кисень, озон та перекис водню. Даний розчин забезпечує відсутність привикання мікроорганізмів до його дії. Володіє антимікробним та дезінфікуючим ефектом [79].

Даний засіб володіє сильною антимікробною дією проти всіх патогенних мікроорганізмів та спор, за мінімальної концентрації 0,05% знищує спори сибірської язви протягом кількох секунд.

Аноліт нетоксичний, неалергенний, негорючий, не має властивості до накопичення у навколишньому середовищі, не потребує змивання після обробки, багатофункціональний, володіє високою протимікробною, противірусною та протигрибковою дією.

Засіб не токсичний, безпечний при потраплянні на шкіру та навіть при потраплянні всередину [80].

Отже, для обробки рук персоналу будемо використовувати антисептичні засоби MDA 72 та SterillPlus. Допоміжний інвентар (совки, шпателі, ваги, мірні ложки тощо) будемо обробляти дезінфекційним засобом «Ароміл Гідрогель Репід». Обладнання та поверхні приміщення (стіни, вікна, двері столи) будемо обробляти такими засобами як Санокварт, «Dezaldum 20» та «Дезаква –Аноліт». Засоби для обробки поверхонь та обладнання мають різну цінову політику, але використовувати ми будемо всі, чергуючи їх кожного місяця для уникнення звикання мікроорганізмами.

Узагальнені дані щодо концентрації обраних мийно-дезінфікуючих засобів та витрат на їх приготування для синтезу ПГБ за допомогою *Cupriavidus necator* H16 наведені нижче у табл. 5.3.4.

Узагальнена таблиця щодо концентрації обраних мийно-дезінфікуючих засобів та витрат на їх приготування

Назва мийного/дезінфікуючого засобу (діючі речовини)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину	Загальна площа миття за весь цикл виробництва, м²	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Засіб мийний з дезінфікуючим ефектом Санокварт ¹	Поверхні, приміщення, обладнання	2%	103026	10302,6	290	5,8	59755
Засіб дезінфікуючий з мийним ефектом «Dezaldum 20» ²	Поверхні, приміщення, обладнання	0,25%	103026	10302,6	170,4	0,43	4431
Засіб дезінфекційний «Дезаква –Аноліт» ³	Поверхні, приміщення, обладнання	0,05%	103026	10302,6	190	0,1	1030,3
Джерела інформації: 1 - https://mydez.com.ua/p1675317803-famidez-sanokvart-famidez.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjw8pKxBhD_ARIsAPrG45naICh8ThrBktyzWyfnE1nVe78x26nVjrosy5_vGbnk7NO2GxOWiwaAj8KEALw_wcB ; 2 - https://atma.ua/profesijna-himiya/dezynfektsiya/zasib-dezinfikuyuchyj-dlya-poverhon-dezaldum-20-5l-da015000/ ; 3 - https://prom.ua/ua/p1160215165-dezinfitsiruyushee-sredstvo-dezakva.html							

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

Згідно розрахунків, які були проведені у попередньому розділі, виробничий біосинтез полігідроксибутирату здійснюють у ферментері об'ємом 20 м³, що містить 10,88≈11 м³ поживного середовища. Отримання інокуляту включає в себе чотири послідовні стадії: I – у колбах на качалці; II – інокулятор об'ємом 200 л; III – інокулятор об'ємом 20 л; IV – посівний апарат об'ємом 2 м³.

Для виробничого біосинтезу полігідроалканоатів *S. necator* ATCC 17697 використовують поживне середовище наступного складу (г/л) [28]:

- Фруктоза – 20;
- (NH₄)₂SO₄ – 1,5;
- KH₂PO₄ – 4,35;
- NaH₂PO₄ – 4,35;
- MgSO₄·7H₂O – 0,5;
- Розчин мікроелементів – 2 мл, що містить (г/100 мл): FeSO₄·7H₂O – 0,2; MnCl₂·4H₂O – 0,003; CaCl₂·2H₂O – 0,2; CuCl₂·2H₂O – 0,001; ZnSO₄·7H₂O – 0,01; H₃BO₃ – 0,03; CoCl₂·7H₂O – 0,02; NiCl₂·6H₂O – 0,0002; Na₂MoO₄·2H₂O – 0,003;
- рН – 7,0.

Середовище для підживлення для етапу виробничого біосинтезу (г/л):

- Фруктоза – 20;
- (NH₄)₂SO₄ – 1,5.

Отже, для вирощування інокуляту у колбах на качалці, стерилізація поживного середовища буде здійснюватися через невеликі об'єми поживного середовища (1,1 л) в автоклаві. Поживне середовища для отримання інокуляту в інокуляторах об'ємами 20, 200, 2000 л та для виробничого біосинтезу будемо здійснювати безпосередньо в апаратах при рН 7,0.

Для оптимізації технологічного процесу стерилізацію поживних середовищ для посівних апаратів об'ємом 20, 200 та 2000 л, а також

виробничого ферментеру об'ємом 20 м³, фосфорні солі стерилізують разом з основними солями. Для того, щоб уникнути утворення осадів, рН середовища контролюють на рівні 4 – 4,5, шляхом додавання 6%-ого розчину соляної кислоти.

Також варто врахувати, що культивування здійснюють при нейтральному рН, яке має зберігатися на рівні 7,0. Тому перед внесенням посівного матеріалу потрібно підлужнити поживне середовище, для цього вносять стерильний розчин NaOH з концентрацією 6%.

Для того, щоб процес виробництва полігідроксибутирату був економічно вигіднішим, розраховуємо об'єми деяких компонентів, які будемо вносити в середовище, зокрема вміст титрувальних розчинів HCl та NaOH (табл. 5.4.1). Зазначимо, що 6%-ий розчин NaOH готується окремо для кожної стадії.

Додатково проведемо розрахунок вмісту мікроелементів для кожної стадії вирощування посівного матеріалу та стадії виробничого біосинтезу (табл. 5.4.2).

З наведеної таблиці можемо зробити висновок, що необхідно приготувати розчин мікроелементів об'ємів 300 мл для чотирьох стадій культивування, адже наважки занадто малі для зважування на вагах для кожної стадії окремо. Даний розчин готуємо в колбі об'ємом 500 мл, розчин стерилізують в автоклаві.

Також для підживлення на 25 годині культивування вносять (NH₄)₂SO₄ та фруктозу у концентрації 1,5 г/л та 20 г/л відповідно. Для виробничого біосинтезу необхідно 16,5 кг солі та 220 кг фруктози. Необхідно приготувати 330 л розчину фруктози, готуємо його в збірнику об'ємом 0,5 м³ та стерилізуємо у цьому ж апараті при температурі 112°C, впродовж 30 хв. Також необхідно приготувати 38,5 л розчин (NH₄)₂SO₄, готуємо його в збірнику об'ємом 50 л та стерилізуємо у цьому ж апараті при 131°C, впродовж 40 хв

Таблиця 5.4.1

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища

Об'єм середовища л	HCl (6%)		NaOH	
	Об'єм мл	Особливість приготування	Об'єм мл	Особливість приготування
1,1	-	-	-	-
11	22	колба на 50 мл	22	у колбі об'ємом 100 мл
110	220	колба на 250 мл	220	у колбі об'ємом 500 мл
1100	2200	колба на 3 л	2200	у колбі на 3 л
11000	22000	у реакторі об'ємом 50 л	22000	у реакторі об'ємом 30л

* – простерилізований 6%-ий розчин NaOH додають у кількості 2 л на 1м³ середовища; 6%-ий розчин HCl додають у кількості 2 л на 1м³ середовища.

Таблиця 5.4.2.

Розрахунок вмісту мікроелементів в різних об'ємах поживного середовища

Мікроелементи	Концентрація мг(мкг)/ л	Об'єм середовища, л				
		1,1	11	110	1100	11000
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2 мг	2,2 мг	22 мг	220 мг	2,2 г	22 г
MnCl ₂ ·4H ₂ O	30 мкг	33 мкг	330 мкг	3,3 мг	33 мг	330 мг
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2 мг	2,2 мг	22 мг	220 мг	2,2 мг	22 г
CuCl ₂ ·2H ₂ O	10 мкг	11 мкг	110 мкг	1,1 мг	11 мг	110 мг
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	100 мкг	110 мкг	1,1 мг	11мг	110 мг	1,1 г
H ₃ BO ₃	300 мкг	330 мкг	3,3 мг	33 мг	330 мг	3,3 г
CoCl ₂ ·7H ₂ O	200 мкг	220 мкг	2,2 мг	22 мг	220 мг	2,2 г
NiCl ₂ ·6H ₂ O	20 мкг	22 мкг	220 мкг	2,2 мг	22 мг	220 мг
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	30 мкг	33 мкг	330 мкг	3,3 мг	33 мг	330 мг
Спосіб приготування	-	3 л розчину у колбі V=5л*	3 л розчину у колбі V=5л*	3 л розчину у колбі V=5л*	3 л розчину у колбі V=5л*	Входить до композиції солей

* – спільна підготовка для трьох стадій

Готовий стерильний розчин зберігають у лабораторії і додають необхідну кількість до розчину солей перед стерилізацією на відповідному етапі культивування. Для приготування поживного середовища виробничого культивування у ферментері об'ємом 20 м³ об'єднаємо мікроелементи з композицією солей, адже за даних об'ємів поживного середовища маси наважок є достатніми для точного зважування.

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

Так як у складі поживного середовища присутні термолабільні речовини, які потребують м'якого режиму стерилізації, а також присутні солі, які здатні випадати в осад, доцільно поділити поживне середовище на композиції.

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

Композиція Б: K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 (режим стерилізації: 131°C, впродовж 40 хв).

Композиція В: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131°C, впродовж 40 хв).

Так як фруктоза (композиція А) є вуглеводом і відповідно являється термолабільним компонентом, тому потребує м'якого режиму стерилізації. Окремо будемо стерилізувати (композиція Б) фосфатні солі, адже вони мають здатність утворювати нерозчинні фосфати магнію. Солі, зазначені в композиції В, стерилізуються за стандартних умов для всіх солей. Стерилізацію всіх композицій проведемо в автоклаві, через невеликі об'єми середовища.

Також необхідно врахувати, що до складу поживного середовища входять мікроелементи, які містяться в надзвичайно низьких кількостях, тому їх не вводять до складу композицій з іншими солями, а готують запасний розчин мікроелементів об'ємом 300 мл. Розчин мікроелементів стерилізують також в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хв.

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в посівних апаратах об'ємом 20 та 200 л

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 20 літрів

Для цього етапу нам необхідно 11,1 літрів поживного середовища, тому поділимо компоненти середовища на інші композиції.

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

Композиція Б: KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131°C, впродовж 40 хв, рН – 4,0 – 4,5).

Солі з композиції Б розчиняють в збірнику, адже умови стерилізації, відрізняються від умов стерилізації композиції А. Об'єднаємо фосфорні та основні солі в одну композицію Б, яку спочатку потрібно розчини в окремому збірнику об'ємом 20 л, потім додати запасний розчин мікроелементів. Для того, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію, рН середовища доводять до позначки 4 – 4,5 6%-вим розчином HCl . Солі композиції Б розчинаємо в окремому збірнику, після чого подаємо в інокулятор та стерилізуємо при звичайній для солей температурі. Композицію А стерилізуємо в реакторі-змішувачі.

Перед культивуванням зі збірника додають розчин фруктози, а рН середовища контролюють на рівні 7,0 стерильним 6%-им розчином NaOH .

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 200 літрів

Для цього етапу нам необхідно 111 літрів поживного середовища, тому поділимо компоненти середовища на інші композиції.

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

Композиція Б: KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131°C, впродовж 40 хв, рН – 4,0 – 4,5).

Солі з композиції Б розчиняють в збірнику, адже умови стерилізації, відрізняються від умов стерилізації композиції А. Об'єднаємо фосфорні та основні солі в одну композицію Б, яку спочатку потрібно розчини в окремому збірнику об'ємом 20 л, потім додати запасний розчин мікроелементів. Для того, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію, рН середовища

доводять до позначки 4 – 4,5 6%-вим розчином HCl. Солі композиції Б розчинаємо в окремому збірнику, після чого подаємо в інокулятор та стерилізуємо при звичайній для солей температурі. Композицію А стерилізуємо в реакторі-змішувачі.

Перед культивуванням зі збірника додають розчин фруктози, а рН середовища контролюють на рівні 7,0 стерильним 6%-им розчином NaOH.

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в посівному апараті об'ємом 2 м³

На даному етапі нам необхідно 1,09 м³ ≈ 1,1 м³ поживного середовища. Для цього середовище ділять на наступні композиції:

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

Композиція Б: KН₂PO₄, NaН₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O, MnCl₂·4H₂O, CaCl₂·2H₂O, CuCl₂·2H₂O, ZnSO₄·7H₂O, H₃BO₃, CoCl₂·7H₂O, NiCl₂·6H₂O, Na₂MoO₄·2H₂O (режим стерилізації: 131°C, впродовж 40 хв, рН – 4,0 – 4,5 за допомогою розчину HCl). Солі композиції Б розчинаємо в окремому збірнику, після чого подаємо в інокулятор та стерилізуємо при звичайній для солей температурі. Композицію А стерилізуємо в реакторі-змішувачі.

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 20 м³

На даному етапі нам необхідно 10,88 м³ ≈ 11 м³ поживного середовища. Такий об'єм поживного середовища доцільно стерилізувати в установці безперервної стерилізації, а саме в УБС-15, продуктивністю 15 м³/год. Температура стерилізації буде становити 130 °С. Час стерилізації складатиме 1 година 36 хвилин. Для приготування поживного середовища поділимо його компоненти на наступні композиції, незважаючи на те, що всі компоненти стерилізуватимуть разом.

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

Композиція Б: KН₂PO₄, NaН₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O, MnCl₂·4H₂O, CaCl₂·2H₂O, CuCl₂·2H₂O, ZnSO₄·7H₂O, H₃BO₃, CoCl₂·7H₂O,

$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131°C , впродовж 40 хв, рН – 4,0 – 4,5 за допомогою розчину HCl).

Розчини усіх компонентів готуються в одному реакторі-змішувачі, спочатку розчиняють фруктозу, після цього подають всі інші компоненти.

Для регуляції рН на етапах вирощування інокуляту в інокуляторах об'ємом 20 та 200 літрів, посівному апараті 2 м^3 а також виробничому ферментері об'ємом 20 м^3 використовують 6%-ві розчини NaOH та HCl . HCl додають аби уникнути випадання осадів фосфорних та основних солей під час стерилізації композиції до якої вони входять, а розчином NaOH підтримуємо оптимальне значення рН для культивування *S. necator* ATCC 17697.

5.5. Узагальнення до підрозділу 5.4

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки посівного матеріалу, включає такі додаткові стадії:

- ✓ підготовка аераційного повітря та очистка відпрацьованого;
- ✓ приготування 6%-го розчину HCl , для підкислення середовища в інокуляторі об'ємом 20 та 200 л, посівному апараті об'ємом 2 м^3 та виробничому ферментері 20 м^3 ;
- ✓ приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH , для підкислення середовища в інокуляторі об'ємом 20 та 200 л, посівному апараті об'ємом 2 м^3 та виробничому ферментері 20 м^3 ;
- ✓ приготування та стерилізація розчину мікроелементів для вирощування інокуляту у колбах на качалках, в інокуляторі об'ємом 20 та 200 л та посівному апараті об'ємом 2 м^3 ;
- ✓ приготування розчину фруктози та $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ для підживлення в окремих збірниках.

Окрім основних збірників для розчинення композицій солей, що встановлені перед ферментерами, варто передбачити такі ємності:

- ✓ реактор-змішувачі для приготування фруктози об'ємом 10 л та 100 л;
- ✓ збірники для розчинення солей об'ємом 10 л, 120 та 1200 л.

В цеху виробничого біосинтезу:

- ✓ реактор-змішувач об'ємом 500 л для стерилізації композиції А перед подачею у виробничий ферментер;
- ✓ реактор-змішувач об'ємом 15 м² для змішування компонентів композиції Б перед подачею у ферментер;
- ✓ 20 літровий збірник для приготування 6%-го NaOH;
- ✓ 50 літровий збірник для приготування 6%-го HCl;
- ✓ 50 літровий збірник для приготування (NH₄)₂SO₄ для підживлення;
- ✓ 0,5 м³ збірник для приготування розчину фруктози для підживлення.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень [1]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр Ppaa Фільтруючий матеріал - пінополіуретан Пропускна здатність – 1500-2000 л/хв Е= 80-90%. Виробник – “ Ppaa ” (Україна) [2]
К-3	Компресор	1	Компресор модель NX-75HC Робочий тиск 7-12 бар, потужність 20 м ³ /хв. Виробник – «Volaitе» (Китай) [3]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Гібридний теплообмінник APV Робочий тиск – 1-32 бар Поверхня теплообміну – 436 м ² Виробник – «Тапфло» (Україна) [4]
Рс-5	Ресивер	1	Ресивер РВ 500.11.00 Робочий тиск до 10 атм Об'єм – 5 м ³ Виробник – "Летісс компресор" (Україна) [5]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Гібридний теплообмінник APV Робочий тиск – 1-32 бар Поверхня теплообміну – 436 м ² Виробник – «Тапфло» (Україна) [4]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Фільтр NFC. Ефективність очистки – 95%. HDPE / нетканый синтетичний / скловолокно. Температура до 145 °С Виробник – "Netfil" (Індія)[6]
ФІ-8	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр тонкої очистки HF 0095 Фільтруючий матеріал – скловолокно Продуктивність – до 20 м ³ /год Максимальний тиск – 16 атм Ступінь очистки – 0,01 мкм Е=99,99% Виробник “ОМІ” (Італія) [7]

					НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ		
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розраб</i>		<i>Зюзько О.Л.</i>			<i>Літера</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Пров</i>		<i>Стадніков В.П.</i>				65	127
<i>Н. Контр.</i>					65		
<i>Затв.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>			Кафедра БТМ		
					РОЗДІЛ 6 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ		

Продовження таблиці 6.1.

