МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»	**«До захисту допущено»**
Декан факультету	Завідувач кафедри
_____ _Наталія ГРЕГІРЧАК_	_____ _Віктор СТАБНІКОВ_
(підпис) (ім'я та прізвище)	(підпис) (ім'я та прізвище)
«_6_» ____червня_____ 2024 р.	«_6_» ___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: Біосинтез ацетону *Clostridium acetobutylicum*

Виконав: здобувач__IV__ курсу, групи__2___

_____ПОЛІЩУК Богдан Анатолійович_____ _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _УДИМОВИЧ Віктор Миколайович_____ _____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

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

Рецензент Валентин ПОДОЛЯНЧУК _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач_____
(підпис)

Київ – 2025 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри _біотехнології і_____
_____мікробіології_____

_____Віктор СТАБНІКОВ_
“_01_” __березня__2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

_____ Поліщука Богдана Анатолійовича_____
(прізвище, ім’я, по батькові)
1. Тема роботи _Біосинтез ацетону *Clostridium acetobutylicum*_____
_____
керівник роботи Удимович Віктор Миколайович доктор філософії, ст. викл. ,
(прізвище, ім’я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 27 березня 2025 року № 188-кс
2. Строк подання здобувачем роботи __28 травня 2025 р._____
3. Вихідні дані до роботи _ біологічний агент: *Clostridium acetobutylicum*; цільовий продукт: ацетон; геометричний об’єм ферментера: 20 м^3; коефіцієнт заповнення: 0,8

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; контроль виробництва._____
5. Перелік графічного матеріалу
Технологічна схема біосинтезу ацетону *Clostridium acetobutylicum*- 2 аркуші формату А1_____
Апаратурна схема біосинтезу ацетону *Clostridium acetobutylicum* - 4 аркуш формату А1_____

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.03.25-08.03.25	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	08.03.25-24.03.25	
3	Техніко-економічне обґрунтування	24.03.25-31.03.25	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва	31.03.25-14.04.25	
5	Специфікація обладнання	14.04.25-28.04.25	
6	Опис технологічної схеми	28.04.25-05.05.25	
7	Контроль виробництва	05.05.25-12.05.25	
8	Оформлення кваліфікаційної роботи	12.05.25-28.05.25	
9	Оформлення графічної частини	14.04.25-28.05.25	

Здобувач _____ Богдан ПОЛІЩУК
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____ Віктор УДИМОВИЧ
(підпис) (ім'я та прізвище)

ABSTRACT

The qualification thesis addresses the development of a technological and equipment-level scheme for the biosynthesis of acetone by co-cultivating a super-producing strain of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (producer of ABE-fermentation products) together with *Saccharomyces cerevisiae*. The strain was selected after an extensive survey of the literature. *C. acetobutylicum* ATCC 824 exhibits a high overall ABE titre of 21 g L^{-1}, including 8,56 g L^{-1} of acetone. Alternative strains and cultivation methods achieve comparable acetone titres but require more complex and costly nutrient media to maintain that level of production.

The technological scheme for acetone biosynthesis covers both auxiliary operations—preparation of hydrochloric-acid solution for medium acidification during sterilisation; preparation of inert gas; hydrolysis of corn meal; and sterilisation of the media—and the core process, which comprises five seed-culture stages followed by biosynthesis in a 20 m^3 fermenter filled to 80 % of its working volume. *S. cerevisiae* is cultivated in two inoculum stages and a main culture. The production technology employs a single-stage, submerged batch process with three acetate-solution feeds and inoculation of *S. cerevisiae* at the 30-hour mark of cultivation.

The thesis consists of an introduction, five chapters, a list of references, and the technological and piping-and-instrumentation diagrams. The total length is 119 pages and includes 9 figure and 22 tables.

Key words: acetone, ABE fermentation, *Clostridium acetobutylicum*, *Saccharomyces cerevisiae*, co-cultivation, submerged cultivation, nutrient medium, biosynthesis, technological scheme.

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота розглядає питання розробки технологічної та апаратної схеми біосинтезу ацетону з використанням методу ко-культивування штаму суперпродуценту *Clostridium Acetobutylicum* ATCC 824 продуктів АБЕ бродіння та *S. cerevisiae*. Штам був відібраний на основі широкого аналізу наявних літературних джерел. *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 характеризуться досить високим синтезом продуктів АБЕ (Ацентон, Бутанол, Етанол) на рівні 21 г/л у загальному та синтезом 8.56 г/л ацетону зокрема. Інші штами та методи культивування характеризуються схожою здатністю синтезу ацетону, але потребують більш складного та дорогого поживного середовища, для підтримки такого рівня синтезу ацетону. Технологічна схема біосинтезу ацетону демонструє допоміжні роботи (підготовка розчину соляної кислоти для підкислення середовища під час стерилізації, підготовка інертного газу, гідроліз кукурудзяного борошна та стерилізаціяпоживних середовищ) та технологічний процес (5 стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 20 $м^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,8) та культивування культури *S. cerevisiae* (2 стадії отримання посівного матеріалу та основне культивування). Технологія отримання ацетону передбачає використання одностадійної схеми культивування глибинним періодичним методом з 3 підживленнями розчином ацетату та внесенням культури *S. cerevisie* на 30 годину культивування.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, п'яти розділів, списку використаних джерел, технологічної та апаратурної схеми. Загальний обсяг роботи – 119 сторінок, 9 рисунка, 22 таблиць.

Ключові слова: ацетон, АБЕ-бродіння, *Clostridium acetobutylicum, Saccharomyces cerevisiae*, ко-культивування, глибинне культивування, поживне середовище, біосинтез, технологічна схема

Зміст

РЕФЕРАТ 5

ВСТУП 8

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА АЦЕТОНУ 10

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА 14

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування 14

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування *Clostridium acetobutylicum* АТСС 824 - продуцента ацетону 19

2.2.1 Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування *Saccharomyces cerevisie* - допоміжного біологічного агента 21

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента 22

2.4. Таксономічний статус біологічного агента 24

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ 25

3.1. Потреба у цільовому продукті 25

3.2. Розрахунок потужності виробництва 25

3.3. Розрахунок геометричного об'єму ферментера 26

3.3.1 Розрахунок геометричного об'єму ферментера для культивування *S. cerevisiae* 27

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу ацетону 27

3.4.1 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для дріжджової культури 31

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО П 33

4.1. Шлях катаболізму гідролізованого кукурудзяного борошна у *Clostridium acetobutylicum* АТСС 824 33

4.2. Біотрансформація гідролізованого кукурудзяного борошна у ацетон 34

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ 37

5.1. Обгрунтування способу культивування і типу ферментера 37

5.2. Обґрунтування стадії підготовки стерильного азоту для біосинтезу ацетону культурою бактерій *Clostridium acetobutylicum* АТСС 824 40

5.2.1 Обґрунтування стадії підготовки стерильного аераційного повітря для створення біомаси культури дріжджів *S. cerevisiae* 41

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів 42

5.3.1. Обгрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів для виробничої ділянки 42

5.3.2 Розрахунок кількості використання миючих та дезінфікуючих засобів для ділянки виробництва ацетон біотехнологічним методом 50

5.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища 57

5.4.1 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування *S. cerevisiae* 65

5.4. Стерилізація розчинів титрувальних агентів 68

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ АЦЕТОНУ ЗА ДОПОМОГОЮ *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM ATCC 824* 75

РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ АЦЕТОНУ 89

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА 95

9.1. Методики мікробіологічного контролю стерильності поживного середовища 95

9.2 Мікробіологічний контроль чистоти посівного матеріалу 96

9.2.1 Методика визначення чистоти посівного матеріалу для культури *S. cerevisie* 97

9.3 Методика визначення концентрації цільового продукту 98

9.4 Концентрація джерела вуглецю 99

9.5 Концентрація джерела азоту 100

9.6 Аналіз концентрації біомаси 101

9.6.1 Послідовність аналізу динаміки росту культури для *C. acetobutylicum* 101

9.6.2 Послідовність аналізу динаміки росту культури для *S. cerevisie* 102

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 109

ВСТУП

Біопаливо та розчинники з відновлюваних ресурсів викликають значний інтерес через глобальне потепління, зміну клімату, нестабільність цін на нафту та законодавчі обмеження щодо невідновлюваних джерел енергії. Ацетон є одним з перспективних продуктів біосинтезу завдяки своєї універсальності, здатності до біосинтезу на досить простих субстратах, найчастіше це відходи с/х виробництва та широким потенційним можливостям до підвищення ефективності його біосинтезу.