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
P-9	Реактор-змішувач для солей композиції Б (10 л)	1	Реактор-змішувач об'ємом 10 л, з високоякісного боросилікатного скла; оснащений перемішувальним пристроєм, всередині – нержавіюча сталь, а зовні – титан, швидкість перемішування 680 об/хв Виробник – «Титан Технікс» (Україна) [9]
ІН-10	Інокулятор (20 л)	1	Інокулятор робочим об'ємом 20 л, загальний об'єм становить 23 л, оснащений сорочкою та мішалкою з магнітним приводом австрійського фірми ZETA; швидкість перемішування 500 об/хв; габаритні розміри, мм: довжина/ширина/висота: 1085/600/1150 Виробник – «ПРОМВІТ» (Україна) [10]
ФІ-11	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр тонкої очистки HF 0095 Фільтруючий матеріал – скловолокно Продуктивність – до 20 м ³ /год Максимальний тиск – 16 атм Ступінь очистки – 0,01 мкм E=99,99% Виробник «ОМІ» (Італія) [7]
Д-12	Об'ємно-ваговий дозатор		Ваговий дискретний дозатор-виратомір для дозування сипких продуктів Продуктивність: до 500 кг/год Точність зважування - 0,1% Виробник – "Техноваги" (Україна) [8]
P-13	Реактор-змішувач для композиції А (10 л)	1	Реактор-змішувач об'ємом 10 л, з високоякісного боросилікатного скла; оснащений перемішувальним пристроєм, всередині – нержавіюча сталь, а зовні – титан, швидкість перемішування 680 об/хв Виробник – «Титан Технікс» (Україна) [9]
Д-14	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Ваговий дискретний дозатор-виратомір для дозування сипких продуктів Продуктивність: від 1 до 500 кг/год Точність зважування - 0,1% Виробник – "Техноваги" (Україна) [8]
P-15	Реактор-змішувач для солей композиції Б (120 л)	1	Реактор-змішувач об'ємом 120 л; оснащений перемішувальним пристроєм та нагрівальною сорочкою; швидкість перемішування 940 об/хв Виробник – «Lampart» (Угорщина) [11];

Продовження таблиці 6.1.

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Н-16	Відцентровий насос для перекачування солей від З-16 до ІН-17	1	Насос відцентровий AQUATICA 4QJD7-15-1.8; матеріал – нержавіюча сталь; максимальний тиск – до 6 бар; продуктивність – 140 л/хв Виробник – «AQUATICA» (Україна) [10]
ІН-17	Інокулятор (200 л)	1	Інокулятор об'ємом 200 л; матеріал - нержавіючої сталі SUS316L; оснащений перемішувальним пристроєм; швидкість перемішування 50 – 680 об/хв Виробник – «Smart way plus» (Україна) [12]
ФІ-18	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр тонкої очистки HF 0095 Фільтруючий матеріал – скловолокно Продуктивність – до 20 м ³ /год Максимальний тиск – 16 атм Ступінь очистки – 0,01 мкм Е=99,99% Виробник “ОМІ” (Італія) [7]
Д-19	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Ваговий дискретний дозатор-виратомір для дозування сипких продуктів Продуктивність: до 500 кг/год Точність зважування - 0,1% Виробник – "Техноваги" (Україна) [8]
Р-20	Реактор-змішувач для композиції А (100 л)	1	Реактор-змішувач об'ємом 100 л; матеріал - нержавіючої сталі AISI 4; оснащений перемішувальним пристроєм; габарити: висота-1100 мм, діаметр-570 мм Виробник – «Wise master» (Україна) [13]
Н-21	Насос відцентровий для перекачування композиції А від Р-20 до ПА-25	1	Насос відцентровий AQUATICA 4QJD7-15-1.8; матеріал – нержавіюча сталь; максимальний тиск – до 6 бар; продуктивність – 140 л/хв Виробник – «AQUATICA» (Україна) [10]
Д-22	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Ваговий дискретний дозатор-виратомір для дозування сипких продуктів Продуктивність: до 500 кг/год Точність зважування - 0,1% Виробник – "Техноваги" (Україна) [8]

Продовження таблиці 6.1.

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
P-23	Реактор-змішувач для композиції Б (1200 л)	1	Реактор-змішувач об'ємом 1200 л, оснащений мішалкою італійського виробництва; швидкість перемішування 0 – 300 об/хв; габаритні розміри, мм: довжина/діаметр/висота: 1500/1400/2500 Виробник – «ПРОМВІТ» (Україна) [14]
H-24	Насос відцентровий для перекачування композиції Б від З-23 до ПА-25	1	Насос відцентровий AQUATICA 4QJD7-15-1.8; матеріал – нержавіюча сталь; максимальний тиск – до 6 бар; продуктивність – 140 л/хв Виробник – «AQUATICA» (Україна) [10]
ПА-25	Посівний апарат	1	Посівний апарат оснащений паровою сорочкою Матеріал – нержавіюча сталь AISI 304 Геометричний об'єм 2000 л Швидкість перемішування до 200 об/хв Габарити: висота-1600 мм, діаметр-800 мм Виробник – Czech Brewery System (Чехія) [15]
ФІ-26	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр тонкої очистки HF 0095 Фільтруючий матеріал – скловолокно Продуктивність – до 20 м ³ /год Максимальний тиск – 16 атм Ступінь очистки – 0,01 мкм E=99,99% Виробник “ОМІ” (Італія) [7]
Д-27	Об'ємно-ваговий дозатор для композиції А	1	Ваговий дискретний дозатор-витратомір для дозування сипких продуктів Продуктивність: до 500 кг/год Точність зважування - 0,1% Виробник – "Техноаги" (Україна) [8]
Д-28	Об'ємно-ваговий дозатор для композиції Б	1	Ваговий дискретний дозатор-витратомір для дозування сипких продуктів Продуктивність: до 500 кг/год Точність зважування - 0,1% Виробник – "Техноаги" (Україна) [8]
Д-29	Об'ємний дозатор для приготування 6%-го розчину НСІ	1	Ваговий дискретний дозатор-витратомір для дозування сипких продуктів Продуктивність: до 500 кг/год Точність зважування - 0,1% Виробник – "Техноаги" (Україна) [8]

Продовження таблиці 6.1.

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
3-30	Збірник для розчину НСІ (50 л)	1	Реактор-змішувач об'ємом 50 л; матеріал - нержавіючої сталі AISI 304, 316 L; оснащений перемішувальним пристроєм; швидкість перемішування 10 – 240 об/хв; габарити: висота-1900 мм, діаметр-750 мм Виробник – «BioStar» (Китай) [16]
Н-31	Відцентровий насос для перекачування НСІ від 3-30 до Р-32	1	Насос відцентровий AQUATICA 4QJD7-15-1.8; матеріал – нержавіюча сталь; максимальний тиск – до 6 бар; продуктивність – 140 л/хв Виробник – «AQUATICA» (Україна) [10]
Р-32	Реактор змішувач для композицій А перед подачею у ферментер	1	Реактор-змішувач об'ємом 500 л; матеріал - нержавіючої сталі AISI 304; оснащений перемішувальним пристроєм; габарити: висота-1320 мм, діаметр-800 мм Виробник – «Wise master» (Україна) [17]
Н-33	Насос відцентровий для подачі композицій з Р-32 до ФР-47	1	Насос відцентровий AQUATICA 4QJD7-15-1.8; матеріал – нержавіюча сталь; максимальний тиск – до 6 бар; продуктивність – 140 л/хв Виробник – «AQUATICA» (Україна) [10]
Р-32.1	Реактор змішувач композицій Б перед подачею у ферментер	1	Реактор-змішувач об'ємом 15 м ³ ; матеріал - нержавіючої сталі 316 L; оснащений перемішувальним пристроєм; швидкість перемішування 10 – 240 об/хв; габарити: довжин -2300 мм, діаметр-3540 мм Виробник – «PERRY WIDEX EQUIPMENT COMPANY» (США) [18]
Н-34	Насос відцентровий для подачі ПС з Р-32.1 до Ф-47	1	Насос відцентровий Grundfos NS 30-30 3x400V; матеріал – чавун; максимальний тиск – до 6 бар; продуктивність – 18 м ³ /год Виробник – «Grundfos» (Італія) [19]
Д-35	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Ваговий дискретний дозатор-витратомір для дозування сипких продуктів Продуктивність: до 500 кг/год Точність зважування - 0,1% Виробник – "Техноаги" (Україна) [8]

Продовження таблиці 6.1.

1	2	3	4
P-36	Реактор-змішувач для натрій гідроксиду	1	Інокулятор робочим об'ємом 20 л, загальний об'єм становить 23 л, оснащений сорочкою та мішалкою з магнітним приводом австрійського фірми ZETA; швидкість перемішування 500 об/хв; габаритні розміри, мм: довжина/ширина/висота: 1085/600/1150 Виробник – «ПРОМВІТ» (Україна) [10]
H-37	Відцентровий насос для подачі натрій гідроксиду від P-37 до Ф-46	1	Насос відцентровий AQUATICA 4QJD7-15-1.8; матеріал – нержавіюча сталь; максимальний тиск – до 6 бар; продуктивність – 140 л/хв Виробник – «AQUATICA» (Україна) [10]
ФІ-38	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр тонкої очистки HF 0095 Фільтруючий матеріал – скловолокно Продуктивність – до 20 м ³ /год Максимальний тиск – 16 атм Ступінь очистки – 0,01 мкм E=99,99% Виробник «ОМІ» (Італія) [7]
Д-39	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Ваговий дискретний дозатор-витратомір для дозування сипких продуктів Продуктивність: до 500 кг/год Точність зважування - 0,1% Виробник – "Техноваги" (Україна) [8]
З-40	Збірник розчину фруктози для підживлення на етапі виробничого біосинтезу	1	Реактор-змішувач об'ємом 500 л; матеріал - нержавіючої сталі AISI 304; оснащений перемішувальним пристроєм; габарити: висота-1320 мм, діаметр-800 мм Виробник – «Wise master» (Україна) [17]
H-41	Відцентровий насос для подачі розчину від З-41 до Ф-46	1	Насос відцентровий AQUATICA 4QJD7-15-1.8; матеріал – нержавіюча сталь; максимальний тиск – до 6 бар; продуктивність – 140 л/хв Виробник – «AQUATICA» (Україна) [10]
Д-42	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Ваговий дискретний дозатор-витратомір для дозування сипких продуктів Продуктивність: до 500 кг/год Точність зважування - 0,1% Виробник – "Техноваги" (Україна) [8]
З-43	Збірник розчину (NH ₄) ₂ SO ₄	1	Реактор-змішувач об'ємом 50 л; матеріал - нержавіючої сталі AISI 304, 316 L; оснащений перемішувальним пристроєм; швидкість перемішування 10 – 240 об/хв; габарити: висота-1900 мм, діаметр-750 мм Виробник – «BioStar» (Китай) [16]

Закінчення таблиці 6.1.

1	2	3	4
Н-44	Відцентровий насос для подачі розчину від З-44 до Ф-46	1	Насос відцентровий AQUATICA 4QJD7-15-1.8; матеріал – нержавіюча сталь; максимальний тиск – до 6 бар; продуктивність – 140 л/хв Виробник – «AQUATICA» (Україна) [10]
Ф-45	Ферментер	1	Ферментер оснащений паровою сорочкою Геометричний об'єм 20 м ³ Швидкість перемішування до 200 об/хв Габарити: висота-3600 мм, діаметр-2000 мм Виробник – «Micent Innovation For Everyone» (Китай) [20]
Н-46	Відцентровий насос	1	Насос відцентровий Grundfos NS 13-18 1x230V; матеріал – чавун; максимальний тиск – до 6 бар; продуктивність – 36 м ³ /год Виробник – «Grundfos» (Італія) [21]

Примітка.* Пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел:

2. <https://povitrya.com.ua/product/prana-filtry/>
3. <http://www.rig620.com/product/5225824.html>
4. <https://tapflo.ua/ua/products-2/teploobmenniki#spetsialne-vikonannya>
5. https://letiss.com.ua/ua/resiveri_ua/povitryaniy-vertikalniy-resiver-rv-5001100
6. http://www.netfil-ind.com/index.php?option=com_content&view=article&id=32&Itemid=146
7. <https://snabzhenie.com.ua/uk/hf-0095-1-1-2-filtr-tonkogo-ochischennya-stisnenogo-povitrya-04a.0570.h.html>
8. <https://www.vostok.dp.ua/ukr/catalog/scale/doza/product.html?id=4117>
9. <https://hms-ua.com/p1445439783-steklyannyj-reaktor-rubashkoj.html>
10. <https://promvit.com.ua/laboratornij-reaktor-robochim-ob%e2%80%b2yemom-20-l-rc-20-00-000-ps/>
11. <https://perryvidex.eu/product/120-ltr-3-bar-int-6-bar-jkt-anch-agit-U2402-11>
12. <https://smartwayplus.com.ua/catalog/avtomatychnyy-fermenter-dlya-bakterialnoyi-kultury-200-litrovyy>
13. https://agrovektor.com.ua/physical_product/1325830-emkost-dlya-prigotovleniya-produkta-emk-r-100-100-l.html
14. <https://promvit.com.ua/reaktor-1200-l-dlya-rastvorov-supsenzij-siropov/>
15. <https://eshop.czechminibreweries.com/uk/product/cft-shp3-2000de/>
16. <https://wise-master.com.ua/ua/p1000176145-zbirnik-dlya-ekstraktu.html>
17. <https://sartorius.com.ua/fermenteri-i-bioreaktori/odnorazovi-fermenteri-bioreaktori/biostat-str/>
18. https://perryvidex.eu/product/15000-ltr-3-bar-int-6-bar-jkt-45kw-agit-L1445_15000
19. https://vik21.com.ua/ua/catalog/nasosy_tsentrobezhnnye/tsentrobezhnny_monoblochnny_nasos_grundfos_ns_13_18_1kh230v/
20. https://www.micetbrewing.com/Fermentation_tanks/20000L_Commercial_Fermentation_Vessels_247.html
21. https://vik21.com.ua/ua/catalog/nasosy_tsentrobezhnnye/tsentrobezhnny_monoblochnny_nasos_grundfos_ns_30_30_3kh400v/

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ПОЛІГІДРОКСИБУТИРАТУ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря проводиться за допомогою вертикальної трубки з повітрязабірником (ПЗ-1) у найвищій точці відділення підготовки повітря – вище будівлі на 3 – 5 м.

ДР 1.2. Очищення від грубих домішок

Здійснюємо попередню очистку повітря від пилу на фільтрі грубого очищення (Ф-2) з ефективністю очистки $E=90\%$.

ДР 1.3. Компресування повітря

Повітря стискають у (К-3) до тиску 0,4 МПа за рахунок нагрівання від 120 °С до 220 °С, це роблять для того аби подолати гідравлічний тиск стовпа рідини у ферментері.

ДР 1.4. Охолодження повітря та виділення з нього вологи

Стиснене повітря, яке надходить (від ДР 1.3.) охолоджують в теплообміннику-охолоджувачі (Т-4) до температури 25 – 30 °С для того аби забрати надлишкову вологу. Охолоджене повітря направляють до (Р-5), де безпосередньо забирається надлишок вологи і зменшуються пульсації руху повітря, які в майбутньому негативно впливають на роботу інших фільтрів очищення. Вологість повітря має становити $W=60\%$.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Повітря, яке надійшло (від ДР 1.4.), нагрівають у теплообміннику-нагрівачі (Т-6) до температури 30 – 35 °С. Вологість має бути на рівні 50%.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Підігріте повітря (від ДР 1.5.) надходить до головного фільтру (Ф-7), ступінь очистки становить 95%, надалі це повітря передається до

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>						
<i>Розраб</i>		<i>Зюзько О.Л.</i>			РОЗДІЛ 7 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ПОЛІГІДРОКСИБУТИРАТУ					
<i>Пров</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						<i>Літера</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>
									72	127
<i>Н. Контр.</i>								72 <i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затв.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>								

індивідуальних фільтрів.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 1.6.) передається до індивідуальних фільтрів (ФІ-8, ФІ-11, ФІ-18, ФІ-26, ФІ-39), які встановлюють перед кожним інокулятором, ферментером та збірником, що містить стерильні розчини.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування 6% розчину НСІ

Необхідна кількість компонентів для приготування 6%-го розчину хлоридної кислоти, яка потрібна на кожному етапі підготовки поживного середовища наведена у табл 7.1.

Таблиця 7.1.

Об'єм середовища, л	Об'єм необхідно ї кількості 6% НСІ, мл	Кількість 37% НСІ для приготування титрувального розчину, мл	Кількість води для приготування, мл	Ємність для приготування розчину
1,1	-	-	-	-
11	22	3	19	Колба об'ємом 50 мл
110	220	13	207	Колба об'ємом 250 мл
1100	2200	366	1834	Колба об'ємом 3 л
11000	22000	3666	18334	Реактор об'ємом 30 л

ДР 2.1.1. Приготування 6% розчину НСІ для посівного апарату об'ємом 20 л

У колбу під витяжною шафою вносять 19 мл дистильованої води. Потім за допомогою піпетки вносять 3 мл 37%-го розчину НСІ. Колбу закривають притертою скляною пробкою для герметичного зберігання рідини.

ДР 2.1.2. Приготування 6% розчину НСІ для посівного апарату об'ємом 200 л

У колбу під витяжною шафою вносять 207 мл дистильованої води. Потім за допомогою піпетки вносять 13 мл 37%-го розчину HCl. Колбу закривають притертою скляною пробкою для герметичного зберігання рідини.

ДР 2.1.3. Приготування 6% розчину HCl для посівного апарату об'ємом 2 м³

У колбу під витяжною шафою вносять 1934 мл дистильованої води. Потім за допомогою мірного циліндру вносять 366 мл 37%-го розчину HCl. Колбу закривають притертою скляною пробкою для герметичного зберігання рідини.

ДР 2.1.4. Приготування 6% розчину HCl для посівного апарату об'ємом 20 м³

У збірник об'ємом 30 л (З-31) за допомогою об'ємного дозатора (Д-30) подають 18334 мл питної води. Потім за постійного перемішування вносять 3666 мл 37%-го розчину HCl.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 20 л

Потрібно приготувати 22 мл 6%-го розчину натрій гідроксиду, який використають для нейтралізації поживного середовища в посівному апараті об'ємом 20 л.

Для того, щоб приготувати 22 мл 6%-го розчину натрій гідроксиду на технічних вагах зважуємо 1,32 г кристалічного NaOH і вносимо в колбу об'ємом 50 мл. Мірним циліндром на 25 мл додаємо 20,7 мл дистильованої води. Розчин перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131°C протягом 40 хв.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 200 л

Для того, щоб приготувати 220 мл 6%-го розчину натрій гідроксиду на технічних вагах зважуємо 13,2 г кристалічного NaOH і вносимо в колбу об'ємом 500 мл. Мірним циліндром на 250 мл додаємо 206,8 мл дистильованої

води. Розчин перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131°C протягом 40 хв.

ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлучення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 2 м³

Для того, щоб приготувати 2200 мл 6%-го розчину натрій гідроксиду на технічних вагах зважуємо 132 г кристалічного NaOH і вносимо у колбу об'ємом 3 л, доливаємо додаємо 2068 мл питної води. Розчин постійно перемішують та стерилізують при 131°C протягом 40 хв.

ДР 2.2.4. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлучення поживного середовища у ферментері об'ємом 20 м³

Для того, щоб приготувати 22000 мл 6%-го розчину натрій гідроксиду, за допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-36) зважуємо 1320 г кристалічного NaOH і вносимо в збірник (З-37) об'ємом 30 л. Додаємо 20680 мл питної води. Розчин постійно перемішують та стерилізують при 131°C протягом 40 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів

Для ТП 6.4., 6.5., 6.6., 6.7. готується запасний розчин мікроелементів, який додається у середовище 2 мл на 1 л поживного середовища.

ДР 3.1. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів

На технічних вагах зважують 0,25 г FeSO₄·7H₂O, 0,004 г MnCl₂·4H₂O, 0,25 г CaCl₂·2H₂O, 0,002 г CuCl₂·2H₂O, 0,02 г ZnSO₄·7H₂O, 0,037 г H₃BO₃, 0,024 г CoCl₂·6H₂O, 0,003 г NiCl₂·6H₂O, 0,004 г Na₂MoO₄·2H₂O. Відміряну кількість солей вносять у колбу об'ємом 5 л та доливають 3 л води дистильованої. Потім колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують при температурі 131°C, впродовж 40 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація розчинів для підживлення на етапі виробничого біосинтезу

ДР 4.1. Приготування та стерилізація розчину фруктози для підживлення на етапі виробничого біосинтезу

На 25 годині на етапі виробничого біосинтезу в ферментер вносять фруктозу у концентрації 20 г/л. Для приготування розчину необхідно 220 кг фруктози та 330 л водопровідної води. Наважку фруктози за допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-41) поміщають у збірник (З-42) об'ємом 0,5 м³ та доливають водопровідною водою розчин перекачують у (Ф-47) за допомогою насоса (Н-43). Стерилізацію проводять в апараті протягом 30 хв при 112 °С.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація розчину (NH₄)₂SO₄ для підживлення на етапі виробничого біосинтезу

На 25 годині на етапі виробничого біосинтезу в ферментер вносять фруктозу у концентрації 1,5 г/л. Для приготування розчину необхідно 16,5 кг (NH₄)₂SO₄ та 38,5 л водопровідної води, наважки вносять за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-44). Наважку (NH₄)₂SO₄ поміщають у збірник об'ємом (З-45) 50 л та доливають водопровідною водою. Розчин подають у ферментер (Ф-47) за допомогою (Н-48). Стерилізацію проводять в апараті протягом 40 хв при 131 °С.

ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ

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

Для вирощування інокуляту потрібно 1100 мл поживного середовища. Врахуємо, що 10 % від об'єму поживного середовища – це посівний матеріал, який складає 110 мл, об'єм запасного розчину мікроелементів складає 1,98 мл, то кількість води для приготування поживного середовища становитиме 988 мл. Через невелику кількість компонентів поживне середовище будемо стерилізувати в автоклаві, конденсат при цьому не утворюється.

У *табл. 7.2.* наведено дані по розрахунку необхідної кількості компонентів для приготування середовища для отримання посівного матеріалу у колбах на качалках.

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування
посівного матеріалу у колбах на качалках**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 990 мл середовища, г(мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Фруктоза	20	20	А	50
Вода		30		
KH ₂ PO ₄	4,35	4,3	Б	469
NaH ₂ PO ₄	4,35	4,3		
Вода		460		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5	1,5	В	469
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	0,5		
Вода		467		

* – запасний розчин мікроелементів у кількості 2 мл на 1 л поживного середовища, на даному етапі потрібно 1,98 мл.

ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 20 г фруктози. Наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл та додають 30 мл дистильованої води, потім перемішують та закривають ватно-марлевым корком. Стерилізацію проводять в автоклаві при 112 °С впродовж 30 хв.

ДР 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 4,3 г KH₂PO₄ та 4,3 г NaH₂PO₄. Наважки поміщають у колбу об'ємом 750 мл та додають 460 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевым корком та поміщають в автоклав на 40 хв при температурі 131 °С.

ДР 5.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах відважують 1,5 г (NH₄)₂SO₄ та 0,5 г MgSO₄·7H₂O. Наважки переносять у колбу об'ємом 3 л та додають 467 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевым корком та стерилізують в автоклаві 40 хв при температурі 131 °С.

ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л

У табл. 7.3. наведено дані по розрахунку необхідної кількості компонентів для приготування середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л. На даній стадії нам необхідно приготувати 12,2 літрів поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії (1,1 л). Об'єм запасного розчину мікроелементів складає 22 мл, то кількість води для приготування поживного середовища становитиме 9,878 л.

Таблиця 7.3

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

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 11,1 л середовища, г(л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Фруктоза	20	220	А	550 мл
Вода		330 мл		
KH ₂ PO ₄	4,35	48,3	Б	9,33 л
NaH ₂ PO ₄	4,35	48,3		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5	183,3		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	5,6		
Вода		9,04 л		

* – запасний розчин мікроелементів у кількості 2 мл на 1 л поживного середовища, на даному етапі потрібно 22,2 мл.

ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 220 г фруктози. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л та додають 330 мл дистильованої води, потім перемішують та закривають ватно-марлевым корком. Стерилізацію проводять в автоклаві при 112 °С впродовж 30 хв.

ДР 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 48,3 г KH_2PO_4 , 47,3 г NaH_2PO_4 , 183,3 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та 5,6 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у реактор-змішувач об'ємом 10 л (Р-9) та додають 9,04 л питної води, для кращого розчинення компонентів вмикають перемішувач. Отриманий розчин самоплином подають в простерилізований інокулятор об'ємом 20 л (ІН-10) та подають 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1.1.) для досягнення рН 4,0-4,5. Стерилізацію проводять 40 хв при температурі 131 °С.

ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 200 л

У табл. 7.4. наведено дані по розрахунку необхідної кількості компонентів для приготування середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 200 л. На даній стадії нам необхідно приготувати 122,1 літрів поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії (11,1 л). При розрахунку необхідно врахувати запасний розчин мікроелементів, який складає 222 мл. Тому об'єм води необхідний для приготування поживного середовища складає 110,8 л.

Таблиця 7.4

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 200 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 111 л середовища, г(л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Фруктоза	20	2220	А	5,55
Вода		3330 мл		
KH_2PO_4	4,35	482,9	Б	105,3
NaH_2PO_4	4,35	482,9		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,5	166,5		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	55,5		
Вода		104,1 л		

* – запасний розчин мікроелементів у кількості 2 мл на 1 л поживного середовища, на даному етапі потрібно 222 мл.

ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-12) подають 2,22 кг фруктози та додають 3,33 л водопровідної води. Компоненти поміщають у збірник об'ємом 10 л (Р-13), потім перемішують до повного розчинення компонентів. Розчин подають самоплином в (ІН-17). Стерилізацію проводять в апараті при 112 °С впродовж 30 хв.

ДР 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 482,9 г K_2HPO_4 , 482,9 г NaH_2PO_4 , 166,5 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та 55,5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у реактор-змішувач об'ємом 120 л (Р-15) та додають за допомогою об'ємного дозатору (Д-14) 104,1 л питної води, для кращого розчинення компонентів вмикають перемішуючий пристрій. Отриманий розчин перекачують насосом (Н-16) в простерилізований інокулятор (ІН-17) об'ємом 200 л та подають 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1.2.) для досягнення рН 4,0-4,5. Стерилізацію проводять 40 хв при температурі 131 °С.

ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 2 м³

У табл. 7.5. наведено дані по розрахунку необхідної кількості компонентів для приготування середовища для отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 2 м³. На даній стадії нам необхідно приготувати 1211 літрів поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії (111 л). При розрахунку необхідно врахувати запасний розчин мікроелементів, який складає 2,2 л. Тому об'єм води необхідний для приготування поживного середовища складає 1097,8 л.

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування
посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 2 м³**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1100 л середовища, г(л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Фруктоза	20	22000	А	55
Вода		33 л		
КН ₂ РО ₄	4,35	4785	Б	1043
NaH ₂ PO ₄	4,35	4785		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5	1650		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	550		
Вода		1031 л		

* – запасний розчин мікроелементів у кількості 2 мл на 1 л поживного середовища, на даному етапі потрібно 2,222 л.

ДР 5.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-19) подають 22 кг фруктози. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 100 л (Р-20) та додають 33 л водопровідної води, потім перемішують до повного розчинення компонентів. За допомогою насоса (Н-21) композицію перекачують в посівний апарат (ПА-25). Стерилізацію проводять в апараті при 112 °С впродовж 30 хв.

ДР 5.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-22) подають 4785 г КН₂РО₄, 4785 г NaH₂PO₄, 1650 г (NH₄)₂SO₄, 550 г MgSO₄·7H₂O. Наважки поміщають у реактор-змішувач об'ємом 1,2 м³ (Р-23) та додають 1031 л питної води через об'ємно-ваговий дозатор (Д-22), для кращого розчинення компонентів вмикають перемішуючий пристрій. Отриманий розчин перекачують насосом (Н-24) в простерилізований посівний апарат об'ємом 2 м³ (ПА-25) та подають 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1.3.) для досягнення рН 4,0-4,5. Стерилізацію проводять 40 хв при температурі 131 °С.

ДР 5.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 м³

У табл. 7.6. наведено дані по розрахунку необхідної кількості компонентів для приготування середовища для отримання посівного матеріалу у ферментері об'ємом 20 м³. На даній стадії нам необхідно приготувати 12100 літрів поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії (111 л), необхідний об'єм води для приготування поживного середовища складає 11989 л.

Таблиця 7.6

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу для виробничого культивування

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 11000 л середовища, г(л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Фруктоза	20	220000	А	550
Вода		330 л		
KH ₂ PO ₄	4,35	47850	Б	10450
NaH ₂ PO ₄	4,35	47850		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5	16500		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	5500		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2 мг	22		
MnCl ₂ ·4H ₂ O	30 мкг	0,33		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2 мг	22		
CuCl ₂ ·2H ₂ O	10 мкг	0,11		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	100 мкг	1,1		
H ₃ BO ₃	300 мкг	3,3		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200 мкг	2,2		
NiCl ₂ ·6H ₂ O	20 мкг	0,22		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	30 мкг	0,33		
Вода		10332,3		

ДР 5.5.1. Приготування композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-27) у реактор-змішувач об'ємом 0,5 м³ (Р-32) подають 220 кг фруктози та додають 330 л водопровідної води, потім перемішують до повного розчинення компонентів, за допомогою насоса (Н-33) подають у виробничий ферментер (Ф-45). Стерилізацію проводять в апараті при 112 °С впродовж 30 хв.

ДР 5.5.2. Приготування композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-28) у реактор-змішувач об'ємом 15 м³ (Р-32.1) подають 47,85 кг КН₂РО₄, 47,85 кг NaН₂РО₄, 16,5 кг (NH₄)₂SO₄, 5,50 кг MgSO₄·7H₂O. На технічних терезах відважують 22 г FeSO₄·7H₂O, 0,33 г MnCl₂·4H₂O, 22 г CaCl₂·2H₂O, 0,11 г CuCl₂·2H₂O, 1,1 г ZnSO₄·7H₂O, 3,3 г H₃BO₃, 2,2 г CoCl₂·6H₂O, 0,22 г NiCl₂·6H₂O, 0,33 г Na₂MoO₄·2H₂O. Наважки поміщають у реактор-змішувач об'ємом 15 м³ (Р-32.1) та через об'ємно-ваговий дозатор (Д-29) додають 10332,3 л водопровідної води, для кращого розчинення компонентів вмикають перемішуючий пристрій. У цей же реактор-змішувач (Р-32.1) із збірника об'ємом 50 л (З-30) за допомогою насоса (Н-31) подають 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1.4.) для досягнення рН 4,0-4,5 компоненти відміряють за допомогою об'ємного (Д-29). Стерилізацію проводять 40 хв при температурі 131 °С.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підготовка колекційної культури

Музейну культуру *S. necator* АТСС 17697 зберігають на скошеному поживному агарі (м'ясо-пептонний агар) у пробірках при температурі 4°С. Кожні 3-4 місяці здійснюють пересіви на свіже поживне середовище, при роботі з колекційною культурою дотримуються асептичних умов.

ТП 6.2. Одержання робочої культури

Для отримання робочої культури, колекційну культуру, яка зберігається у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром пересівають у чашки Петрі з МПА, таким чином отримують ізольовані колонії. Культивування проводять в термостаті при температурі 30±1°С протягом 48 годин.

ТП 6.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі

Ізольовані колонії, які були отримані на чашках Петрі (від ТП 6.2.) мікробіологічною петлею пересівають у пробірки із скошеним агаром. Беруть одну колонію для засіву однієї пробірки. Культивування проводять в термостаті при температурі 30 ± 1 °С протягом 24 годин.

ТП 6.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 3 л у якій міститься стерильна композиція В (від ДР 5.1.3.) доливають стерильні композиції А та Б (від ДР 5.1.1. до ДР 5.1.2.), вносять 2,2 мл розчину мікроелементів (від ДР 3.1.), перемішують та розливають у 5 качалочних колб об'ємом 750 мл по 150 мл інокуляту, одну качалочну колбу об'ємом 750 мл 250 мл інокуляту та одну колбу об'ємом 750 мл 100 мл інокуляту.

У пробірку, в якій міститься робоча культура *C. necator* ATCC 17697 (від ТП 6.3.) вносять 5 мл стерильної води, змивають культуру відбирають піпеткою бактеріальну суспензію і поміщають у качалочні колби з поживним середовищем. В одну колбу вноситься бактеріальна суспензія з однієї пробірки. Культивування проводять при 150 об/хв, при $t = 30 \pm 1$ °С протягом 24 годин.

ТП 6.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л

У стерильну колбу об'ємом 1 л вносять композицію А (від ДР 5.2.1.) та 22 мл розчину мікроелементів (від ДР 3.1.).

В інокулятор об'ємом 20 л (ІН-10) з простерилізованою композицією Б (від ДР 5.2.2.) подають вміст колби з композицією А (від ДР 5.2.1.). Для нейтралізації в посівний апарат вносять 6%-ий розчин NaOH (від ДР 2.2.1.) до досягнення рівня рН 7,0.

Після внесення NaOH через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 6.4). Культивують при температурі 30 °С протягом 24 годин, $n=150$ об/хв концентрацію розчиненого кисню pO_2 контролюють шляхом корегування швидкості перемішування та додаванням стерилізованого повітря.

ТП 6.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 200 л

У інокулятор об'ємом 200 літрів (ІН-17) з композицією Б (від ДР 5.3.2.) з реактора (Р-13) самоплином подають композиції А (від ДР 5.3.1.) та вносять 220 мл розчину мікроелементів (від ДР 3.1.). Вмикають перемішувальний пристрій та вносять 6%-ий розчин NaOH (від ДР 2.2.2.) до досягнення рівня рН 7,0.

Через трубу перетискання з інокулятора перекачують посівний матеріалу (від ТП 6.5.). Культивують при температурі 30 °С протягом 24 годин, $n=150$ об/х, концентрацію розчиненого кисню pO_2 контролюють шляхом корегування швидкості перемішування та додаванням стерилізованого повітря. Кожні 4 години відбирають проби культуральної рідини, щоб здійснити мікробіологічний контроль посівного матеріалу.