Ацетон є продуктом АБЕ (ацетон, бутанол, етанол) бродіння, яке є важливим біотехнологічним процесом, що використовується для виробництва трьох основних хімічних речовин: ацетону, бутанолу та етанолу, шляхом анаеробної ферментації біомаси, багатої на цукри, з використанням бактерій виду *Clostridium acetobutylicum*. Відкритий у 1916 році Хаїмом Вайцманом, цей процес відіграє важливу роль у сучасній промисловості завдяки своїй здатності перетворювати відновлювані ресурси на цінні продукти, що застосовуються в хімічній, паливній та харчовій промисловості. Однак, незважаючи на свої екологічні переваги, АБЕ бродіння все ще стикається з викликами, такими як висока вартість виробництва та низька ефективність, що стимулює подальші дослідження та вдосконалення цього процесу.[1]

Біологічними агентами, що здатні до реалізації цього типу бродіння є бактерії роду *Clostridium*, зокрема види *Clostridium acetobutylicum*, та *Clostridium beijerinckii* та ін. Наразі налічуються десятки різних виробничих штамів, але основний акцент в них був поставлений саме на біосинтез бутанолу, який є одним видів біопалива, що не є актуальним в рамках цього курсового проєктування, тому пошук був зосереджений саме на ефективних продуцентах ацетону [2].

В рамках цієї кваліфікаційної роботи реалізований процес ко-культивування *C. acetobutylicum* та *S. cerevisiae.* Роль *S. cerevisiae* в системі отримання ацетону біотехнологічним методом полягає в тому, щоб слугувати додатковим джерело біохімічного перетворення ростового субстрату, в напів-продукт ацетону, а саме етанол. Також дріжджів виступають допоміжним біологічним агентом-протектором вивільняючи амінокислоти під дією високої концентрації бутанолу, що служить додатковим джерелом підживлення для *C. acetobutylicum* та допомагає підвищити толерантність до високих концентрацій розчинників в середовищі, підвищуючи вихід кінцевого продукту.

Методика виділення ацетону з культуральної рідини залишається актуальною темою і найчастіше базується на використанні технології дистиляції, оскільки температура кипіння ацетону є 56,29℃[3] що є значно вищім за температуру кипіння води, або іншого продукта АБЕ бродіння – бутанолу 118℃[3], що дозволяє отримувати ацетон з будь-якого розчину шляхом ректифікації. Наразі дослідження виділення ацетону базуються на аналізі використання різних екстрагентів та режимів ректифікації з метою отримання

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА АЦЕТОНУ

Ацетон — органічна сполука з формулою $(CH_3)_2CO$. Це найпростіший і найменший кетон. Близько 6,7 мільйонів тонн було вироблено в усьому світі в 2010 році, найбільше його використовували як розчинник та для виробництва пластмас, оскільки він входить до його попередників. [4]

Він має ряд синонінічних назв, які також можна зустріти в літературі таких, як диметилкетон, метилкетон, 2-пропанон, b-кетопропанон, диметилформальдегід, піроуксусний ефір. [5]

У природі ацетон знаходиться у малій кількості, а саме у рослинах, деревах, вулканічних газах, лісових пожежах і як продукт розщеплення жиру в організмі. Надходження ацетону у навколишнє середовище найбільше спричинене різними виробництвами. [5]

У природі ацетон найбільше виділяється з повітря, а саме може переходити під час дощу та снігу у воду та ґрунт та швидко випаровуватися назад у повітря. [5]

У організмі людини є невелика кількість ацетону, яка виділяється з сечею у кількості 20-25 мг, оскільки він є одним із нормальних метаболітів нашого організму.[6]

Органолептичні показники. Ацетон - летка, безбарвна, легкозаймиста речовина з різким специфічним запахом. Дана речовина легко розчиняє велике коло речовин, таких як вода, спирт, диметилформамід, хлороформ, ефір і більшість масел [5].

Хімічні властивості. Брутто-формула – C_3H_6O, молярна маса становить 58,08 г/моль. Щільність ацетону складає 0,784 г/см^3, температура кипіння 56°С, а температура плавлення – -94 °С. Має температуру спалаху -20°С та температура самозаймання 500°С. При змішуванні з ацетону повітрям в діапазоні від 1,6 до 15,3 об. % ацетону суміш стає вибухонебезпечною [5,7,8].

При взаємодії з повітрям, світлом та каталізатором, сильними окислювачами та металами, спричиняє пожежу або вибух. У присутності вологи взаємодіє з залізом і сталлю. [5]

Період напіврозпаду складає приблизно 22 дні. Ацетон розкладається під дією сонячного світла на інші хімічні речовини, також його можуть розкладати мікроорганізми в ґрунті та воді. [5]

Виявляє хімічні властивості, характерні для аліфатичних кетонів, вступає в реакції нуклеофільного приєднання та конденсації за участі як карбонільної, так і метильної груп [8].

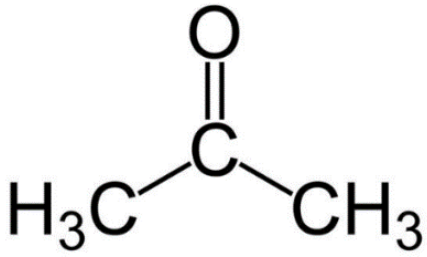


Рис 1.1 Структурна формула ацетону. [9]

Застосування ацетону в різних галузях промисловості

Ацетон - універсальний засіб, що знаходить своє застосування у різних галузях промисловості. У буденному житті його можна зустріти у засобах для зняття косметичного лаку, фарби для волосся, тоніки для волосся, засоби для засмаги. Він широко використовується як розчинник у виробництві синтетичних волокон і пластиків. Крім того, ацетон відомий як ефективний розчинник для нітроемалей та нітролаків, що робить його необхідним компонентом у лакофарбовій промисловості. Також він використовується для розчинення жирів, олій, воску, смол, гуми, пластмас, лаків. Крім застосування ацетону як розчинника його можна застосовувати як осушувач, знежирювач та дезінфекційний засіб для промивання лабораторного посуду в лабораторії. Також має широке застосування в ролі антисептика. [5,7,10,11]

Ацетон застосовується у великому спектрі галузей для виготовлення штучного шовку, фотоплівок, пластмас, волокон та інших хімікатів. Також він є вихідною сполукою синтезу у деякого ряда сполук таких як кетен, оцтовий ангідрид, діацетоновий спирт, окис мезитилу, метилізобутилкетон, метилметакрилат та ін.[5,8]

Харчова промисловість використовує ацетон для екстрагування вітамінів та жирів. [10]

У текстильній промисловості ацетон виявляється корисним у процесах друку та фарбування тканин, допомагаючи забезпечити яскравість та стійкість кольорів. Також один з варіантів його застосування у цій промисловості – це зміцнення та зневоднення тканин. [10]