ТП 6.7. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 2 м³

У посівний апарат об'ємом 2 м³ (ПА-25) літрів зі стерильною композицією Б (від ДР 5.4.2.) з реактора-змішувача (Р-20) подають композицію А (від ДР 5.4.1.) за допомогою насоса (Н-21), а також вносять запасний розчин мікроелементів (від ДР 3.1.). Вмикають перемішувальний пристрій та вносять 6%-ий розчин NaOH (від ДР 2.2.3.) до досягнення рівня рН 7,0. Після чого вносять посівний матеріалу (від ТП 6.6.).

Культивують при температурі 30 °С протягом 24 годин, $n=150$ об/хв концентрацію розчиненого кисню pO_2 контролюють шляхом корегування швидкості перемішування та додаванням стерилізованого повітря. Кожні 4 години відбирають проби культуральної рідини, щоб здійснити мікробіологічний контроль посівного матеріалу.

ТП 7. Біосинтез

ТП 7.1. Виробниче культивування

Виробничий біосинтез цільового продукту здійснюють у ферментері об'ємом 20 м³ (Ф-45). У ферментер подається простерилізоване середовище з реактора-змішувача (Р-3) композицією А (від ДР 5.5.1.) та композицією Б (від ДР 5.5.2.) з реактора-змішувача (Р-32.1). Також у ферментер за допомогою насоса (Н-37) подають 6%-вий розчин NaOH (від ДР 2.2.4.) для нейтралізації

середовища та слідкують за показниками датчика, щоб рН було на рівні 7,0, потім вносять посівний матеріал (від ПА-26, ТП 6.7.).

На 25 годині культивування у ферментер за допомогою насоса зі збірника (З-40) за допомогою (Н-41) подають розчин фруктози (від ДР 4.1.) та зі збірника (З-43) розчин $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (від ДР 4.2.) за допомогою насоса (Н-44) для підживлення середовища.

Тривалість культивування становить 76 годин при температурі 30 °С та за постійної аерації середовища.

Кожні 4 години здійснюють відбір проб культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації джерела вуглецевого живлення та азоту, а також рівня біомаси. Рівень біомаси на 76 годину культивування знаходиться на рівні 14,4 г/л. Також після завершення культивування визначають концентрацію ПГА, яка становить 9,9 г/л.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Мікробіологічний контроль

Біосинтез полігідроксибутирату мікроорганізмом *Cupriavidus necator* ATCC 17697 здійснюється в асептичних умовах, тому мікробіологічний контроль передбачає контроль стерильності поживного середовища, яке використовують для біосинтезу полігідроксибутирату. Додатково потрібно контролювати на мікробіологічну чистоту посівний матеріал та культуральну рідину протягом усього періоду біосинтезу. Ці параметри контролюються шляхом висівів зразків поживного середовища, культуральної рідини та інокуляту на чашки Петрі з агаризованим середовищем.

8.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Щоб провести даний вид контролю в стерильних умовах відбирають 10 мл поживного середовища та заливають чашки Петрі агаризованим середовищем.

Для визначення стерильності поживного середовища потрібно взяти за допомогою стерильної піпетки 0,1 мл зразка поживного середовища. Зразок наливають на поверхню сусло-агару (СА) для виявлення грибів та дріжджів і на м'ясо-пептонний агар (МПА) для виявлення бактерій. За допомогою стерильного шпателя Дригальського зразок розтирають по всій поверхні агару. Потім чашки Петрі зі зразками поживного середовища поміщають в термостат при температурі 30 – 34 °С для грибів та дріжджів, а для бактерій при температурі 24 – 26 °С. Якщо середовище стерильне, то відсутня будь-яка мікробіота [81].

8.1.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури

Мікробіологічний контроль чистоти культури проводять двома способами – висіванням культури на чашки Петрі з агаром та/або

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		<i>Літера</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розраб</i>		<i>Зюзько О.Л.</i>			РОЗДІЛ 8 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА		<i>87</i>	<i>127</i>
<i>Пров</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затв.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						
						<i>Кафедра БТМ</i>		87

мікроскопіюванням. Культуральну рідину і посівний матеріал висівають до ізолюваних колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій та сушло-агаром (СА) для виявлення грибів та дріжджів. Після інкубації здійснюють мікроскопіювання мікроорганізмів, які виростили на поверхні чашки Петрі [81].

На чашках повинні бути присутні лише колонії *S. necator* ATCC 17697 та відсутня будь-яка стороння мікробіота. На поживному агарі протягом 2 дні, при 27°C, колонії досягають 2-4 мм, брудно-білі, блискучі, слизові, гладкі, опуклі з цілим краєм [82].

Мікроскопіювання проводять за допомогою мікроскопа, який оснащений імерсійною системою. Препарат готують на чистому знежиреному предметному склі, яке проводять над верхньою частиною полум'я пальника. Далі в асептичних умовах профламованою петлею відбирають зразок культуральної рідини та рівномірно розподіляють по предметному склу. Зразок висушують, тримаючи його високо над полум'ям пальника. Препарат фіксують, щоб забезпечити прилипання мікроорганізмів до поверхні скла, шляхом термічної фіксації. Фіксований препарат обробляють кількома краплями фуксину протягом 1-2 хвилин. Потім препарат розглядають за збільшення 90х. Клітини *S. necator* ATCC 17697 грам-негативні (рис. 8.1.) [83, 84].



Рис. 8.1.1. Колонії *S. necator* на скошеному агарі та при фарбуванні за Грамом (збільшення 90х) [84]

Якщо в зразку відсутня стороння мікробіота, то можна побачити клітини *Cupriavidus necator* ATCC 17697. Клітини паличкоподібної форми із заокругленими кінцями, палички короткої форми. Клітини мають розмір $0,5-0,8 \times 2-5$ мікрон і розташовуються поодинокі, попарно і в коротких ланцюжках, неспороутворюючі. *C. necator* рухливий, рухається за допомогою перитрихіальних джгутиків. Джгутиків зазвичай від 2 до 10 [82,85].

8.2. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю

Джерелом вуглецю в обраному середовищі слугує **фруктоза**.

Джерелом азотного живлення є $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Методи визначення вуглецю та азоту. Визначення фруктози проводили методом 3,5-динітросаліцилової кислоти (DNS), а визначення концентрації азоту проводили за допомогою фенол-гіпохлоридних реакцій.

Для того, щоб визначити вміст вуглецю та азоту, потрібно відокремити біомасу та здійснювати визначення в супернатанті.

Отримання супернатанту. Зразки клітин після ферментації в біореакторі, відбирали та центрифугували при 10000 об/хв протягом 10 хвилин при температурі 4°C. Отриманий супернатант (надосадову рідину) використовували для визначення концентрації фруктози та амоній сульфату. Залишковий осад перед ліофілізацією промивали дистильованою водою та розглядали як масу сухих клітин і позначали як біомасу (г/л) [86].

8.2.1. Визначення концентрації джерела вуглецю

Визначення фруктози проводили методом 3,5-динітросаліцилової кислоти (DNS).

Принцип методу. Метод заснований на тому, що при реакції лужного розчину 3,5-динітросаліцилової кислоти з редукуючими цукрами (фруктоза, глюкоза тощо), 3,5-динітросаліцилова кислота перетворюється на 3-аміно-5-нітросаліцилову кислоту (рис. 8.2.1), яка має характерне оранжеве забарвлення, інтенсивність забарвлення залежить від кількості редукуючого цукру (рис. 8.2.2) [87].

під проточною водою до кімнатної температури. Охолодження до температури навколишнього середовища необхідне через вплив температури на поглинання забарвленого продукту реакції. Інтенсивність кольору вимірювали на спектрофотометрі Beckman Podel DL при довжині хвилі 575 нм.

Так як для аналізу використовували модифікований реагент, колір розчину був нестабільним, тому 1 мл 40% розчину Рошельської солі додавали до суміші перед проявленням забарвлення і перед охолодженням розчину.

Модифікований реагент готують шляхом розчиненні всіх компонентів в потрібному об'ємі натрію гідроксиду. Сульфат потрібно додавати до реагенту безпосередньо перед використанням. Рошельську сіль додають частинами, щоб вона не перешкоджала сульфату вилучати розчинний кисень [88].

8.2.2. Визначення концентрації джерела азоту

Визначення концентрації азоту проводили за допомогою фенол-гіпохлоридної реакції.

Методика проведення тесту для визначення джерела азоту. Реакція проводилася за допомогою двох реагентів – нітропрусиду натрію з фенолом та гіпохлориду з лугом [89].

Принцип методу. Іони амонію здатні реагувати з гіпохлоритом та утворювати монохлорамін. Коли присутній фенол та надлишок гіпохлориту, монохлорамін утворює індофенол – синю сполуку, а нітропрусид натрію використовують як каталізатор. Концентрацію амонію визначають за допомогою спектрофотометра [90].

Реактиви для проведення дослідів. Фенол, нітропрусид натрію, гідроксид натрію, гіпохлорит натрію (з 5% вмістом хлору), сульфат амонію. Воду, для приготування розчину, пропускали через картридж з іонообмінною смолою, щоб забрати іони амонію [89].

Приготування реагентів. Реагент (А) – фенол + нітропрусид натрію. На 500 мл розчину додавали 5 грамів фенолу разом та 25 мг нітропрусиду натрію.

Витримували у флаконах з бурштинового скла, у холодильнику протягом 1 місяця [89].

Реагент (Б) – лужний гіпохлорид. На 500 мл розчину додавали 2,5 грами гідроксиду натрію та 4,2 мл гіпохлориту натрію. Витримували у флаконах з бурштинового скла, у холодильнику протягом 1 місяця.

Визначення вмісту азоту. У пробірку відміряють 5,0 мл реагенту А автоматичною піпеткою та 20 мкл супернатанту культуральної рідини. Пробірку накривають вологостійкою термоплівкою після чого енергійно струшують, щоб перемішати. Потім за допомогою автоматичної піпетки відміряють 5,0 мл реагенту В, додають до суміші та ретельно перемішують. Поява кольору спостерігається протягом 20 хвилин при 37°C. Поглинання розчину вимірюють за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 625 нм [89].

8.3. Визначення показників біосинтезу

Визначення концентрація полігідроксибутирату

Визначення вмісту полігідроксибутирату проводили шляхом УФ-спектрофотометрії.

Принцип методу. Спектофотометричні методи аналізу засновані на вимірюванні поглинання монохроматичного випромінювання в УФ, видимій та ІФ області спектру. Спектрофотометрія в УФ-області та видимих ділянках дозволяє отримати дані про ступінь чистоти речовини, визначити певну сполуку за спектром поглинання, встановити константи дисоціації кислот та основ, дослідити процеси комплексоутворення [90,91,92].

У статті Nygaard et al. визначення концентрації полігідроксіалканоатів (PHB) проводили з використання методу УФ-спектрофотометрії [28].

Зразки клітин з біореактору відбирали та центрифугували протягом 10 хв при 3500 об/хв (Presvac INS-DCA-300RTV), далі двічі промивали дистильованою водою та сушили при 105 °C, до того часу, поки зразки не мали постійної ваги. Потім промитий осад клітин кілька разів заморожували та розморожували, далі до зразків додавали хлорокс. Розщеплення хлороксом

тривало 1 годину при 37 °С, після чого гранули РНВ, осаджували центрифугуванням. Щоб видалити сліди хлору, до ресуспендованого у воді РНВ, додавали тіосульфат натрію. Потім відбувалися послідовні промивання у воді, ацетоні та етанолі. Промивання хлороформом не здійснювали, оскільки не спостерігалось забруднень в основній спектральній області.

5 мл концентрованої H_2SO_4 додавали до сухого осаду, пробірки закривали мармуровими ковпачками та нагрівали на піщаній бані 20 хв при 100 °С до окиснення РНВ до кротонової кислоти. Як еталонний зразок використовували розчин H_2SO_4 80% об.об. без біополімеру. Поглинання вимірювали при довжині хвилі 234 нм УФ-спектрофотометром PerkinElmer Lambda 35 UV/Vis spectrometer [93,94].

Обладнання для проведення аналізу УФ-спектрофотометрії (рис. 8.3.1):



Рис. 8.3.1. УФ-спектрофотометр PerkinElmer Lambda 35 UV/Vis [95]

Спектрофотометр PerkinElmer Lambda 35 UV/Vis являє собою комплекс, який дозволяє легко працювати з твердими речовинами, пастами та порошками. За рахунок легкості в експлуатації, не потребує спеціально навченого персоналу. Аналіз проводиться легко, швидко та надійно.

Особливості:

діапазон довжини хвилі – 190 – 1100 нм;

точність довжини хвилі – $\pm 0,1$ нм;

управління на комп'ютері здійснюється за рахунок UV WinLab 6.4 і нового ПК/монітора Windows 10;

двопроменева оптика забезпечує точність та стабільність результатів [96].

8.4. Карта постадійного контролю

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

ДР 1.2. Очищення від грубих домішок

ДР 1.3. Компресування повітря

ДР 1.4. Охолодження повітря та виділення з нього вологи

ДР 1.5. Нагрівання повітря

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування 6% розчину HCl

ДР 2.1.1. Приготування 6% розчину HCl для посівного апарату об'ємом 20 л

ДР 2.1.2. Приготування 6% розчину HCl для посівного апарату об'ємом 200 л

ДР 2.1.3. Приготування 6% розчину HCl для посівного апарату об'ємом 2 м³

ДР 2.1.4. Приготування 6% розчину HCl для посівного апарату об'ємом 20 м³

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлучення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 20 л

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлучення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 200 л

ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлучення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 2 м³

ДР 2.2.4. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлучення поживного середовища у ферментері об'ємом 20 м³

ДР 3. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів

ДР 3.1. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів

ДР 4. Приготування та стерилізація розчинів для підживлення на етапі виробничого біосинтезу

ДР 4.1. Приготування та стерилізація розчину фруктози для підживлення на етапі виробничого біосинтезу

ДР 4.2. Приготування та стерилізація розчину $(NH_4)_2SO_4$ для підживлення на етапі виробничого біосинтезу

ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ

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

ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

ДР 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

ДР 5.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л

ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

ДР 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 200 л

ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

ДР 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 2 м³

ДР 5.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

ДР 5.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

ДР 5.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 м³

ДР 5.5.1. Приготування композиції А

ДР 5.5.2. Приготування композиції Б

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підготовка колекційної культури

ТП 6.2. Одержання робочої культури

ТП 6.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі

ТП 6.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

ТП 6.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л

ТП 6.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 200 л

ТП 6.7. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 2 м³

ТП 7. Біосинтез

Таблиця 8.5.

Карта постадійного контролю біосинтезу полігідроксибутирату *Cupriavidus necator* ATCC 17697

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1.1 Забір атмосферного повітря	Рівень забору повітря	-	Весь цикл виробництва	Найвища точка відділення підготовки повітря – вищесбудівлі на 3 – 5 м
Кт 1.2 Попереднє очищення від грубих домішок	Повітря після проходження фільтра грубого очищення, тиск, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення повітря згідно паспорту фільтра	Після проходження фільтра грубого очищення	E=90%
Кт 1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря після проходження через компресор, тиск, температура	Термометр, манометр	Повітря після проходження через компресор	t = 120 – 220 °С, P = 0,4 МПа
Кт 1.4 Охолодження повітря та видалення вологи	Охоложене повітря, температура, вологість	Термометр, психрометр	Повітря після охолодження та видалення вологи	t = 25 – 30 °С, W = 60%
Кт 1.5 Підігрів повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр, психрометр	Повітря після нагріву	t = 30 – 35 °С, W = 50%

Продовження таблиці 8.5.

Кт 1.6 Очищення повітря в головному фільтрі	Повітря після проходження головного фільтра, ступінь очищення	Згідно з паспортом фільтра	Повітря після проходження через головний фільтр	E=95%
Кт 1.7 Очищення повітря в індивідуальних фільтрах	Повітря після проходження індивідуальних фільтрів, ступінь очищення	Згідно з паспортом фільтра	Повітря після проходження через індивідуальні фільтри	E=99,99%
Кх, 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4 Приготування 6% розчину HCl для інокуляторів об'ємом 20 та 200 л, 2 м ³ та ферментера об'ємом 20 м ³	Розчин соляної кислоти	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 6%
Кх, Кт, Км 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4 Приготування 6% розчину NaOH для інокуляторів об'ємом 20 та 200 л, 2 м ³ та ферментера об'ємом 20 м ³	Розчин гідроксиду натрію, Температура, тиск, час, стерильність	Годинник, термометр, мікробіологічний контроль	Температуру контролюють весь час під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	C = 6%, t = 131 °C, τ = 40 хв, P = 0,15 МПа, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 8.5.

<p>Кт, Км 3.1 Приготування та стерилізація запасного розчину мікроелементів</p>	<p>Розчин мікроелементів Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Годинник, манометр, термометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температуру контролюють весь час під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 131 °С, τ = 40 хв, P = 0,15 МПа, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.1 Приготування та стерилізація розчину фруктози для підживлення</p>	<p>Розчин фруктози Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Годинник, манометр, термометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температуру контролюють весь час під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 112 °С, τ = 30 хв, P = 0,05 МПа, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.2 Приготування та стерилізація розчину амоній сульфату для підживлення</p>	<p>Розчин (NH₄)₂SO₄ Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Годинник, манометр, термометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температуру контролюють весь час під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 131 °С, τ = 40 хв, P = 0,15 МПа, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.1.1, 5.2.1, 5.3.1, 5.4.1 Приготування та стерилізація композиції А</p>	<p>Композиція А Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температуру контролюють весь час під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 112 °С, τ = 30 хв, P = 0,05 МПа, відсутність мікробіоти</p>

Продовження таблиці 8.5.