Ацетон відіграє важливу роль у виробництві кіноплівки, додавання цього розчинника допомагає створити високоякісні та стійкі плівки.[10]

Ще одна з сфер застосування ацетону – це зберігання газоподібного ацетилену.[5] Також цікавою галузю, де він застосовується є виробництво бездимного пороху та небиткого скла. [10]

Виробники ацетону: acetone

- Nátěrové hmoty, spol. s r.o. (Чехія) [12]
- Корпорація Sunnyside (США)
- SANKYO CHEMICAL CO., LTD. (Японія)
- Junsei Chemical Co., Ltd. (Японія)
- Kishida Chemical Co., Ltd. (Японія)
- KH Neochem Co., Ltd. (Японія)
- Mitsubishi Chemical Corporation (Японія)
- FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Японія)
- nacalai (Японія)
- Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific. (Велика Британія) [13]
- ALTIVIA Specialty Chemicals, LLC (США)
- BASF SE (Німеччина)
- Borealis (Австрія)
- INEOS Group Limited (Велика Британія)
- Kumho P&B Chemicals, INC. (Південна Корея)
- Mitsui Chemicals, Inc. (Японія)
- PTT Phenol Company Limited (Таїланд)
- Shell plc (Велика Британія) [14]

Токсична дія:

При впливі на організм людини вище нормального може подразнити очі та дихальну систему та призвести до головного болю, запаморочення, сплутаності свідомості, прискореного пульсу, нудоти, блювоти, сонливості, втрати свідомості та, можливо, коми, а також може скоротити менструальний цикл у жінок. Однак подразнення органів дихання є сигналом до припинення роботи з речовиною для запобігання вдихання ацетону далі, що може призвести до перечислених раніше наслідків. [5]

Повільно виводиться з організму. Канцерогенної дії він не проявляє. Можливі хронічні отруєння при ГДК 200 мг/м^3. [5,8]

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Ацетон, важлива хімічна речовина, широко використовується як цінний розчинник, хімічний проміжний продукт і добавка до палива [15]. Сьогодні приблизно 83% ацетону виробляється невідновлюваними викопними ресурсами [16]. Класичний шлях синтезу ацетону відбувається з вичерпних нафтопродуктів, тому пошук економічно вигідного шляху біосинтезу ацетону з рослинної сировини, або органічних відходів є актуальним, оскільки це може знизити собівартість продукції та зробити виробництво органічних розчинників менш шкідливим для навколишнього середовища [17].

Біосинтез ацетону відбувається в рамка ацетон-бутанол-етилового бродіння, зі співвідношенням виходу сполук 3:6:1. Потенційно біосинтез ацетону може замінити на 70% використання викопних ресурсів для хімічного синтезу сполуки. [18]

Згідно існуючої наукової літератури, основними біологічними агентами для АБЕ бродіння є бактерії роду *Clostridium*, в залежності від виду бактерії, можна спостерігати підвищений синтез одного компонента АБЕ бродіння за інгібування іншого. Наприклад висока концентрація бутанолу під АБЕ бродіння здатне інгібувати синтез ацетону, та навпаки. Це відбувається через інгібування ферментів надлишком одного з продуктів АБЕ бродіння, оскільки вони мають загальні метаболічні шляхи [19]. А також високі концентрації бутанолу в культуральному середовищі (концентрація вище 20 г/л) мають сильну інгібуючу дію на ріст культури, що є обмежуючим фактором під час виробничої ферментації.

Згідно наукової літератури останніх 10 років, було досліджено здатність різних видів непатогенних видів бактерій роду *Clostridium* до бродіння АБЕ на натуральних субстратах з високою концентрацією крохмалю, а саме кукурудзяне борошно або плоди маніоки. Аналізуючи джерела було складено виявлено, що: *C. acetobutylicum*

ATCC 824, *C. acetobutylicum* 260, *C. butylicum* NRRL 592, *C. saccharobutylicum* (BAS/B3/SW/336(S) та *C. beijerinckii* NCP P260 є найефективнішими у біосинтезі ацетону, як компонента АБЕ бродіння.

У дослідженні [20] було описана ефективність штамів *C. acetobutylicum* 260 та *C. butylicum* NRRL 592 до АБЕ бродіння, результати показали високу продуктивність ферментних систем обох штамів, саме концентрація ацетону становила 7,5 г/л та 6,5 г/л відповідно, але згідно аналізу вартості поживного середовища, представленого в таблиці 2.2 використання синтетичного поживного середовища для виробничого біосинтезу не є економічно вигідним у порівнянні з іншими дослідженнями

В іншому дослідженні [21] був досліджений біосинтез ацетону штамами *C. saccharobutylicum* (BAS/B3/SW/336(S), *C. beijerinckii* NCP P260, які також показали очікувано високий результат продуктивності АВЕ, оскільки *C. beijerinckii* NCP P260 є класичним виробничим штамом, який синтезує 7,6 грам ацетону на літр середовища, що виявилося найвищим показником зі всіх аналізованих штамів. Але після проведення економічного аналізу складу поживного середовища представленого в таблиці 2.2, виявилося, що культивування на стандартному виробничому середовищі, де основним ростовим субстратом виступає меляса - не є доцільним, оскільки ціна за літр середовища була в 3-4 рази вища у порівнянні з іншими.

Також була досліджена продуктивність штаму *C. acetobutylicum* ATCC 824, в результатах дослідження [19] було показано, що доданий ацетат суттєво підвищує продуктивність АБЕ ферментації, результати якої представлені в таблиці 2.1. Загалом, біосинтез ацетону був на рівні 8,56 г/л середовища після 65 годин культивування, що є досить високим показником. Після економічного аналізу натурального виробничого середовища, що представляло собою гідролізоване кукурудзяне борошно та ацетат, було виявлено що воно є значно дешевшим ніж у інших аналізованих штамів.

Тому згідно аналізу таблиць 2.1-2.3 варто відмітити, що штам *C. acetobutylicum* ATCC 824 має краще співвідношення рівня біосинтезу цільового продукту, часу культивування та вартості поживного середовища.

Таблиця 2.1

Особливості одержання ацетону шляхом біосинтезу на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год.	Концентрація, г/л	Умови культивування	Використана література
	Компонент	Концентрація, г/л				
Clostridium acetobutylicum ATCC 824	Гідролізоване кукурудзяне борошно Ацетат	150 8	65	8,56	Періодичне культивування, pH=5±0,1, 37±0,5°C, ко-культивування з культурою *S. cerevisiae* проводилося в 7 літровому ферментері в атмосфері азоту. 10% інокуляту.	Enhancing acetone biosynthesis and acetone–butanol–ethanol fermentation performance by co-culturing *Clostridium acetobutylicum/Saccharomyces cerevisiae* integrated with exogenous acetate addition / H. Luo et al. Bioresource Technology. 2016. Vol. 200. P. 111–120. URL: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.116
Clostridium acetobutylicum 260	Глюкоза Амоній Ацетат Дріжджовий екстракт KH2PO4 K2HPO4 MgSO4·7H2O MnSO4·7H2O FeSO4·7H2O NaCI Парааміобензойдна кислота Тіамін Біотин	60 2,2 1 0,5 0,5 0,2 0,01 0,01 0,01 0,001 0,001 0,00001	65	7,5	Періодичне культивування при 35±0,5°C, та 6% внесені інокуляту, культивування в колбах об'ємом 175 мл, з 120 мл середовища в кожній..	Ezeji T., Blaschek H. P. Fermentation of dried distillers' grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic clostridia. Bioresource Technology. 2008. Vol. 99, no. 12. P. 5232–5242. URL: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.032