Кт, Км 5.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температуру контролюють весь час під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, $P = 0,15\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.2.2, 5.3.2, Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температуру контролюють весь час під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, $P = 0,15\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температуру контролюють весь час під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, $P = 0,15\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 8.5.

<p>Кт, Км 6.1 Підготовка колекційної культури</p>	<p>Колекційна культура <i>Cupriavidus necator</i> ATCC 17697 Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Холодильник</p>	<p>Мікробіологічний контроль</p>	<p>t = 4 °С, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 6.2 Одержання робочої культури</p>	<p>Колекційна культура <i>Cupriavidus necator</i> ATCC 17697 Морфологічна однорідність, відсутність неконтрольованих мутацій, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Мікробіологічний контроль кожні 8 годин</p>	<p>t = 30 ± 1 °С, τ = 24 год, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 6.3 Вирощування культури на агаризованому середовищі</p>	<p>Колекційна культура <i>Cupriavidus necator</i> ATCC 17697 Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Мікробіологічний контроль кожні 8 годин</p>	<p>t = 30 ± 1 °С, τ = 48 год, відсутність мікробіоти</p>

Продовження таблиці 8.5.

<p>Кт, Км 6.4 Вирощування культури в колбах на качалках</p>	<p>Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, обертова частота качалки, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси</p>	<p>рН-метр, годинник, технічний тахометр та термометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і швидкість обертання регулююся автоматично протягом всього часу культивування, мікроскопіювання проводять кожні 8 годин, визначення біомаси вкінці культивування</p>	<p>$t = 30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 24 \text{ хв}$, $\text{pH} = 7 \pm 2$, $\omega = 150 \text{ об/хв}$, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 6.5 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 20 л</p>	<p>Посівний матеріал Температура, р, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота, морфологічна відповідність мікроорганізмів концентрація біомаси, вуглецю та азоту</p>	<p>Датчик контролю рН-метр, годинник, технічний тахометр та термометр, мікроскоп, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і швидкість обертання регулююся автоматично протягом всього часу культивування, мікроскопіювання проводять кожні 8 годин, визначення біомаси вкінці культивування</p>	<p>$t = 30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 24 \text{ хв}$, $\text{pH} = 7 \pm 2$, $\omega = 150 \text{ об/хв}$, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 6.6 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 200 л</p>	<p>Посівний матеріал Температура, рН, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність мікроорганізмів, концентрація біомаси, вуглецю та азоту</p>	<p>Датчик контролю рН-метр, годинник, технічний тахометр та термометр, мікроскоп, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і швидкість обертання регулююся автоматично протягом всього часу культивування, мікроскопіювання проводять кожні 8 годин, визначення біомаси вкінці культивування</p>	<p>$t = 30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 24 \text{ хв}$, $\text{pH} = 7 \pm 2$, $\omega = 150 \text{ об/хв}$, відсутність мікробіоти</p>

Закінчення таблиці 8.5.

<p>Кт, Км 6.7 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 2м³</p>	<p>Посівний матеріал Температура, рН, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність мікроорганізмів, концентрація біомаси, вуглецю та азоту</p>	<p>Датчик контролю рН-метр, годинник, технічний тахометр та термометр, мікроскоп, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і швидкість обертання регулююся автоматично протягом всього часу культивування, мікроскопіювання проводять кожні 8 годин, визначення біомаси вкінці культивування</p>	<p>t = 30±1 °С, τ = 24 хв, рН=7±2, ω=150 об/хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 7.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 20 м³</p>	<p>Культуральна рідина Температура, рН, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, рівень піни, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність мікроорганізмів, концентрація полігдроксибутирату</p>	<p>Датчик контролю рН-метр, годинник, технічний тахометр та термометр, мікроскоп, датчик контролю піни, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і швидкість обертання регулююся автоматично протягом всього часу культивування, мікроскопіювання проводять кожні 8 годин, визначення біомаси вкінці культивування</p>	<p>t = 30±1 °С, τ = 76 хв, рН=7±2, ω=150 об/хв, відсутність мікробіоти, С_{ПШБ}= 9,9 г/л; С_{біом.}=14,4 г/л.</p>

РОЗДІЛ 9 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

Важливим моментом функціонування кожного виробництва є контроль за показниками забрудненням навколишнього середовища. Тому для запобігання погіршення екологічного стану довкілля необхідно дотримуватися екологічної політики.

9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва полігідроксибутирату на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Технологія отримання полігідроксибутирату за допомогою *C.necator* H16 включає в себе наступні етапи:

1. **Санітарна підготовка виробництва.** На даному етапі передбачено підготовку приміщення до роботи, а саме обробка стін, поверхонь, підлоги, інвентарю та вікон, а також обробка обладнання за допомогою СІР-мийки. На стадії підготовки виробництва використовуємо великі об'єми мийно-дезінфікуючого розчину – Dezaldum 20 та дезінфікуючого засобу – Ароміл Гідрожель Рапід. Вода разом з відпрацьованими дезінфікуючими розчинами, після обробки обладнання та приміщення, надходить до каналізації, а потім має піддатися очистці та вийти за межі заводу.

Тому, можна зробити висновок, що даний етап виступає місцем емісії великої кількості рідких відходів.

2. **Приготування розчинів титрувальних агентів.** Титрувальними агентами, які використовуються на виробництві є 6% розчин хлоридної кислоти, який використовується для підкислення середовища та 6% розчин натрій гідроксиду, який використовується для підлуження середовища. Розчини, які готуються на даному етапі, використовуються для приготування інокуляту та для етапу виробничого біосинтезу. Відходи можуть утворитися лише в тому випадку, коли на підприємстві знаходяться розчини, які втратили свої фізико-хімічні властивості у зв'язку з невідповідними умовами зберігання, але утворення

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>		
Змн.	Арк.	№ докum	Підпис	Дата			
Розраб		Зязько О.Л.			Літера	Арк	Аркушів
Пров		Стадніков В.П.				103	127
Н. Контр.					104		
Затв.		Стадніков В.П.			<i>Кафедра БТМ</i>		
РОЗДІЛ 9 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ							

некондиції на даному етапі можна й уникнути шляхом забезпечення відповідних умов зберігання.

Тому, можна зробити висновок, що даний етап не передбачає утворення відходів, або виступає місцем емісії незначної кількості рідких відходів.

3. **Приготування розчинів для підживлення на етапі виробничого культивування**. Розчини для підживлення на етапі виробничого біосинтезу представлені розчином фруктози та амоній сульфату. Відходи можуть утворитися лише в тому випадку, коли на підприємстві знаходяться розчини, які втратили свої фізико-хімічні властивості у зв'язку з невідповідними умовами зберігання, але утворення некондиції на даному етапі можна й уникнути шляхом забезпечення відповідних умов зберігання.

Тому, можна зробити висновок, що даний етап не передбачає утворення відходів, або виступає місцем емісії незначної кількості рідких відходів.

4. **Підготовка та стерилізація поживних середовищ**. Поживне середовище, приготоване на даному етапі, передається на вирощування інокуляту та виробниче культивування. Утворення відходів на даному етапі можливе лише у разі невідповідності показників якості компонентів, які використовують для їх приготування.

Тому, можна зробити висновок, що даний етап не передбачає утворення відходів, або виступає місцем емісії незначної кількості рідких відходів.

5. **Підготовка посівного матеріалу**. Посівний матеріал та поживне середовище перетворюються на культуральну рідину, яка передається на стадію вирощування інокуляту та збільшується в об'ємах. І тут вже починається безпосередньо виробниче культивування, коли інокулят досягає необхідного об'єму для засіву ферментера.

Тому, можна зробити висновок, що даний етап не передбачає утворення відходів, або виступає місцем емісії незначної кількості відходів.

6. **Підготовка аераційного повітря**. Так як *S.necator* H16 є аеробом, для ефективного біосинтезу потрібне ефективне забезпечення мікроорганізму

розчиненим киснем. Тому процес культивування буде супроводжуватися утворення великого об'єму відпрацьованого повітря.

Тому, можна зробити висновок, що даний етап виступає місцем емісії великої кількості газоподібних відходів.

7. **Виробниче культивування**. На даному етапі утворюється культуральна рідина, яка зберігається, обробляється та готується до випуску на ринок. Рідкі відходи на даному етапі не утворюються, але утворюються газоподібні відходи, які є наслідком виходом з ферментера відпрацьованого повітря.

Тому, можна зробити висновок, що даний етап виступає місцем емісії великої кількості газоподібних відходів.

9.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

Для того аби зменшити кількість відходів та покращити стан навколишнього середовища необхідно дотримуватися екологічної політики. Екологічна політика являє собою систему заходів, котрі призводять до покращення стану навколишнього середовища. На території України така політика реалізується через дотримання стандартів серії ISO9000 та ISO14000.

Запровадження екологічної політики на підприємстві призводить до зменшення викидів шкідливих речовин в навколишнє середовище, гарантує безпеку здоров'я працівників та знижує рівень енергоспоживання [107].

Впровадження екологічної політики призводить до:

- привернення уваги іноземних інвесторів – для іноземних партнерів важливо, щоб підприємство дотримувалося правил екологічної безпеки, адже це свідчить про високу соціальну відповідальність, вкладені кошти можна витратити на модернізацію обладнання та збільшення масштабів виробництва;
- зниження рівня аварійних ситуацій, котрі можуть негативно впливати на безпеку всієї території країни;
- робота працівників на екологічному підприємстві призведе до покращення показників стану їх здоров'я, що в свою чергу забезпечує

підприємство персоналом, який може працювати систематично та не використовувати лікарняні дні.

9.3. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Рідкі відходи під час виробництва полігидроксibuтирату складаються з:

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

Залишки мийно-дезінфікуючих засобів. Миття обладнання будемо здійснювати за рахунок циркуляційної СІР-мийки, для цього готуються робочі розчини миючих засобів з розрахунком 20-30% від об'єму ємкісного обладнання.

Зі специфікації обладнання необхідно виписати реактори, які будуть піддаватися миттю та стерилізації: реактор на 10 л (Р-9) для приготування композиції Б та інокулятор на 20 л (ІН-10). Для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 200 л: реактор на 10 л (Р-13) для приготування композиції А, реактор на 120 л (Р-15) для приготування композиції Б та інокулятор об'ємом 200 л (ІН-17). Для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 2 м³: реактор на 100 л (Р-20) для композиції А, реактор на 1,2 м³ (Р-23) для композиції Б та посівний апарат об'ємом 2 м³ (ПА-25). Для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 20 м³: збірник об'ємом 0,5 м³ (Р-32) для композиції А, реактор на 15 м³ (Р-32.1) для композиції Б, а також виробничий ферментер об'ємом 20 м³ (Ф-45). Додатково встановимо два збірники об'ємом по 50 л (З-30) та 20 л (Р-36) для розчинів НСІ та NaOH відповідно, які використаємо на етапі виробничого біосинтезу. А також два збірники на 50 л (З-43) та 500 л (З-40) для розчинів (NH₄)₂SO₄ та фруктози, які використаємо для підживлення на етапі виробничого біосинтезу. Тому загальний об'єм ємностей становить:

$$V_{\text{ємностей}} = V_{\text{Р-9}} + V_{\text{ІН-10}} + V_{\text{Р-13}} + V_{\text{Р-15}} + V_{\text{ІН-17}} + V_{\text{Р-20}} + V_{\text{Р-23}} + V_{\text{ПА-25}} + V_{\text{З-32}} + V_{\text{З-32.1}} + V_{\text{Ф-45}} + V_{\text{З-30}} + V_{\text{Р-36}} + V_{\text{З-43}} + V_{\text{З-40}} = 0,01 + 0,02 + 0,01 + 0,12 + 0,2 + 0,1 + 1,2 + 2 + 0,5 + 15 + 20 + 0,05 + 0,02 + 0,05 + 0,5 = 39,78 \text{ м}^3 \text{ або } 39\,780 \text{ л.}$$

Звідси об'єм засобів для миття та/або дезінфекції становить:

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0,2 = 39\,780 \text{ л} \times 0,2 = 7\,956 \text{ л, або}$$

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0,3 = 39\,780 \text{ л} \times 0,3 = 11\,934 \text{ л}$$

Прийmemo об'єм відпрацьованих залишків деззасобів рівному об'єму цих засобів: 7 956 л - 11 934 л.

Розрахунок об'єму відпрацьованої води після ополіскування обладнання.

Об'єм води, яка йде на ополіскування обладнання також складає 20-30% від об'єму ємнісного обладнання. Тому ця кількість води складає 7 956 л - 11 934 л.

Тепер можемо розрахувати сумарну кількість стічних вод за один цикл:

$$11\,934\text{ л} + 11\,934\text{ л} = 23\,868\text{ л або } 23,87\text{ м}^3.$$

Згідно з ТЕО річна потужність підприємства становить 6256 кг ПГБ, а кількість трудоднів 330 днів. Далі знаходимо кількість одиниць продукту що виробляється за день:

$$6256\text{ кг} / 330 = 18,96\text{ кг/добу або } 0,01896\text{ т/добу}.$$

Визначимо середні витрати виробничих стічних вод за зміну (Q_v):

$$Q_v = q_v \times n,$$

де q_v - норма водовідведення в м^3 на одиницю продукції, яку випускає підприємство (показник ми рахували вище й він становить $2500\text{ м}^3/\text{т}$);

n - кількість одиниць продукції, що виробляється за зміну (розраховується у масових одиницях випуску готової продукції на добу).

$$Q_v = 2500 \times 0,01896 = 47,4\text{ м}^3/\text{добу}.$$

Середні за зміну витрати побутових стічних вод (Q_n):

$$Q_n = q_n \times N,$$

де q_n - норма відведення побутових стічних вод в $\text{м}^3/\text{зм}$ на одного робітника (для холодних цехів $0,025\text{ м}^3/(\text{зм люд})$).

N - кількість робітників, що працюють у зміну. Припустимо, що $N = 9$ (змінний майстер, мікробіолог, технолог, 3 апаратчики, 2 прибиральники, оператор).

$$Q_n = 0,025 \times 9\text{ людей} = 0,225\text{ м}^3/\text{зм}.$$

Перерахунок даного показника на добу:

$$(0,225 \times 3 \times 24) / 8 = 2,02\text{ м}^3/\text{добу},$$

де 3 - кількість змін на добу;

24 - кількість годин у добі;

8 - тривалість однієї зміни, год.

Загальна витрата стічних вод, що утворюються на підприємстві (Q_a).

Орієнтовно можна прийняти у об'ємах у 5-30 разів меншому за витрати побутових стічних вод:

$$Q_a = Q_{п}/5 = 0,225/5 = 0,06 \text{ м}^3/\text{добу}.$$

Загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві (Q):

$$Q = Q_{в} + Q_{п} + Q_a = 47,4 \text{ м}^3/\text{добу} + 2,02 \text{ м}^3/\text{добу} + 0,06 \text{ м}^3/\text{добу} = 49,48 \text{ м}^3/\text{добу},$$

де $Q_{в}$ – середні за добу витрати виробничих стічних вод, $\text{м}^3/\text{добу}$; $Q_{п}$ – середні за добу витрати побутових стічних вод на підприємстві, $\text{м}^3/\text{добу}$; Q_a – середні за добу витрати атмосферних стічних вод, $\text{м}^3/\text{добу}$.

Визначимо загальні годинні витрати:

$$Q_{\text{заг}}^{\text{год}} = \frac{Q_{\text{заг}}^{\text{доб}}}{24} = \frac{49,48}{24} = 2,06;$$

Визначимо загальні секундні витрати:

$$Q_{\text{зпг}}^{\text{сек}} = \frac{Q_{\text{заг}}^{\text{доб}}}{3600} = \frac{49,48}{3600} = 0,014;$$

Розраховуємо максимальні і мінімальні витрати стічної води, що надходять на малі очищувальні споруди:

$$Q_{\text{max}}^{\text{доб}} = K_{\text{max}} \cdot Q_{\text{заг}}^{\text{доб}},$$

де $K_{\text{max}} = 1,45$ – коефіцієнт максимальної добової нерівномірності притоку стічної води на малі очищувальні споруди, який залежить від середніх витрат побутових стічних вод.

$$Q_{\text{max}}^{\text{доб}} = K_{\text{max}} \cdot Q_{\text{заг}}^{\text{доб}} = 1,45 \cdot 49,48 = 71,75;$$

Визначаємо максимальні годинні витрати стічної води:

$$Q_{\text{max}}^{\text{год}} = \frac{Q_{\text{max}}^{\text{доб}}}{24} = \frac{71,75}{24} = 3,0;$$

Визначаємо максимальні секундні витрати стічної води:

$$Q_{\text{max}}^{\text{сек}} = \frac{Q_{\text{max}}^{\text{год}}}{3600} = \frac{3}{3600} = 0,0008;$$

Визначаємо мінімальні добові витрати стічної води:

$$Q_{min}^{доб} = K_{min} \cdot Q_{заг}^{доб},$$

$K_{min} = 0,5$ – коефіцієнт мінімальної добової нерівномірності притоку стічних вод на малі очищувальні споруди.

$$Q_{min}^{доб} = K_{min} \cdot Q_{заг}^{доб} = 0,5 \cdot 49,48 = 24,74$$

Визначаємо мінімальні годинні витрати стічної води:

$$Q_{min}^{год} = \frac{Q_{min}^{доб}}{24} = \frac{24,74}{24} = 1,03$$

Визначаємо мінімальні секундні витрати стічної води:

$$Q_{min}^{сек} = \frac{Q_{min}^{год}}{3600} = \frac{1,03}{3600} = 0,0003;$$

За добу на підприємстві утворюється 49,48 м³/добу стічних вод. Тому для очищення стічних вод можемо використати установку СПБО-60 (рис.9.2.4), виробником якої є українська компанія «Промтехвод», вона призначена для очищення стічних вод об'ємом до 60 м³/добу (межі в яких працює установка 39 - 64 м³/добу). Дана установка використовується для біологічного очищення побутових вод. Дана установка являє собою блокову систему з металевих ємностей, які покриті спеціальним захисним покриттям. Система забезпечує повну 6-ти ступінчасту технологію біологічної очистки стічних вод. СПБО-60 працює як система аеробної очистки повітря та виконана за принципом аеротенка змішувача. Габаритні розміри установки: 3,1 x 1,5 x 1,5 м; встановлена потужність – 1,8 кВт; споживча потужність – 3,5 кВт [108, 109].