Закінчення табл. 2.1

C. butylicum NRRL 592	Глюкоза Амоній Ацетат Дріжджовий екстракт KH2PO4 K2HPO4 MgSO4·7H2O MnSO4·7H2O FeSO4·7H2O NaCI Парааміобензойдна кислота Тіамін Біотин	60 2,2 1 0,5 0,5 0,2 0,01 0,01 0,01 0,001 0,001 0,00001	60	6,5	Періодичне культивування при 35±0,5℃, та 6% внесені інокуляту, культивування в колбах об'ємом 175 мл, з 120 мл середовища в кожній.	Ezeji T., Blaschek H. P. Fermentation of dried distillers' grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic clostridia. Bioresource Technology. 2008. Vol. 99, no. 12. P. 5232–5242. URL: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.032
C. saccharobutylicum (BAS/B3/SW/336 (S)	Меляса Дріжджовий екстракт CaCO3 (NH4)2SO4 Ca3(PO4)2	60 10 3,2 2 1	48	6	Періодичне культивування, pH 6,5±0,1, температура 35±0,5℃	Shaheen, R., Shirley, M., & Jones, D. T. (2000). Comparative fermentation studies of industrial strains belonging to four species of solvent-producing clostridia. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *2*(1), 115-124.
C. beijerinckii NCP P260	Меляса Дріжджовий екстракт CaCO3 (NH4)2SO4 Ca3(PO4)2	60 10 3,2 2 1	48	7,6	Періодичне культивування, pH 6,5±0,1, температура 35±0,5℃	Shaheen, R., Shirley, M., & Jones, D. T. (2000). Comparative fermentation studies of industrial strains belonging to four species of solvent-producing clostridia. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *2*(1), 115-124.

Таблиця 2,2

Розрахунок вартості поживних середовищ для культивування штамів ацетоногенних *Clostridium*

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)*
Clostridium acetobutylicum ATCC 824	Гідролізоване кукурудзяне борошно	150	23	3,45	1
	Ацетат	8	55	0,44	1
Загальна вартість 3,89 грн на літр					
Clostridium acetobutylicum 260	Глюкоза	60	58	3,48	1
	Амоній Ацетат	2,2	180	0,396	1
	Дріжджовий екстракт	1	1540	1,54	3
	KH2PO4	0,5	261	0,13	1
	K2HPO4	0,5	125	0,06	1
	MgSO4*7H2O	0,2	7,5	0,002	2
	MnSO4*7H2O	0,01	58	0,0006	2
	FeSO4*7H2O	0,01	24	0,0002	2
	NaCI	0,01	15	0,0002	1
	Параамінобензойдна кислота	0,001	2400	0,002	4
	Тіамін	0,001	1800	0,002	4
	Біотин	0,00001	800	0,000008	4
Загальна вартість 5,61 грн					
C. butylicum NRRL 592	Глюкоза	60	58	3,48	1
	Амоній Ацетат	2,2	180	0,396	1
	Дріжджовий екстракт	1	1540	1,54	3
	KH2PO4	0,5	261	0,13	1
	K2HPO4	0,5	125	0,06	1
	MgSO4*7H2O	0,2	7,5	0,002	2
	MnSO4*7H2O	0,01	58	0,0006	2
	FeSO4*7H2O	0,01	24	0,0002	2
	NaCI	0,01	15	0,0002	1
	Параамінобензойдна кислота	0,001	2400	0,002	4
	Тіамін	0,001	1800	0,002	4
	Біотин	0,00001	800	0,000008	4
Загальна вартість 5,61 грн					
C. saccharobutylicum (BAS/B3/SW/336(S)	Меляса	45	32	1,44	1
	Дріжджовий екстракт	10	1540	15,4	3
	CaCO3	3,2	4	0,01	1
	(NH4)2SO4	2	32	0,064	1
	Ca3(PO4)2	1	50	0,05	2
Загальна вартість 17 грн					
C. beijerinckii NCP P260	Меляса	60	32		1
	Дріжджовий екстракт	10	1540		3
	CaCO3	3,2	4		1
	(NH4)2SO4	2	32		1
	Ca3(PO4)2	1	50		2
Загальна вартість 17 грн					

Примітка. * – Ціни наведено станом на лютий 2024 р. 1 - http://prom.ua,, 2 - ukrhim.com.ua 3 – www.shop-hlr.ua; 4 - profiprot.com.ua

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г ацетону, синтезованого на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	**Концентрація ацетону г/л**	**Тривалість культиву-вання, год**	**Кількість синтезованого ацетону г/год**	**Вартість 1 л середовища, грн/л**	**Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г**
1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***
Clostridium acetobutylicum ATCC 824	8,56	65	0,13	3,89	0,45
Clostridium acetobutylicum 260	7,5	65	0,12	5,61	0,75
C. butylicum NRRL 592	6,5	60	0,108	5,61	0,86
C. saccharobutylicum (BAS/B3/SW/336(S)	6	48	0,125	17	2,8
C. beijerinckii NCP P260	7,6	48	0,158	17	2,24

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 - продуцента ацетону

Тривалість культивування 65 год, концентрація ацетону в культуральній рідині становить 8,56 г/л, а концентрація біомаси – невідома.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу ацетону. Як джерело вуглецю для одержання ацетону використовується гідролізоване кукурудзяне борошно та ацетат, вміст вуглеводів в 150 грамах кукурудзяного борошна дорівнює 115,2 г (76,8 · 150/1000) [20]. Ацетат використовується у якості попередника біосинтезу продуктів АБЕ [17], масова частка карбону в ацетаті складає 40%, відповідно у 8 грамах ацетату 3,2 грам карбону. Оскільки біосинтез ацетону відбувається в рамках бродіння АБЕ (ацетон-бутил-етилового), то під час ферментації *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 окрім ацетону також в надлишку буде синтезуватися бутанол та етанол, які також мають бути враховані у розрахунку складу поживного середовища. Згідно літературного джерела [17] на цьому ростовому субстраті загальна сума синтезованого ацетону, бутанолу та

етанолу сягає 25,70 грамів, з яких бутанолу 14,23 г, ацетону 8,56 г та етанолу 2,91 г. Розраховуючи молярні маси цих сполук: ацетон = 58 г/М, масова частка карбону 62%, бутанол = 72 г/М з масовою часткою карбону 65%, етанол = 46 г/М, з масовою часткою карбону 52%. Фінальна концентрація ацетону в культуральній рідині дорівнює 8,56 г/л, масова частка карбону становить 5,3 г/л (8,56 · 0,62 = 5,3), фінальна концентрація бутанолу в культуральній рідині становить 14,23 г/л, масова частка карбону дорівнює 9,25 г/л (14,23 · 0,65 = 9,25); фінальна концентрація етанолу в культуральній рідині становить 2,91 г/л, масова частка карбону становить 1,5 г/л (2,91 · 0,52 = 1,5). Сумуючи масові частки карбону в продуктах АБЕ ферментації отримуємо 16,05 г/л карбону (5,3 + 9,25 + 1,5 = 16,05). Підсумовуючи розрахунки вмісту карбону в продукті ферментації, можна зробити висновок, що на синтез ацетону, бутанолу та етанолу сумарно витрачається 16,05 г/л карбону 3,2 грам з яких припадає на внесений ацетат. Тобто на біосинтез АБЕ витрачається 16,05 грамів карбону з вуглеводного субстрату (16,05 - 3,2 = 12,85) або 32,13 грамів вуглеводів з субстрату (12,85/40 · 100), оскільки масова частка карбону в вуглеводах складає 40% (72/180 · 100).

Потреби для синтезу біомаси

Оскільки 32,13 грамів вуглеводів витрачається на синтез АБЕ, то для синтезу біомаси залишається 83,07 грамів вуглеводів в поживному середовищі (115,2 - 32,13 = 83,07). В літературному джерелі не вказана концентрація біомаси, то необхідно розрахувати максимально допустиму теоретичну концентрацію біомаси в середовищі, задля контролю метаболізму ростового субстрату.