Рис. 9.3. Зображення установки СПБО-60 [109]

Переваги даної установки:

- ✓ можливість працювати навіть без електроенергії як відстійник, та очищувати воду від жирових, маслянистих забруднень, а також від завислих речовин на 50%;
- ✓ конструкторні особливості виключають можливість потрапляння до каналізації неочищеної води, адже установка не боїться залпового викидання води;
- ✓ можливість установки як під землею так і на поверхні;
- ✓ за рахунок наявності в системі безреагентного електрохімічного знезаражування не потрібно використовувати мийно-дезінфікуючі розчини, що виключає їх потрапляння в навколишнє середовище та підвищує екологічність;
- ✓ за рахунок двох зон освітлення ми отримуємо воду підвищеної якості;
- ✓ блоки установки можуть працювати або паралельно або послідовно (один – накопичувач, другий – очищувач) [108].

Етапи очищення стічних вод в установці:

✓ Спочатку відбувається передача води у вузол регулювання подачі води, де за допомогою шибера встановлений необхідний потік стічної води. У разі надходження надлишкової рідини вона повертається в накопичувальний резервуар з перемішуючим пристроєм, при цьому в той же резервуар затягується повітря для того щоб забезпечувалася додаткова аерація при перемішуванні та вода не застоювалася та небуло ефекту «застоювання»;

✓ Далі стічна вода самоплином надходить у вузол механічного очищення, в якому є спеціальне сито, котре затримує механічні домішки розміром понад 5 мм. Сито очищується від домішок залежно від кількості накопиченого забруднення;

✓ Наступна зона – зона аерації, тут вода насичується киснем і перемішується з мулом заглибленим імпульсним електромеханічним аератором, який підтримує постійну концентрацію активного мулу. Якщо необхідно інтенсифікувати процес біологічного очищення стічної води, то додатково

встановлюють об'ємно-блочний завантажувач. Даний пристрій забезпечує умови для розвитку та накопичення штамів м/о, які повільно ростуть, а саме такі штами забезпечують високу надійність очищення води в разі зміни її складу або збільшення кількості;

✓ В установці присутні дві секції освітлення стічних вод (одна секція є складовою зони аерації). Самоплином стічні води протікають через ці секції, причому активний мул з першої секції за допомогою гідродинамічних сил повертається в зону аерації, а з другої камери – за допомогою аератора, надлишковий мул виводиться з установки;

✓ Після проходження водою через другу камеру очистки, вона самоплином подається у фільтр доочистки [110].

Таким чином вода готова до потрапляння в каналізацію.

9.4. Система знешкодження та утилізації газоподібних відходів

Газоподібні відходи у вигляді відпрацьованого повітря утворюються на наступних стадіях:

✓ на етапі отримання посівного матеріалу *S.necator* Н16 в інокуляторах об'ємом 20 та 200 л, посівному апараті об'ємом 2 м³;

✓ виробничого біосинтезу полігідроксибутирату у ферментері об'ємом 20 м³;

Тривалість отримання посівного матеріалу складає 76 годин, а виробничого біосинтезу – 86 годин, у виробничому приміщенні встановлено 4 ферментаційні апарати з коефіцієнтом заповнення 0,55: інокулятори об'ємом 20 та 200 л, посівний апарат об'ємом 2 м³ та виробничий ферментер 20 м³. Швидкість подачі стерильного аераційного повітря для аерації поживного середовища складає 1 л/лПС·хв.

Розрахунок приблизного об'єму відпрацьованого повітря за 1 цикл ферментації ($Q_{\text{заг}}^{\text{доб}}$): $((20 + 200 + 2000 + 20000) \cdot 0,55 \cdot 76 \cdot 60) + ((20 + 200 + 2000 + 20000) \cdot 0,55 \cdot 86 \cdot 60) = 118788120 \text{ л} = 118788,12 \text{ м}^3$.

Для того аби підібрати ефективне обладнання для очищення повітря розрахуємо загальні годинні витрати:

$$Q_{\text{заг}}^{\text{год}} = \frac{Q_{\text{заг}}^{\text{доб}}}{24} = \frac{118788,12}{24} = 4950 \text{ м}^3$$

Так як об'єм утворених газоподібних відходів не великий, достатньо буде фільтрів, які встановлені на реакторах.

9.5. Система знешкодження твердих відходів

Тверді відходи на виробництві представлені (біомаса не буде твердим відходом, адже вона є основою виробництва):

✓ Спрацьовані реактиви – агаризовані середовища МПА та сусло-агар, які використовують для перевірки на мікробіологічну чистоту поживних середовищ, культуральної рідини та посівного матеріалу, порошки для їх приготування (якщо вийшов термін придатності чи порушилися умови зберігання), солі для приготування поживних середовищ, якщо відбулося їх протермінування чи розсипання;

✓ використані маски, рукавички, інвентар для прибирання, спрацьований одяг;

✓ пакувальні матеріали (папір, картон, поліетилен, пластик) – утворюються внаслідок розпаковки лабораторного обладнання, при розтарюванні первинного пакування складників поживного середовища, при викиданні тари після використання миючих засобів;

✓ скло – результат бою лабораторного посуду, та інших побутових речей на підприємстві;

✓ бруд на фільтрах.

Спрацьовані реактиви. Необхідно зберігати окремо від усіх інших відходів, після чого знайти пункти прийому чи організації, які займаються правильною утилізацією таких відходів. Агаризовані середовища необхідно простерилізувати в автоклаві, для того аби інактивувати колонії мікроорганізмів.

Скло. Встановити спеціальні контейнери куди буде викидатися лише скло, яке потім можна відправити на пункти переробки.

Пакувальні матеріали. Важливо встановити окремі баки для сортування поліетилену, який є частиною первинного пакування багатьох речовин, які постачаються на підприємство та полівінілхлориду, який є тарою для пакування

миючих розчинів та інших засобів. Ці речовини належать до групи пластиків, проте мають різні фізико-хімічні властивості й відповідно мають абсолютно різні методи переробки. Відповідно папір та картон сортуємо в окремий бак.

Використані ЗІЗ. Необхідно викидати окремо маски та рукавички, адже вони зроблені з різних матеріалів. Одяг, який вже пройшов певну кількість циклів прання та підлягає утилізації, викидаємо в спеціальні контейнери та передаємо на пункти переробки одягу.

Використані фільтри. Такі фільтри перед утилізацією необхідно простерилізувати в автоклаві, щоб інактивувати залишки клітин продуценту цільового продукту.

9.6. Система екологізації підприємства та методи щодо зменшення кількості відходів

Проаналізувавши відходи, які утворюються на різних стадіях синтезу полігидроксibuтирату можемо зробити висновок, що всі викиди належать до III класу (помірно небезпечні речовини) та IV класу (малонебезпечні речовини). Продуцент біопластику також не є патогенним мікроорганізмом, тому він також не чинить небезпеки для оточуючих.

Для того аби зменшити викиди газоподібних та рідких відходів на підприємстві встановлено ефективне обладнання для очистки стічних вод та відпрацьованих газів, в результаті чого в навколишнє середовище потрапляє очищена вода та гази без домішок. Також для зменшення кількості рідких відходів мийно-дезінфікуючих засобів підприємство обладнане СІР-мийкою, яка дозволяє використовувати мийні кілька разів. Для зменшення твердих відходів на території підприємства встановлюються контейнери для роздільного сортування відходів, після чого вони передаються на підприємства з якими укладені угоди про правильну утилізацію та переробку відходів.

Тому можемо зробити висновок, що наше підприємство дотримується правил екологічної політики та забезпечує покращення стану навколишнього середовища.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Малєєв В.О., Безпальченко В.М., Таран І.О. Матеріали Всеукраїнської наукової конференції «Євроінтеграція екологічної політики України». (Одеса, ОДЕКУ, 29-31 травня 2019) С. 85-88
2. Chanprateep S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. of Bioscience and Bioengineering*. 2010, 10(6): 621–632. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.07.014
3. Пластикове забруднення «розповзається» шаленими темпами – звіт [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.unian.ua/ecology/v-mire-sozdaetsya-bolshe-odnorazovyh-plastikovyh-othodov-chem-kogda-libo-otchet-12135978.html>
4. Goh Y.S., Kit Ping Tan I. Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island. *Microbiological Research*. 2012, 167(4):211-219.
5. Kaniuk L. and Stachewicz U. Development and advantages of biodegradable PHA polymers based on electrospun PHBV fibers for tissue engineering and other biomedical applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2021, 7 (12): 5339-5362 doi: 10.1021/acsbiomaterials.1c00757
6. Wecker, P., Moppert, X., Simon-Colin, C. *et al.* Discovery of a mcl-PHA with unexpected biotechnical properties: the marine environment of French Polynesia as a source for PHA-producing bacteria. *AMB Expr*. 2015, 5(74): 1-9 doi: 10.1186/s13568-015-0163-y
7. Kourmentza C, Plácido J, Venetsaneas N, Burniol-Figols A, Varrone C, Gavala HN, Reis MAM. Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering*. 2017, 4(2):55. doi: 10.3390/bioengineering4020055
8. Goswami M, Rekhi P, Debnath M, Ramakrishna S. Microbial

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>					
Змн.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата						
Розраб	Зюзько О.Л.				СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ			Літера	Арк	Аркушів
Пров	Стабніков В.П.									114
Н. Контр.					115 <i>Кафедра БТМ</i>					
Затв.	Стабніков В.П.									

Polyhydroxyalkanoates granules: an approach targeting biopolymer for medical applications and developing bone scaffolds. *Molecules*. 2021; 26(4):860. doi: 10.3390/molecules26040860

9. Giubilini A., Bondioli F., Messori M., Nyström G. and Siqueira G. Advantages of additive manufacturing for biomedical applications of polyhydroxyalkanoates. *Bioengineering*. 2021, 8(2):29. doi: 10.3390/bioengineering8020029

10. Mozejko-Ciesielska J. and Kiewisz R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*. 2016, 192(2016): 271-282 doi: 10.1016/j.micres.2016.07.010

11. Bernd H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *J. Biochemical Society*. 2003, 376 (1): 15–33. doi: 10.1042/bj20031254

12. Juengert, J.; Bresan, S.; Jendrossek, D. Determination of Polyhydroxybutyrate (PHB) content in *Ralstonia eutropha* using gas chromatography and Nile Red staining. *Bio Protoc*. 2018, 8(5): 8 doi:10.21769/BIOPROTOC.2748

13. Singh Saharan, B., Grewal, A., Kumar P. Biotechnological production of Polyhydroxyalkanoates: a review on trends and latest developments. *Chin. J. Biol.* 2014, 2014(1): 1–18. doi: 10.1155/2014/802984

14. Kourmentza C., Placido J., Venetsaneas N. *et al.* Recent advances and challenges towards sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*. 2017, 4 (55): 1-43. doi:10.3390/bioengineering4020055

15. Ebnesajjad S. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing, and Applications*; Elsevier Inc.: Oxford, UK, 2013.

16. Javaid H., Nawaz A., Riaz N. *et al.* Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by the valorization of biomass and synthetic waste. *Molecules*. 2020, 25(23):5539. doi:10.3390/molecules25235539

17. Lara L. Madison and Gjalt W. Huisman Metabolic engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. 1999, 63(1): 21-53. doi:10.1128/MMBR.63.1.21-53.1999

18. Genecis. Available online: <https://genecis.co/>

- 19.Tan D., Wang Y., Tong Y., Chen G.Q. Grand Challenges for industrializing Polyhydroxyalkanoates (PHAs) *Trends Biotechnol.* 2021, 39(9): 953–963. doi: 10.1016/j.tibtech.2020.11.010.
- 20.Bluepha PHA Bioplastic. Available online: <http://en.bluepha.com/pha-bioplastic>
- 21.Koller M., Mukherjee A. A new wave of industrialization of PHA biopolyesters. *Bioengineering.* 2022. 9(2): 74. doi: 10.3390/bioengineering9020074
- 22.Gao Q., Yang H., Wang C. et al. Advances and trends in microbial production of polyhydroxyalkanoates and their building blocks. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022, 10: 966598. doi:10.3389/fbioe.2022.966598.
- 23.Kaur L., Khajuria R., Parihar L. and Dimpal S.G. Polyhydroxyalkanoates: biosynthesis to commercial production – a review. *JMBFS.* 2017, 6(4): 1098-1106. doi: 10.15414/jmbfs.2017.6.4.1098-1106
- 24.Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Curr Opin Microbiol.* 2010, 3(3):321-6. doi: 10.1016/j.mib.2010.02.006.
- 25.Urtuvia V., Villegas P., González M. and Seeger M. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *Int J Biol Macromol.* 2014, 70:208-13. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.06.001.
- 26.Wei Y.H., Chen W.C. Huang C.K. et al. Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, 12: 252-265. doi: 10.3390/ijms12010252
- 27.Montiel-Jarillo G., Carrera J. and Suarez-Ojeda M.E. Enrichment of a mixed microbial culture for polyhydroxyalkanoates production: effect of pH and N and P concentration. *Science of the Total Environment.* 2017, 583: 300-307. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.069
- 28.Nygaard D., Yashchuk O., Nosedá D.G. et al. Improved fermentation strategies in a bioreactor for enhancing poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production by wild type *Cupriavidus necator* from fructose. *Heliyon.* 2021, 7(1):1–11 doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e05979

29. López-Cuellar M.R., Alba-Flores J., Gracida Rodríguez J.N. and Pérez-Guevara F. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. *Int. J. of Biol. Macromol.* 2011, 48(1):74–80. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2010.09.01
30. Costa P., Basaglia M., Casella S. and Favaro L. Polyhydroxyalkanoate production from fruit and vegetable waste processing. *Polymers.* 2022, 14 (24):5529. doi: 10.3390/polym14245529
31. Batcha A.F, Prasad D.M, Khan M.R and Abdullah H. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* H16 from jatropha oil as carbon source. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2014, 37(5):943-51. doi: 10.1007/s00449-013-1066-4.
32. Costa P., Basaglia M., Casella S. and Favaro L. Polyhydroxyalkanoate production from fruit and vegetable waste processing. *Polymers.* 2022, 14 (24):5529. doi: 10.3390/polym14245529
33. G. Gahlawat and A. K. Srivastava, Enhancing the production of polyhydroxyalkanoate biopolymer by *Azohydromonas Australica* using a simple empty and fill bioreactor cultivation strategy. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 2017, 31(5): 479-485. doi:10.15255/CABEQ.2017.1148
34. Raberg M., Voigt B., Hecker M. and Steinbüchel A. A closer look on the Polyhydroxybutyrate- (PHB-) negative phenotype of *Ralstonia eutropha* PHB-4. *PLoS One.* 2014, 9(5): 95907. doi: 10.1371/journal.pone.0095907.
35. Makkar N.S. and Casida L.E. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.; a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *International journal of systematic bacteriology.* 1987, 37(4). p. 323-326
36. Jain R. and Tiwari A. Biosynthesis of planet friendly bioplastics using renewable carbon source. *J Environ Health Sci Engineer.* 2015, 11(13): 1-13. doi:10.1186/s40201-015-0165-3
37. Jendrossek D. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *J Bacteriol.* 2009, 191(10): 3195–3202. doi:10.1128/JB.01723-08

38. Khanna S and Srivastava A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem.* 2005, 40: 607–19. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.053
39. Koller, Martin *et al.* Whey Lactose as a Raw Material for Microbial Production of Biodegradable Polyesters. *Polyester.* 2012, 1: 19-60 doi:10.5772/48737
40. Nigaard D., Yashchuk O. and Hermida B. PHA granule formation and degradation by *Cupriavidus necator* under different nutritional conditions. *J Basic Microbiol.* 2021, 1: 1–10. doi: 10.1002/jobm.202100184
41. Javaid H, Nawaz A, Riaz N, Mukhtar H *et al.* Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by the Valorization of Biomass and Synthetic Waste. *Molecules.* 2020, 25(23): 5529 – 5539. doi:10.3390/molecules25235539
42. Vaneechoutte M., Kämpfer P., Baere T. *et al.* *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*]. 2004, 54(2): 1-13. doi:10.1099/ijs.0.02754-0
43. Drewlo S, Brämer C.O., Madkour M., Mayer F. and Steinbüchel A. Cloning and expression of a *Ralstonia eutropha* HF39 gene mediating indigo formation in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2001, 67(4):1964-1969. doi: 10.1128/AEM.67.4.1964-1969.2001.
44. *Cupriavidus necator* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://alchetron.com/Cupriavidus-necator>
45. Dalsasso R.R., Pavan F.A., Bordignon S.E. *et al.* Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate. *Process Biochemistry.* 2019, 128(85): 12-18. doi: 10.1016/j.procbio.2019.07.007
46. Poladyan, A., Ilbulyan, S., Sahakyan, M. *et al.* Growth of the facultative chemolithoautotroph *Ralstonia eutropha* on organic waste materials: growth characteristics, redox regulation and hydrogenase activity. *Microb Cell Fact.* 2019, 1: 201 – 215. doi:10.1186/s12934-019-1251-5