Відомо, що суха бактеріальна біомаса на 50% складається з карбону, тому нам необхідно дізнатися кількість вуглецю, що знаходиться в 83,07 грамах вуглеводів. Оскільки для культивування *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 використовується попередньо гідралізоване кукурудзяне борошно, то в якості вуглецевого субстрату виступає глюкоза та декстрини, в яких масова частка карбону 40%. Виходячи з розрахунку (83,07/100 · 40 = 33,23) отримуємо 33,23 г/л карбону. Варто враховувати, що приблизно 40% карбону середовища, йде на холосте окиснення під час метаболізму, то для синтезу компонентів клітини залишається (33,23 · 0,6 = 19,94)

19,94 грамів карбону, оскільки біомаса на 50% складається з карбону, (19,94/50 · 100 = 39,88), то теоретична загальна біомаса по джерелу вуглецевого живлення складає 39,88 грам біомаси на літр.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Джерелом азоту в поживному середовищі для культивування *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 виступає білок, що знаходиться в гідралізованому кукурудзяному борошні в концентрації 6,93 г на 100 г продукту. Оскільки кукурудзяне борошно знаходиться в поживному середовищі в концентрації 150 грам на літр, то загальна концентрація білку дорівнює 10,4 грами на літр (6,93/100 · 150). Відомо що в масова частка азоту в білках складає приблизно 15%, то в 10,4 грамах білку, знаходиться 1,56 грам азоту (10,4 · 0,15 = 1,56).

Відомо що бактеріальна клітина складається з азоту на 10%, тобто теоретичний максимальний синтез біомаси по азотному джерелу живлення становить 15,6 грам біомаси на літр (1,56 · 10 = 15,6).

Розрахунок вмісту в середовищі джерела фосфорного живлення

Джерелом азоту в поживному середовищі для культивування *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 виступає органічний фосфор, що знаходиться в гідралізованому кукурудзяному борошні в концентрації 272 мг на 100 грам продукту, Оскільки кукурудзяне борошно знаходиться в поживному середовищі в концентрації 150 грам на літр, то загальна концентрація фосфору дорівнює 408 мг, або 0,4 г (272/100 · 150 = 408).

Оскільки відомо, що бактеріальна клітина складається з 3% фосфору, тому максимальний теоретичний вихід біомаси по джерелу фосфорного живлення, становить 13,3 грами на літр (0,4/3 · 100 = 13,3).

2.2.1 Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування *Saccharomyces cerevisie* - допоміжного біологічного агента

Склад поживного середовища для культивування дріжджів: глюкоза 20, дріжджовий екстракт 8,5, $(NH_4)_2SO_4$ 1,3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 та $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,06.

Джерело карбону в поживному середовищі виступає глюкоза. Відомо, що суха бактеріальна біомаса на 50% складається з карбону, тому нам необхідно дізнатися

кількість вуглецю, що знаходиться в 20 грамах глюкози. Оскільки для культивування *Saccharomyces cerevisie* масова частка карбону в якій. Виходячи з розрахунку (20/100 · 40 = 8) отримуємо 8 г/л карбону. Варто враховувати, що приблизно 40% карбону середовища, йде на холосте окиснення під час метаболізму, то для синтезу компонентів клітини залишається (8 · 0,6 = 4,8) 4,8 грамів карбону, оскільки біомаса на 50% складається з карбону, (4,8/50 · 100 = 9,6), то теоретична загальна біомаса по джерелу вуглецевого живлення складає 9,6 грам біомаси на літр, тепер необхідно дізнатися кількість підживлюючого розчину глюкози, щоб отримати 20 г біомаси на літр, використовуючи пропорцію (20 · 20/9,6 = 41,7) дізнаємося, що щоб отримати 20 г біомаси необхідно використати 41,7 г глюкози.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Джерелом азоту в поживному середовищі для культивування *Saccharomyces cerevisie* виступає білок, що знаходиться в дріжджовому екстракті та $(NH_4)_2SO_4$. Дріжджовий екстракт на 60% складається із білків, а концентрація азоту в білка в середньому складає 14%, таким чином в 8,5 г дріжджового екстракту міститься щонайменше 0,714 г азоту. Другим джерелом азоту в середовищі $(NH_4)_2SO_4$ в концентрації 1,3 г. В 1,3 г $(NH_4)_2SO_4$ знаходиться 0,2756 г азоту (0,2120 · 1,3 = 0,2756). Разом ці 2 джерела азоту дають (0,714 + 0,2756 = 0,9896) 0,9896 г азоту.

Відомо що бактеріальна клітина складається з азоту на 10%, тобто теоретичний максимальний синтез біомаси по азотному джерелу живлення становить 9,896 грам біомаси на літр (0,9896 · 10 = 9,896).

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Морфолого-культуральні ознаки:

Clostridium acetobutylicum прямі палички, 0,5-0,9 х 1,6-6,4 мкм, рухливі перитрихальними джгутиками. Часто присутня гранулоза (крохмалевий полімер). Спори овальні, субтермінальні, злегка здувають клітину[22].

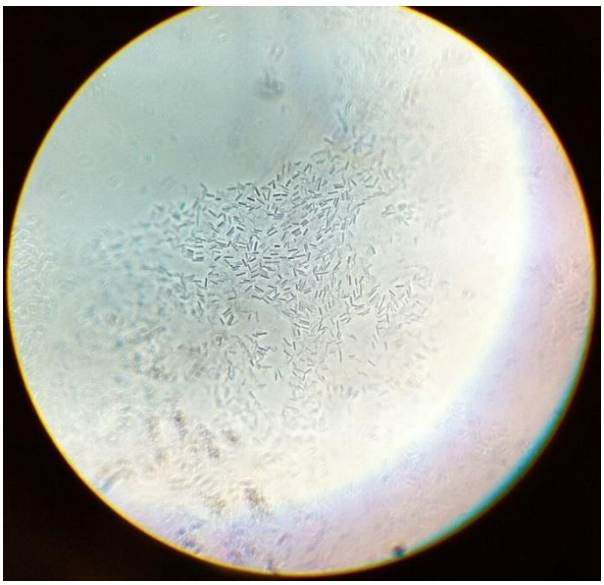


Рис 2.1 Clostridium acetobutylicum [23]

Колонії на кров'яному агарі негемолітичні, 1-5 мм в діаметрі, плоскі до піднятих, зернисті, сірувато-біла, глянцева поверхня, від напівпрозорої до напівнепроникної з нерівними краями та рідко з мозаїчною внутрішньою структурою. Росте в бульйонному середовищі (поживний бульйон) із додаванням зброджуваних вуглеводів.

Для інкубації потрібні зброджувані вуглеводи, біотин і п-амінобензойна кислота [22].

Фізіолого-біохімічні ознаки:

C. acetobutylicum є облігатним анаеробом. За типом живлення – хемоорганогетеротроф [24].

Позитивні результати для виробництва ацетилметилкарбінолу, DN-ази, розрідження желатину, гідролізу крохмалю.

Негативні результати для каталази, відновлення нітратів, виробництва індолу, лецитинази, ліпази, уреази .

Різні результати для гідролізу казеїну, виробництва H_2S.

Оптимальна температура росту складає 37˚C, а значення pH 4,5-5. Отже, по відношенню за температурою *C. acetobutylicum* є мезофілом, за pH – ацидофілом [22].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Філогенетичну класифікацію для *C. acetobutylicum* наведено відповідно до інтегрованої системи таксономічної інформації [25].

Домен – *Bacteria*

Тип – *Firmicutes*

Клас – *Clostridia*

Порядок – *Clostridiales*

Родина –*Clostridiaceae*

Рід – *Clostridium*

Вид – *Clostridium acetobutylicum*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Ацетон використовується в різних галузях промисловості: фармацевтичній, харчовій, текстильній та лакофарбовій [26]. Найширше використання ацетон знаходить, як додатковий розчинник у лакафарбовій промисловості [27].

У даній курсовій роботі я планую розробляти курсовий проект з використанням ацетону для виготовлення лакофарбової продукції. Актуальність теми зумовлена повномасштабним вторгненням до України. На жаль, відбудова нашої славної країни неминуча. Тому вироблення фарби буде в рази більша за довоєнні роки. За даними Державної служби статистики України у 2022 році було виготовлено фарб та 40,5 тис. тонн [28].

Виготовленням фарб у нашій державі займаються більше 20 компаній. Одними з найпопулярніших Підприємств є виробник ТМ Зебра – ТОВ ПП “ЗІП”, що було створене в кінці ХХ віку з ціллю та девізом “Гідне робити доступним”. На ринку України дана компанія успішно реалізує різні типи фарб більше 20 років [29].

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Враховуючи статистику за 2022 рік загальна кількість виробленої фарби становила 40 500 тонн [28]. Зважаючи на розробку нової технології, що передбачає отримання ацетону для додавання компоненту лакофарбових покриттів пропонується забезпечити 1% всього ринку.

$G_ф$= 40 500 · 0,01= 405 тонн

Кількість ацетону, яка використовується у виготовленні фарб становить 2 % від усіх компонентів [29]. Тому кількість ацетону для виготовлення 405 т фарб становитиме 8,1 т (405 · 2/100=8,1 т).

Обраний біологічний агент *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 синтезує ацетон у кількості 8,56 г/л (кг/м^3) [19]. Об’єм культуральної рідини, необхідної для отримання 8,1 т ацетону, становить:

8,56 кг – 1 м^3

8100 кг – Х

$$Х = \frac{8100}{8,56} = 946,26 \text{ м}^3$$

Враховуючи втрати цільового продукту при виділенні (близько 20%), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$V_{КР} = 946,26 \cdot 1,2 = 1135,51$ м^3.

3.3. Розрахунок геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення річної потреби у ацетоні (згідно п.3.2) потрібно отримати (з урахуванням втрат під час виділення) 1135,51 м^3 культуральної рідини.

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість трудоднів – 330, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$V_д = V_{гп} / T_{тр} = 1135,51 / 330 = 3,44$ м^3

Кількість продукту за цикл буде становити:

$V_{цк} = (К_1 \cdot V_д \cdot T_{цф})/24 = (1,4 \cdot 3,44 \cdot 75)/24 = 15,05$ м^3 /цикл,

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (65 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год). $К_1$ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($К_1 = 1,1 – 1,5$).

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

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

$V_г = V_{цк} / К_з = 15,05/0,8 = 18,81$ м^3 .

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер $V_ф = 20$ м^3 .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$К_з$ = 15,05/20 = 0,75 – не перевищує заданого значення

3.3.1 Розрахунок геометричного об'єму ферментера для культивування *S. cerevisiae*

Для забезпечення синтезу ацетону (згідно п.3.2) потрібно на стадії виробничого культивування проводити ко-культивування *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 та *Saccharomyces cerevisiae*

Розрахуємо, скільки культуральної рідини *Saccharomyces cerevisiae* потрібно отримати стільки культуральной рідини, щоб фінальна концентрація біомаси дріжджів для виробничого культивування була 0,2 г сухої біомаси на літр культуральної рідини. Як відомо з розділу 3.3 за один цикл культивування отримується 16,5 $м^3$, для такої кількості культуральної рідини необхідно синтезувати:

0.2 · 16500 = 3300 г дріжджів *S. cerevisie*

Як відомо зі статті [19], на запропонованому поживному середовищі концентрація біомаси дріжджів сягає 20 г сухої біомаси на літр. Необхідно розрахувати в скількох літрах культуральної рідини знаходиться 3300 г дріжджів:

3300 / 20= 165 л культуральної рідини дріжджової культури

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

$V_г = V_{цк} / К_з$ = 165/0,65 = 0,254 $м^3$.

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер $V_ф$ = 0,3 $м^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$К_з$ = 165/300 = 0,55 – не перевищує заданого значення

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу ацетону

За один виробничий цикл отримують 15 $м^3$ культуральної рідини (див. п.3.3). При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($Е_ф$), які становлять від 10 - 15%.

Отже, з урахуванням покриття 10% втрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити:

$V_{роб.1} = V_{кр} \cdot (1+E_ф) = 15{,}05 \cdot 1{,}1 = 16{,}5$ м^3 ,

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

Отже, робочий об'єм ферментера дорівнює 16,5 м^3. За вибраного коефіцієнта заповнення 0,8 геометричний об'єм ферментера становить: $V_ф = 16{,}5/0{,}8 = 20{,}6$ м^3. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{ст1} = 20$ м^3.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $Кз_1 = 16{,}5/20 = 0{,}825$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для анаеробних процесів (0,7-0,85), отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

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

Для засіву $V_{роб.1} = 16{,}5$ м^3 середовища необхідно приготувати

$V_{пм1} = V_{роб.1} \cdot X_ф = 16{,}5 \cdot 0{,}1 = 1{,}65$ м^3 посівного матеріалу,

де Хф = 0,1 – доза посівного матеріалу для ферментера.

Тоді об'єм поживного середовища в ферментері буде становити:

$V_{пс1} = V_{роб.1} - V_{пм1} = 16{,}5 - 1{,}65 = 14{,}85$ м^3 ≈ 14,9 м^3. Врахуємо, що під час одержання 1,65 м^3 інокуляту в посівному апараті 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. З урахуванням цього об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$V_{роб.2} = V_{пм1} \cdot (1+E_ф) = 1{,}65 \cdot 1{,}1 \approx 1{,}82$ м^3. Об'єм інокуляту 1,82 м^3 за коефіцієнта заповнення 0,8 можна отримати в посівному апараті об'ємом:

$V_{па2} = 1{,}82/0{,}8 = 2{,}28$ м^3. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{ст2} = 2{,}5$ м^3. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$К_{з2} = 1{,}82/2{,}5 = 0{,}728$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для анаеробних процесів (0,7-0,85), отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно. Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для засіву $V_{роб.2} = 1{,}82$ м^3 необхідно приготувати

$V_{пм2} = V_{роб.2} \cdot X_ф = 1{,}82 \cdot 0{,}1 = 0{,}182$ м^3 ≈ 0,18 м^3 посівного матеріалу,

де $X_ф = 0{,}1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити: $V_{пс2} = V_{роб.2} - V_{пм2} = 1{,}82 – 0{,}18 = 1{,}64$ м^3

Врахуємо, що під час одержання 0,18 м^3 (180 л) посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$V_{роб.3} = V_{пм2} \cdot (1+E_ф) = 0{,}18 \cdot 1{,}1 \approx 0{,}2$ м^3

Об'єм інокуляту 0,2 м^3 за коефіцієнта заповнення 0,8 можна отримати в посівному апараті об'ємом:

$V_{па2} = 0{,}2/0{,}8 = 0{,}25$ м^3 = 250 л. Цей об'єм є стандартним, отже обираємо апарат $V_{ст3}$ = 250 л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $К_{з.3}$ = 200/250 = 0,8 Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву поживного середовища об'ємом 200 л необхідно:

$V_{пм3} = V_{роб.3} \cdot X_ф = 200 \cdot 0{,}1 = 20$ л посівного матеріалу,

де $X_ф = 0{,}1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити: $V_{пс3} = V_{роб.3} - V_{пм3} = 200 – 20 = 180$ л

Врахуємо, що під час одержання 20 л посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме:

$V_{роб.4} = V_{пм3} \cdot (1+E_ф) = 20 \cdot 1{,}1 = 22$ л

Об'єм інокуляту 22 л за коефіцієнта заповнення 0,8 можна отримати в інокуляторі об'ємом: $V_{ін4}$ = 22/0,8 = 27,5 л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{ст4}$ = 30 л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $К_{з.4}$ = 22/30 =

0,73. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об’єм інокулятора обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об’єму поживного середовища. Для засіву інокулятора необхідно підготувати

$V_{пм4} = V_{роб.4} \cdot X_ф = 22 \cdot 0,1 = 2,2$ л.