47. Panich J., Fong B. and Singer S. W. Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* H16 for sustainable biofuels from CO₂. *Trends in Biotechnology*. 2021, 39(4): 412-424. doi: 10.1016/j.tibtech.2021.01.001
48. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
49. Боротьба з пластиком в Україні та Європі. Основні відмінності та недоїлки [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://enigma.ua/articles/borotba-z-plastikom-v-ukraini-ta-evropi-osnovni-vidminnosti-ta-nedoliki>
50. Михайлова Є. О., Дейнека Д. М., Панчева Г. М. Аналіз методів перероблення пластикових відходів. Вісник НТУ «ХП», Серія: Нові рішення в сучасних технологіях. – Харків: НТУ «ХП». 2021. № 1 (7). С. 80–89. doi:10.20998/2413-4295.2021.01.12.
51. All in plastic. Eastern European Association of the Green [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://eea-greens.eu/2019/05/16/all-inplastic/>
52. Майже за рік українці скоротили використання пластикових пакетів на 40 – 90% – Мінекономіки [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://hromadske.ua/posts/majzhe-za-rik-ukrayinci-skorotili-vikoristannya-plastikovih-paketiv-na-40-90-minekonomiki>
53. Боротьба з пластиком в Україні та Європі. Основні відмінності та недоїлки [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://enigma.ua/articles/borotba-z-plastikom-v-ukraini-ta-evropi-osnovni-vidminnosti-ta-nedoliki>
54. Нова політика управління відходами – основа економіки замкненого циклу [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://conference.chamber.ua/>
55. «Оболонь» 18 років здійснює переробку ПЕТ-пляшок [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.epravda.com.ua/news/2020/12/29/669608/>
56. Пластикове забруднення «розповсюджується» шаленими темпами – звіт [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.unian.ua/ecology/v-mire-sozdaetsya-bolshe-odnorazovyh-plastikovyh-othodov-chem-kogda-libo-otchet-12135978.html>

57. Звіт зі сталого розвитку. Система компаній Кока-Кола в Україні 2019 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.coca-cola.ua/content/dam/one/ua/uk/pdf-files/Sustainability%20report%20FINAL_ukr.pdf
58. Що Соса-Кола робить для зменшення пластикових відходів? [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.coca-cola.ua/do-good/world-without-waste/sho-coca-cola-robit-dlya-zmenschennya-plastikovih-vidhodiv>
59. Lara L. Madison and Gjalt W. Huisman Metabolic engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. 1999, 63(1): 21-53. doi:10.1128/MMBR.63.1.21-53.1999
60. Fructose and mannose metabolism - *Cupriavidus necator* H16 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.genome.jp/pathway/reh00051+H16_A1047
61. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Cupriavidus necator* H16 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/reh00010>
62. Citrate cycle (TCA cycle) - *Cupriavidus necator* H16 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/reh00020>
63. Butanoate metabolism - *Cupriavidus necator* H16 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/reh00650>
64. Обладнання для глибинного культивування мікроорганізмів [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://vuzlit.com/1556892/obladnannya_dlya_glibinnogo_kultivuvannya_mikroorganizmiv
65. Способи глибинного культивування [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://ni.biz.ua/4/4_8/4_8335_videlenie-i-ochistka-tselevih-produktov.html
66. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 252 с.

67. Коцюмбас І.Я., Брезвин О.М. та Івашків Ю.А Фунгіцидні властивості дезінфікуючого засобу на основі йодоформу. Науково-технічний бюлетень. 2019, 20(1): 94 – 99

68. Брезвин О.М., Івашків Ю.А., Рудик Г.В. та Курилас З.І. Токсикологічна оцінка мийно-дезінфікуючого засобу Бійодцид. Науково-технічний бюлетень. 2019, 20(1): 147 – 151

69. Інструкція під час роботи з мийно-дезінфекційними засобами [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pro-op.com.ua/article/767-nstruktsya-pd-chas-roboti-z-deznfeksynimi-hmchnimi-zasobami>

70. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2021 рік [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%92%D1%96%D0%B4%D0%BA%D1%80%D0%B8%D1%82%D1%96%20%D0%B4%D0%B0%D0%BD%D1%96/2022/01/05/2021-%D1%80%D0%B5e%D1%81%D1%82%D1%80_%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D0%B2_1-419.pdf

71. Дезінфікуючий засіб тривалої дії MDA 72+, Medical Def [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://happyen.com.ua/uk/p-dezinfitsiruyushchee-sredstvo-dlitelnogo-deystviya-mda-72-11-medical-def>

72. Антисептик для рук SterillPLUS (СтерілПлюс) Classic з вмістом ізопропілового спирту 70% [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://apteka911.ua/ua/shop/antiseptik-dlya-ruk-sterillplus-sterilplyus-classic-z-vmistom-izopropilovogo-spirtu-70-flakon-50-ml-p132781>

73. «Ароміл Гідрогель» (пероксид) - засіб для дезінфекції шкіри рук і тіла [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sans-ua.all.biz/uk/aromil-gidrozhel-peroksyd-zasib-dlya-dezinfekciyi-g27886529>

74.

75. Санокварт [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cleanstore.com.ua/ua/p1077797117-sanokvart.html>

76. Інструкція щодо застосування засобу "Фамідез® Санокварт" з метою дезінфекції [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://famidez.ua/doc/2020%20MI%20Famidez%20Sanokvart.pdf>

77. Засіб дезінфікуючий для поверхонь DEZALDUM [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://hotel-service.com.ua/uk/zasobi-dlya-dezinfekciyi/3614-zasib-dezinfikuyuchij-dlya-poverkhon-dezaldum-20-51.html>

78. «Dezaldum 20» [Електронний ресурс]. Режим доступу: file:///C:/Users/user/Downloads/DEZALDUM_20_%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D1%87%D0%BD%D1%96_%D1%80%D0%B5%D0%BA%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%B4%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%97.pdf

79. Дезаква Аноліт засіб для дезінфекції [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%94%D0%B5%D0%B7%D0%B0%D0%BA%D0%B2%D0%B0-%D0%90%D0%BD%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D1%82/1026624/>

80. Методичні вказівки щодо застосування засобу «Дезаква - Аноліт» з метою дезінфекції, передстерилізаційного очищення та стерилізації виробів медичного призначення [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.ktd-group.org/upload/decaqua_anolite.pdf

81. 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.

82. Makkar N.S. and Casida L.E. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.; a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *International journal of systematic bacteriology*. 1987, 37(4). p. 323-326

83. Абрят О.Б. Методичні вказівки до лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Мікробіологія» [Електронний ресурс]: методичні вказівки для студентів напряму підготовки 6.140101 «Готельно-ресторанна справа» та

спеціальності 7.04010401 «Географія» / Абрат О.Б. – Івано-Франківськ: ПНУ імені В.Стефаника, 2016. – 70 с.

84. Jain R. and Tiwari A. Biosynthesis of planet friendly bioplastics using renewable carbon source. *J Environ Health Sci Engineer.* 2015, 11(13): 1-13. doi:10.1186/s40201-015-0165-3

85. Raberg M., Voigt B., Hecker M. and Steinbüchel A. A closer look on the Polyhydroxybutyrate- (PHB-) negative phenotype of *Ralstonia eutropha* PHB-4. *PLoS One.* 2014, 9(5): 95907. doi: 10.1371/journal.pone.0095907.

86. Flores-Sánchez A., López-Cuellar M. del R. Pérez-Guevara F. et al. Synthesis of poly-(R-hydroxyalkanoates) by *Cupriavidus necator* ATCC 17699 using Mexican avocado (*Persea americana*) oil as a carbon source. *Int. J. of Polymer Science.* 2017, 2017: 1–10. doi:10.1155/2017/6942950

87. Estimation of reducing sugars by dinitrosalicylic acid method Available online: https://faculty.ksu.edu.sa/sites/default/files/lab_2_21.pdf

88. Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry.* 1959, 31(3): 426–428. doi:10.1021/ac60147a030

89. Weatherburn M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry.* 1967, 39(8): 971–974. doi:10.1021/ac60252a045

90. Determination of ammonium in precipitation Available online: https://projects.nilu.no/ccs/manual/documents/04_4-Determination%20of%20ammonium%20in%20precipitation.htm

91. Є.Є. Костенко, О.М. Бутенко Аналітична хімія [Електронний ресурс]: Конспект лекцій з дисципліни «Аналітична хімія» для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальностей: 161 «Хімічні технології» та 162 «Біотехнології та біоінженерія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2019. – 143 с.

92. Спектрофотометрія в хімічному аналізі [Електронний ресурс].

Режим

доступу:

https://allreferat.com.ua/uk/fizuka_himiya_astronomiya/referat/3580

93. LibreTexts Chemistry. UV-Visible Spectroscopy. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_\(Barron\)/04%3A_Chemical_Speciation/4.04%3A_UV-Visible_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/04%3A_Chemical_Speciation/4.04%3A_UV-Visible_Spectroscopy)
94. Repaske R. and Repaske A. Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. And Env. Microbiol.* 1976 32(4): 585 – 591. doi: [10.1128/aem.32.4.585-591.1976](https://doi.org/10.1128/aem.32.4.585-591.1976)
95. Profcontrol.de – Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis Spectrometer 8x Cell Changer 190-1100 0.5-4nm [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://profcontrol.de/Perkin-Elmer-Lambda-35-UV-Vis-Spectrometer-8x-Cell-Changer-190-1100-05-4nm>
96. SpectroLab – Scientific Incorporation. PerkinElmer Lambda 35 UV/Vis Spectrophotometer [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.spectralabsci.com/equipment/perkin-elmer-lambda-35-uv-vis-spectrophotometer/>
97. Лукашевич С. А., Рожнова Р. А., Галатенко Н. А., Козлова Г. А. Отримання епоксиполіуретанових композицій, модифікованих полігідроксибутиратом та доксорубіцином. Дослідження їхньої структури та властивостей. *Полімерний журнал.* 2011, 33(3): 44 – 52
98. FTIR Analysis Available online: <https://rtilab.com/techniques/ftir-analysis/>
99. Oliveira F., Dias C., Castilho L. and Freire D. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology.* 2007, 98(3): 633–638. doi:10.1016/j.biortech.2006.02.0
100. Mohapatra S., Sarkar B., Samantaray D. et al. Bioconversion of fish solid waste into PHB using *Bacillus subtilis* based submerged fermentation process. *Environmental Technology.* 2017, 38(24):3201–3208. doi:10.1080/09593330.2017.1291759

101. Preethi R., Sasikala P. and Aravind J. Microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) utilizing fruit waste as a substrate. *Res in Biotech.* 2012, 3(1):61-69

102. PerkinElmer Spectrum RX I (RX-1) FT-IR System in Markham, Ontario, Canada Available online: <https://www.machinio.com/listings/26188633-perkinelmer-spectrum-rx-i-rx-1-ft-ir-system-in-markham-canada>

103. Perkin Elmer Spectrum RX1 Pc Ready LX185256 Available online: <https://www.labplanet.com/perkin-elmer-spectrum-rx1-pc-ready-lx185256.html>

104. Теорія та методи дослідження і випробування пластмас, клеїв та герметиків: навч. посібник / Л.П. Підгорна, Г.М. Черкашина, В.В. Лебедєв – Харків : НТУ “ХПІ”, 2015. – 276 с.

105. Конспект лекцій з дисципліни “Аналіз полімерів” / Федорченко С.В., Хацевич О.М. – Івано-Франківськ: ДВНЗ «ПНУ ім. Стефаніка», 2019. – 85 с.

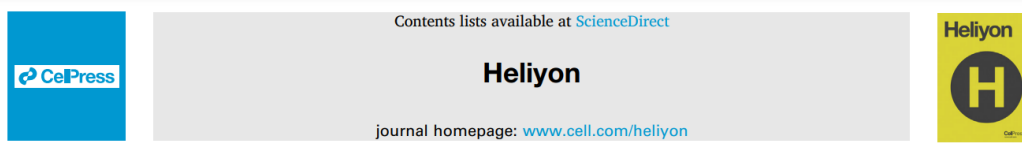
106. Контроль якості готової продукції [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://buklib.net/books/36017/>

107. Екологічна політика підприємства, як основна складова його економічної стратегії [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://core.ac.uk/reader/14043680>

108. Технологія очистки стічних вод ГК "ПРОМТЕХВОД" [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.ekvent.com.ua/uk/%D1%82%D0%B5%D1%85%D0%BD%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%97/%D0%BE%D1%87%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%BA%D0%B0-%D1%81%D1%82%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%B8%D1%85-%D0%B2%D0%BE%D0%B4-%D0%B3%D0%BA-%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BC%D1%82%D0%B5%D1%85%D0%B2%D0%BE%D0%B4>

109. СПБО [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promtehvod.ua/ua/spbo/>

110. Установка повної біологічної очистки стічних вод СПБО-60, до 60 м³/добу [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promtehvod.kiev.ua/ua/p639976304-ustanovka-polnoj-biologicheskoy.html>



Research article

Improved fermentation strategies in a bioreactor for enhancing poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production by wild type *Cupriavidus necator* from fructose



Daiana Nygaard^{a,b,*}, Oxana Yashchuk^{a,b}, Diego G. Nosedá^{b,c}, Beatriz Araoz^{a,b}, Éliada B. Hermida^{a,b}

^a School of Science and Technology, National University of San Martín (UNSAM), Av. 25 de mayo 1147, B1650HMK, San Martín, Buenos Aires, Argentina

^b Argentine Council of Scientific and Technical Research (CONICET), Godoy Cruz 2290, C1425FQB, CABA, Argentina

^c Institute for Biotechnological Research, CONICET-UNSAM, 25 de Mayo y Francia, B1650HMK, San Martín, Buenos Aires, Argentina

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strain and media

Cupriavidus necator ATCC 17697 was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, USA) and maintained on nutrient agar plates at 4 °C. Inoculum and bioreactor fermentations were performed in saline basal medium. It contained 20–40 g/l of fructose as the carbon source and 1.5–3.0 g/l of ammonium sulfate as the nitrogen source. These concentrations of carbon and nitrogen were changed depending on the fermentation strategy. The saline basal medium contained also potassium dihydrogen phosphate 4.35 g/l, sodium monobasic phosphate 4.35 g/l, magnesium sulfate heptahydrate 0.5 g/l and microelement solution 2 ml/l. The microelement solution contained FeSO₄ 2.0 g/l, MnCl₂·4 H₂O 0.03 g/l, CaCl₂·2H₂O 2.0 g/l, CuCl₂·2H₂O 0.01 g/l, ZnSO₄·7 H₂O 0.1 g/l, H₃BO₃ 0.3 g/l, CoCl₂·6H₂O 0.2 g/l, NiCl₂·6H₂O 0.02 g/l and Na₂MoO₄·2H₂O 0.03 g/l in 0.1 N HCl solution [54]. The pH of the culture medium was adjusted to 7.0 ± 0.2 by the addition of 1 N HCl and 2 N NaOH.

2.2. PHB production by bioreactor fermentations

The production of PHB by *C. necator* ATCC 17697 was carried out by fermentation in a bioreactor using both batch and fed-batch strategies. Fermentations were performed in a 6 l stirred-tank bioreactor (BioFlo 110, New Brunswick Scientific; Edison, NJ), interfaced with Bio-command Bioprocessing software (New Brunswick Scientific) for parameter control and data acquisition. To obtain the bacterial inoculum, a volume of 200 ml of culture medium in a 1 l Erlenmeyer flask was inoculated with single colonies of *C. necator* ATCC 17697 and incubated at 30 ± 1 °C and 150 rpm for 24 h. This culture was employed to inoculate 2 l of culture medium contained in the bioreactor. The size of the inoculum (10%) is twice that used in the Erlenmeyer flask scale. The pH was measured *in situ* using a pH electrode (Mettler-Toledo GmbH, Germany). Dissolved oxygen concentration (dO₂, % saturation) was measured with a polarographic probe (InPro6110/320, Mettler-Toledo GmbH) and modulated by controlling the agitation speed and adding filter-sterilized air (0.22 μm). Temperature was maintained at 30 ± 1 °C and foam formation was avoided by the addition of 0.3 % (v/v) antifoam 289 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Batch and fed-batch procedures are described below.

3. Results and discussion

3.1. Development of the fermentation process to enhance PHB production

3.1.1. Enhanced batch production of PHB through the fermenter

Two batch fermentations of *C. necator* ATCC 17697 were performed to determine the time evolution of total and residual biomass, fructose and ammonium consumption and PHB production. Figure 1A shows the parameters profile for a basal medium with 20 g/l fructose and 32 h incubation (Batch 1).



PHB accumulation begins in the initial exponential phase and continues to increase until culture reaches the stationary phase. Fructose and ammonium consumptions correlate with bacterial growth and consequent polymer accumulation. Both cell growth and PHB accumulation are maximum at 31 h, 7.93 g/l, and 3.35 g/l, respectively. At this time, the PHB volumetric productivity (P_{PHB}) is 0.11 g/(l h), the ammonium sulfate was already exhausted and fructose was consumed completely.