де $X_ф = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Тоді об’єм поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$V_{пс4} = V_{роб.4} - V_{пм4} = 22 – 2,2 = 19,8$ л

Врахуємо, що під час одержання 2,2 л посівного матеріалу в інокуляторі

10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об’єм поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме:

$V_{роб.5} = V_{пм4} \cdot (1+E_ф) = 2,2 \cdot 1,1 = 2,42$ л

Об’єм інокуляту 2,42 л за коефіцієнта заповнення 0,8 можна отримати в інокуляторі об’ємом: $V_{ін5} = 2,42/0,8 = 3,025$ л. Приймаємо найближчий за об’ємом стандартний інокулятор $V_{ст5} = 3$ л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $К_{з.5} = 2,42/3 = 0,81$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об’єм інокулятора обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об’єму поживного середовища. Для засіву інокулятора необхідно підготувати

$V_{пм5} = V_{роб.5} \cdot X_ф = 2,42 \cdot 0,1 = 0,242$ л.

де $X_ф = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Тоді об’єм поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$V_{пс5} = V_{роб.5} - V_{пм5} = 2,42 – 0,242 = 2,178$ л

Одержання посівного матеріалу $V_{пм5} = 0,242$ л (242 мл) для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об’ємом $V_{колб} = 750$ мл з коефіцієнтом заповнення $К_{зк} = 0,15$. Тоді кількість колб становить: $N_{колб} = V_{пм5}/(V_{колб} \cdot К_{зк}) = 242/(750 \cdot 0,15) = 2,15 \approx 2$ колби

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу ацетону *Clostridium acetobutylicum* необхідно встановити ферментер для біосинтезу об'ємом 20 $м^3$, інокулятор об'ємом 2,5 $м^3$, інокулятори по 250л, 30 л, 3 л та 2 качалочні колби.

3.4.1 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для дріжджової культури.

Врахуємо, що під час одержання 0,165 $м^3$ (165 л) дріжджової культури в ферментері 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$V_{роб.3} = V_{пм2} \cdot (1+E_ф) = 0,165 \cdot 1,1 \approx 0.182$ $м^3$

Об'єм КР дріжджів 0,182 $м^3$ за коефіцієнта заповнення 0,55 можна отримати в посівному апараті об'ємом:

$V_{па2} = 0,182/0,60 = 0,303$ $м^3$ = 303 л. Обираємо апарат $V_{ст3}$ = 300 л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $К_{з.3} = 182/300 = 0,6$ Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву поживного середовища об'ємом 182 л необхідно:

$V_{пм3} = V_{роб.3} \cdot X_ф = 182 \cdot 0,1 = 18,2$ л посівного матеріалу,

де $X_ф = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити: $V_{пс3} = V_{роб.3} - V_{пм3} = 182 – 18,2 = 163,8$ л

Врахуємо, що під час одержання 18,2 л посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме: $V_{роб.4} = V_{пм3} \cdot (1+E_ф) = 18,2 \cdot 1,1 = 20,02$ л

Об'єм інокуляту 20,02 л за коефіцієнта заповнення 0,6 можна отримати в інокуляторі об'ємом: $V_{ін4} = 20,02/0,6 = 33,37$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{ст4}$ = 30 л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $К_{з.4} = 20,02/30$

= 0,66. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм інокулятора обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву інокулятора необхідно підготувати: $V_{пм4} = V_{роб.4} \cdot X_ф = 20,02 \cdot 0,1 = 2$ л.

де $X_ф = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Тоді об'єм поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$V_{пс4} = V_{роб.4} - V_{пм4} = 20,02 – 2 = 18,02$ л

Одержання посівного матеріалу $V_{пм5}$ = 2 л (2000 мл) для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб}$ = 750 мл з коефіцієнтом заповнення $К_{зк}$ = 0,15. Тоді кількість колб становить: $N_{колб} = V_{пм5}/(V_{колб} \cdot К_{зк}) = 2000/(750 \cdot 0,15) = 17,7 \approx 18$ колб

Таблиця 3.1

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та 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, $К_{зап}$, частка	Геометричний об'єм ферментера, $V_{ст}$, м^3 (л)
VI	15	16,5	1,65	14,85 ≈ 14,9	0,8	20
V	1,65	1,82	0,182 ≈ 0,18	1,64	0,8	2,5
IV	0,18 (180)	0,2 (200)	20 л	0,18 (180)	0,8	250 л
III	20 л	22 л	2,2 л	19,8 л	0,8	30 л
II	2,2 л	2,42 л	0,242л	2,178 л	0,8	3л
I	242 мл	242 мл	-	242 мл	0,15	2 колби

Таблиця 3.2

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки дріжджової культури для 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, $К_{зап}$, частка	Геометричний об'єм ферментера, $V_{ст}$, м^3 (л)
III	165 л	182 л	18,2 л	163,8 л	0,6	300 л
II	18,2 л	20,02 л	2 л	18,02 л	0,66	30 л
I	2 л	2 л	-	2 л	0,15	18 колб

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шлях катаболізму гідролізованого кукурудзяного борошна у *Clostridium acetobutylicum* АТСС 824

Бактерії роду *Clostridium* реалізують виключно бродильний тип метаболізму, у них відсутній дихальний ланцюг.

Джерелом вуглецю для культивування ацетону бактеріями *Clostridium acetobutylicum* АТСС 824 виступає глюкоза, що знаходиться в гідролізованому кукурудзяному борошні. Склад кукурудзяного борошна на 100 г продукту: жири – 1,3 г, насичені жирні кислоти – 0,20 г, білки – 6,10 г; вуглеводи – 80,4 г; цукор – 0,5 г, сіль – 0,001 г, вітаміни: B1, B3, Залізо, Магній, Фосфор, Калій, Цинк [30]. Кукурудзяне борошно було піддане дії ферментів α-амілази та глюкоамілази, то в поживному середовищі переважно знаходиться невелика частка низько-молекулярних декстринів, як результат дії α-амілази та переважна частина глюкози, як наслідок дії високих концентрації глюкоамілази [31]. Оскільки у складі переважна більшість вуглеводів, то вважаємо, що джерелом вуглецю є глюкоза. Катаболізм глюкози відбувається гліколітичним шляхом (Фруктозо-1,6-дифосфатний шлях)[32].

Утворення 2-фосфо-D-гліцерату відбувається під дією відразу двох ферментів: 2,3-бісфосфогліцератзалежної фосфогліцератмутази та 2,3-бісфосфогліцератнезалежної фосфогліцератмутази.