In this batch fermentation, the biomass concentration and polymer productivity were significantly higher, compared to the values obtained in our previous work [52] in shaken flask cultures during 72 h: 6.5 g/l and 0.06 g/(l h), respectively (Table 1). However, due to the depletion of the carbon source in the culture medium, the accumulation of PHB was stopped in the early stage of the stationary phase, without reaching higher values. The best medium chosen for shaken flask cultures is not always the best medium for bioreactor fermentations. This result has already been pointed out by Kennedy and Krouse [59].

By this batch fermentation (Batch 1), higher biomass level was attained in less than half time compared to results obtained in our previous work using shaken flasks culture [52]; however, the PHB accumulation process stopped due to fructose depletion. Therefore, to optimize the production process in a bioreactor, a second batch fermentation (Batch 2) was carried out in a culture medium, doubling the concentrations of carbon and nitrogen sources (Figure 1B). In this fermentation, the exponential cell growth phase began after a lag phase of around 8 h. At 25 h all the ammonium sulfate in the culture medium was consumed, triggering PHB synthesis in the last phase of the fermentation process. The exponential growth finished after 33 h with a production of 10 g/l of biomass, where 4.13 g/l corresponds to the amount of accumulated polymer. Then, the residual biomass remained constant, while the total biomass increased exclusively by the intracellular accumulation of PHB. As a result, after 76 h of this batch fermentation 14.4 g/l of biomass and 9.90 g/l of PHB concentration were obtained, which represents a P_{PHB} of 0.13 g/(l h) (Table 1). These results were consistent with those reported by Khanna and Srivastava [23], showing a slight improvement in PHB production.

Article

Polyhydroxyalkanoate Production from Fruit and Vegetable Waste Processing

Paolo Costa, Marina Basaglia , Sergio Casella and Lorenzo Favaro * 

Department of Agronomy, Food, Natural Resources, Animals and Environment (DAFNAE),
University of Padova, Agripolis, 35020 Legnaro, (PD), Italy

* Correspondence: lorenzo.favaro@unipd.it; Tel.: +39-049-8272800

Abstract: Traditional plastics represent a tremendous threat to the environment because of increases in polluting manufacturing as well as their very extended degradation time. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polymers with similar performance to plastic but are compostable and synthesizable from renewable sources and therefore could be a replacement for fossil-based plastics. However, their production costs are still too high, thus demanding the investigation of new and cheap substrates. In this sense, agricultural wastes are attractive because they are inexpensive and largely available. Specifically, fruit and vegetables are rich in sugars that could be fermented into PHAs. In this work two strains, *Cupriavidus necator* DSM 545 and *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034, well-known PHA-producing microbes, were screened for their ability to grow and accumulate PHAs. Ten different fruit and vegetable processing waste streams, never before reported in combination with these strains, were tested. Residues from red apple and melon were found to be the most suitable feedstocks for PHA production. Under specific selected conditions, *C. necator* DSM 545 accumulated up to 7.4 and 4.3 g/L of 3-hydroxybutyrate (3HB) from red apple and melon, respectively. Copolymer production

2.2. Culture Media and Experimental Set-Up

Inocula of *C. necator* DSM 545 and *H. pseudoflava* DSM 1034 were performed at 30 °C in 100 mL flasks under aerobic conditions (145 × g) with a final volume of 30 mL. DSMZ-81 culture medium was prepared at 10 times concentration and supplemented with 30 g/L D-glucose. The DSMZ-81 broth had the following composition (g/L): NH₄Cl 1, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaHCO₃ 0.5, KH₂PO₄ 2.3, Na₂HPO₄·7H₂O 2.9, CaCl₂·2H₂O 0.01, and ferric ammonium citrate 0.05. Afterward, in 1 L of DSMZ-81 medium, 0.5 mL of microelement solutions were added. The composition of the latter mixture was the following (g/L): ZnSO₄·7H₂O 0.1, MnCl₂·4H₂O 0.03, H₃BO₃ 0.3, CoCl₂·6H₂O 0.2, CuCl₂·2H₂O 0.01, NiCl₂·6H₂O 0.02, and Na₂MoO₄·2H₂O 0.03. DSMZ-81 was also supplemented with the following standard vitamin solution (final concentration mg/L): riboflavin 0.0005; thiamine-HCl·2H₂O 0.0025; nicotinic acid 0.0025; pyridoxine-HCl 0.0025; Ca-pantothenate 0.0025; biotin 0.000005; folic acid 0.00001; and vitamin B12 0.00005. After overnight growth, bacterial cells were harvested by centrifugation (6000 × g for 15 min), washed twice, and resuspended in the same volume of NaCl 0.9% (w/v).

Initially, all the waste-derived extracted solutions, enriched with 10-fold DSMZ-81 medium (10% of total volume), were screened as possible substrates for *C. necator* DSM 545 and *H. pseudoflava* DSM 1034 growths. Thus, cells were aerobically inoculated at 30 °C under shaking for 66 h onto a 96-well plate loaded on a TECAN SPARK 10M reader monitoring bacterial growth by measuring optical density (OD₆₀₀ nm) every hour. After that, the experiment was replicated on a larger scale, in 100 mL flasks, up to a working

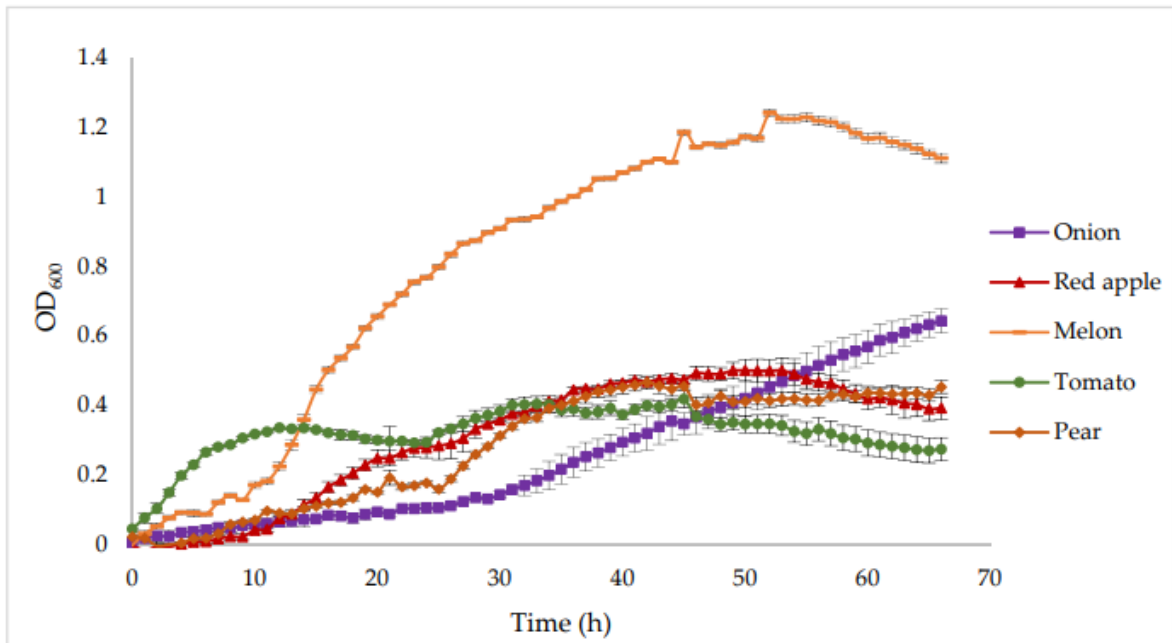


Figure 1. Growth (OD_{600}) of *C. necator* DSM 545 at 30 °C in DMSZ-81 broth supplemented with water-extracted solutions of different fruit and vegetable waste. The data are the means of three replicates (\pm SD).

Table 3. Biomass production and 3HB and 3-hydroxybutyrate (3HV) accumulation by *C. necator* DSM 545 after 96 h from tomato, pear, red apple, or melon as the sole carbon sources. Flasks were supplemented with either complete DMSZ-81, DMSZ-81 deprived of NH_4Cl , or water. Media were sterilized either by filtering or autoclaving. The values represent the mean of three replicates (\pm SD).

	Sterilization	Culture Medium	CDM (g/L)	3HB (% CDM)	3HB (g/L)	3HV (% CDM)	3HV (g/L)
Tomato	Filtration	DSMZ-81	0.7 ± 0.22	0.3 ± 0.6	-	-	-
		DSMZ-81 (no NH_4Cl)	1.3 ± 0.03	34.6 ± 2.5	0.4 ± 0.1	-	-
		Water	0.1 ± 0.00	-	-	-	-
Pear	Filtration	DSMZ-81	1.2 ± 0.02	1.3 ± 0.7	0	-	-
		DSMZ-81 (no NH_4Cl)	0.8 ± 0.04	54.5 ± 11.3	0.4 ± 0.2	-	-
		Water	0.1 ± 0.01	-	-	-	-
Red apple	Filtration	DSMZ-81	10.9 ± 0.1	67.9 ± 0.6	7.4 ± 0.01	-	-
		DSMZ-81 (no NH_4Cl)	6.2 ± 0.2	79.1 ± 0.9	4.9 ± 0.03	-	-
		Water	4.9 ± 0.2	79.7 ± 0.1	3.9 ± 0.04	-	-

Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia

M. W. Weatherburn

Laboratory of Hygiene, National Health and Welfare, Ottawa, Canada

The Berthelot color reaction has been investigated with the particular aim of presenting a simple, reliable analytical procedure. The combination of two reagents prepared readily, phenol plus nitroprusside and alkali plus hypochlorite, gave excellent reproducibility with great convenience. After the ammonium sulfate sample was mixed with the phenol reagent the hypochlorite reagent could be added up to 30 minutes later without change of absorbance, whereas if this sample were mixed with a reagent containing hypochlorite or with alkaline phenate plus nitroprusside, there was a decrease in absorbance unless the second reagent was added immediately. Satisfactory color development with minimal precautions was given by a variety of reagent concentrations and by reaction temperatures of 20°, 25°, 37°, and 75° C. Sensitivity was increased at 75° C although the time to reach maximum absorbance was longer than at 37° C. The absorbance maximum was reached quickly at 100° C but this temperature is not recommended because the absorbance decreased rapidly thereafter.

(B) Alkaline hydrochlorite; 2.5 grams of sodium hydroxide, 4.2 ml of sodium hypochlorite to 500 ml of solution. Store in amber bottle in refrigerator, possibly 1 month.

The basic procedure is a modification of the method of Chaney and Marbach (2): Reagent A, 5.0 ml measured from automatic pipet (Schuco Polypette) into test tube. Specimen, 20 μ l of standard solution of ammonium sulfate, measured in a Microcap (Drummond Scientific Co., Broomall, Pa.; precalibrated capillary tubing tolerance $\pm 1\%$), added to tube. Tube covered with parafilm, shaken vigorously to mix. Reagent B, 5.0 ml measured from automatic pipet, added, mixed thoroughly. Color development at 37° C, for 20 minutes. Absorbance measured at room temperature at 625 m μ .

Rate of Reaction. Using the concentrations of reagents as above, with the exception of nitroprusside which was varied from 0.4 to 20 mg per 100 ml of solution, the rate of reaction was investigated at six temperatures ranging from 20° to 100° C. By use of a Haake thermostatically controlled circulating water bath the temperature of the cuvette com-

EXPERIMENTAL

Reagents for all studies were phenol, sodium nitroprusside (sodium pentacyanonitrosylferrate III), sodium hydroxide, sodium hypochlorite (5% available chlorine), and ammonium sulfate; all were reagent grade.

Solutions were prepared from water which had been passed through a cartridge of ion exchange resin, Ilco-way Ion X changer, for removal of ammonium ion.

Basic Reagents (2). (A) Phenol plus nitroprusside; 5 grams of phenol with 25 mg of sodium nitroprusside per 500 ml of solution. Store in amber bottle in refrigerator, 1 month.

Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar

GAIL LORENZ MILLER

Pioneering Research Division, Quartermaster Research and Engineering Center, Natick, Mass.

► Rochelle salt, normally present in the dinitrosalicylic acid reagent for reducing sugar, interferes with the protective action of the sulfite, but is essential to color stability. The difficulty may be resolved either by eliminating Rochelle salt from the reagent and adding it to the mixture of reducing sugar and reagent after the color is developed, or by adding known amounts of glucose to the samples of reducing sugar to compensate for the losses sustained in the presence of the Rochelle salt. The optimal composition of a modified dinitrosalicylic acid reagent is given.

THE DINITROSALICYLIC ACID REAGENT, developed by Sumner and co-worker (11-14) for the determination of reducing sugar, is composed of dinitrosalicylic acid, Rochelle salt, phenol, sodium bisulfite, and sodium hydroxide. According to the authors of the test, Rochelle salt is introduced to prevent the reagent from dissolving oxygen (12); phenol, to increase the amount of color produced and to balance the effect of phenol encountered in urine (13); and bisulfite, to stabilize the color obtained in the presence of the phenol (13). The alkali is required for the reducing action of glucose on dinitrosalicylic acid.

The major defect in the test is in the loss of part of the reducing sugar being analyzed. This was pointed out by Sumner (12, 14), was referred to by Brodersen and Ricketts (2), and has been observed repeatedly in this laboratory (6, 8, 9). Evidence of loss of sugar is also given by the data of Hostettler, Borel, and Deuel (4) and of Bell, Manners, and Palmer (1). As this defect appears never to have been fully remedied, the present study was carried out to investigate the different factors which might cause it. In the course of the investigation, the effects of varying the concentrations of the

426 • ANALYTICAL CHEMISTRY

METHOD

The color tests were made with 3-ml. aliquots of reagent added to 3-ml. aliquots of glucose solution in 14-mm. tubes. The mixtures were heated for 5 minutes in a boiling water bath and then cooled under running tap water adjusted to ambient temperature. Cooling to ambient temperature was made necessary by the effect of temperature on the absorbance of the colored reaction product (2), an effect confirmed by the present studies. The color intensities were measured in a Beckman Model DU spectrophotometer at 575 $m\mu$ with a slit width of 0.06 mm.

The reagent of Sumner and Sisler (14) and a modified reagent were used in the tests. The former contained approximately 0.63% dinitrosalicylic acid, 18.2% Rochelle salts, 0.5% phenol, 0.5% sodium bisulfite, and 2.14% sodium hydroxide; the modified reagent contained 1% dinitrosalicylic acid, 0.2% phenol, 0.05% sodium sulfite, and 1% sodium hydroxide.

ABSTRACT

Fi
a

For certain tests the modified reagent included varying concentrations of Rochelle salt. The composition chosen for the modified reagent was based on the results of preliminary tests which indicated that such a reagent was optimal and would serve best as the basis of reference for testing effects of variation in composition. In the absence of Rochelle salt, the color obtained with the modified reagent was unstable. To stabilize the color under these conditions, 1 ml. of a 40% solution of the salt was added to the mixture of reactants subsequent to the development of the color and prior to cooling.

The modified reagent was prepared by placing all solid components in a container and dissolving them simultaneously by stirring with the required volume of sodium hydroxide solution. This was much simpler than other procedures (2, 14).

The modified reagent produced the same color with glucose from day to day, thus proving more stable in this respect than the reagent of Brodersen and Ricketts (2). Modified reagent to which Rochelle salt was added also did not change from day to day in this respect. Depending upon storage conditions, however, the modified reagent tended eventually to deteriorate from atmospheric oxidation of the sulfite present. Deteriorated reagent was rejuvenated by the addition of fresh sulfite. The danger attendant upon oxidation of sulfite could be avoided by preparing the reagent in large batches without sulfite, the sulfite being added to aliquots just prior to the time when the reagent was to be used.

DISCUSSION

The chemistry of the dinitrosalicylic acid test for reducing sugar has been clarified previously, at least in part. The 3,5-dinitrosalicylic acid is reduced to 3-amino-5-nitrosalicylic acid while, in the simplest instances, the aldehyde groups appear to be oxidized to carboxyl groups (4). The facts, however, that the equivalence between amino-nitrosalicylic acid produced and sugar is not exact (4) and that different sugars yield different amounts of color (1, 4, 7), suggest that the chemistry of the test may actually be appreciably more complicated.

2.3. Analytical methods

Cell samples from bioreactor fermentations were harvested by centrifugation for 10 min at 3500 rpm (Presvac INS-DCA-300RTV), washed twice with distilled water and air-dried at 105 °C until constant weight (Numak DHG-9053A). Weights of the dried samples were considered as the dry cell weights and denoted as biomass (g/l). The recovered supernatant was used to determine the fructose and ammonium concentrations. Fructose concentration was determined by total organic carbon quantification through TOC-L Analyzer (Shimadzu) that operates in interface with TOC-Control L/V software.

The determination of ammonium concentration was performed according to the method of indophenol blue [55]. Quantitative estimation of PHB from biomass was carried out by the ultraviolet (UV) spectrophotometer method [56]. PHB was dissolved in 80 % (v/v) sulfuric acid solution and exposed at 100 °C for half an hour to be converted into crotonic acid. The sulfuric 80 % (v/v) acid solution without the polymer was used as blank. The absorbance of the solution was measured at 234 nm in a PerkinElmer Lambda 35 UV/Vis spectrometer. The commercially available Biocycle® 1000 - PHB polymer (PHB Industrial S/A, Brazil) was used as standard.

Biomass is composed of two components: i) the catalytically active component consists of proteins and nucleic acids (residual biomass), and ii) the inert component, the product PHB [47]. Henceforth, the residual biomass was defined as total biomass weight minus PHB weight.