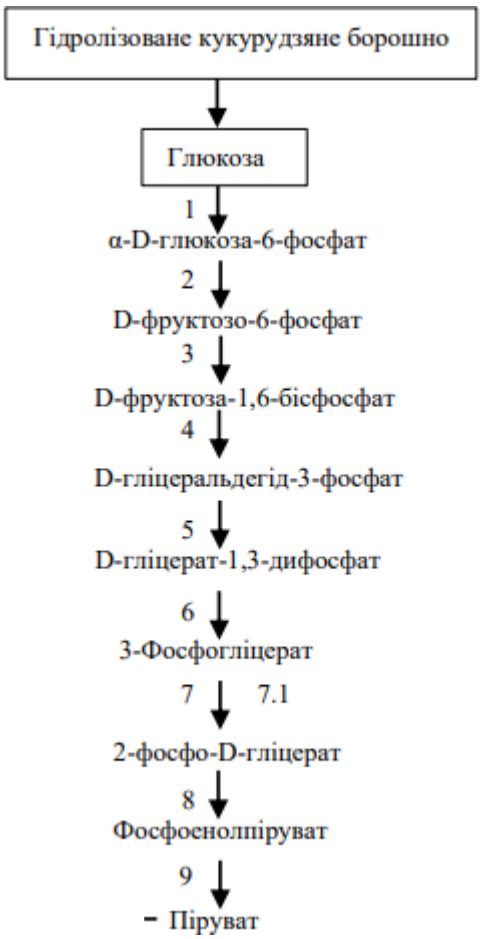


Рис. 4.1. Схема метаболізму глюкози *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824

Ферменти : 1 − D-глюкозофосфотрансфераза (КФ 2.7.1.199); 2 − глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 − 6-фосфофруктокіназа-1 (КФ 2.7.1.11); 4 − фруктозо-бісфосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 5 – гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 6 − фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 7 − 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 7.1 – 2,3-бісфосфогліцератнезалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 8 – фосфопіруватгідратаза (КФ 4.2.1.11); 9 − піруваткіназа (КФ 2.7.1.40);

4.2. Біотрансформація гідролізованого кукурудзяного борошна у ацетон

У даному випадку цикл трикарбонових кислот забезпечує біосинтетичні потреби. Після утворення Сукциніл-КоА відсутні ферменти, що забезпечують утворення сукцинату і фумарату. Але є фумаратгідратаза, що забезпечує утворення малату [33]. Утворення фумарату відбувається в результаті реакцій біосинтезу аргініну. Під час метаболізму аланіну, аспартату та глутамату утворюється аспартат, який необхідний для біосинтезу амінокислот аспартпатної родини. Далі відбувається

перетворення аспартату до L-аргініносукцинату під дією аргініносукцинатсинтази. Потім відбувається перетворення L-аргініносукцинату до фумарату під дією аргініносукцинатліази [34]. Перетворення піровату до оксалоацетату відбувається в анаплеротичній реакції за участю піруваткарбоксилази.

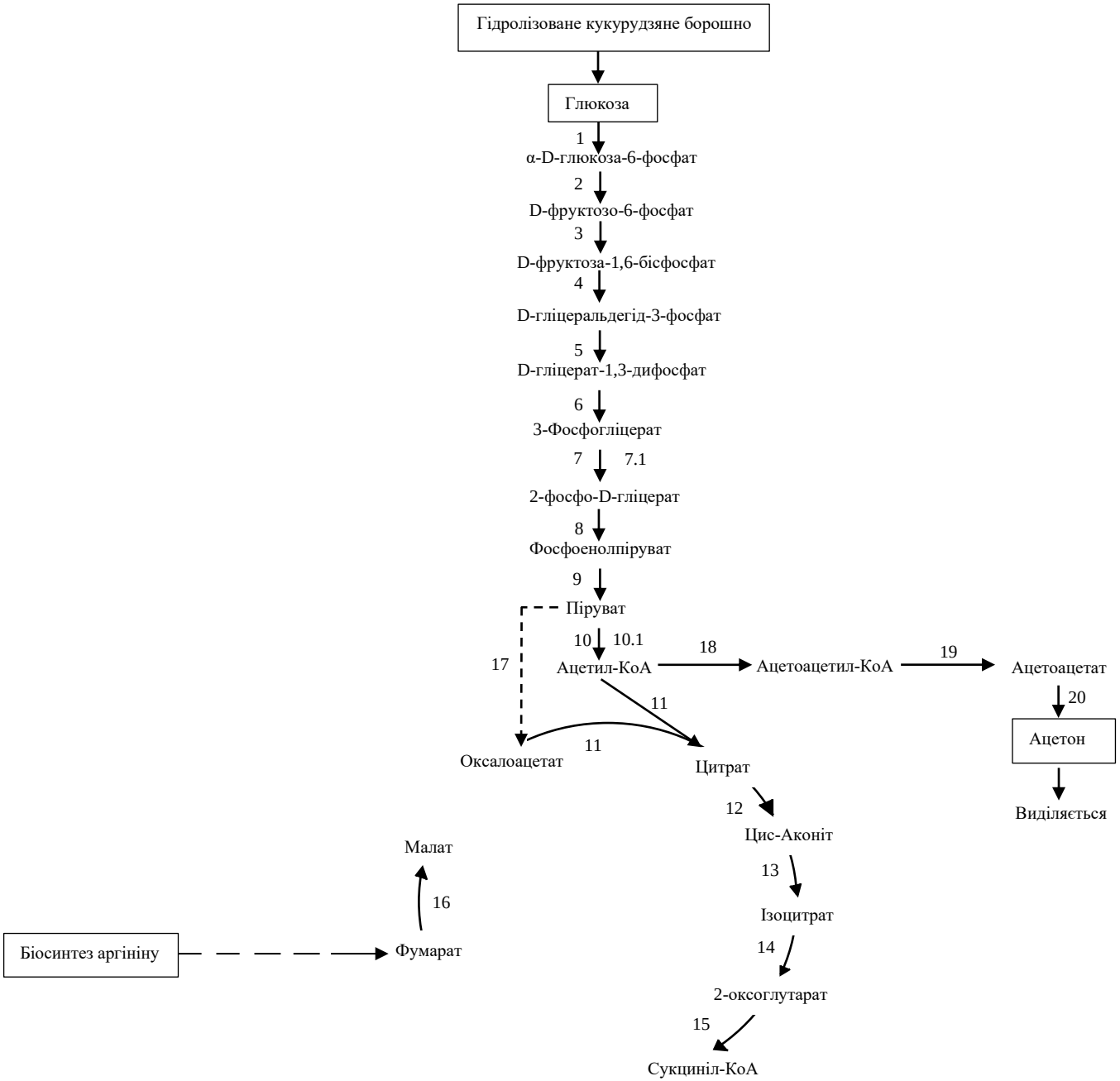
Відповідно до Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes з Ацетил-КоА під дією ацетил-КоА ацетилтрансферази утворюється Ацетоацетил-Коа, який у свою чергу під дією ацетат-КоА-трансферази утворює Ацетоацетат. Перетворення Ацетоацетату до ацетону відбувається за участі ацетоацетатдекарбоксилази [35].

Нижче наведено ферменти 1-20, які беруть участь у біосинтезі ацетону (див. рисунок 4.2):

1 − D-глюкозофосфотрансфераза (КФ 2.7.1.199); 2 − глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 − 6-фосфофруктокіназа-1 (КФ 2.7.1.11); 4 − Фруктозо-бісфосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 5 – гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 6 − фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 7 − 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 7.1 – 2,3-бісфосфогліцератнезалежна фосфогліцератмутаза; 8 – фосфопіруватгідратаза (КФ 4.2.1.11); 9 − піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 10 – піруват:ферредоксиноксидоредуктаза (КФ 1.2.7.1);

10.1 – 2-оксоглутарат (КФ 1.2.7.11); 11 – ізопропілмалатсинтаза (КФ 2.3.3.3); 12 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 13 − аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 14 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.41); 15 – 2-оксокислота оксидоредуктаза (КФ 1.2.7.11); 16 – фумаратгідратаза (КФ 4.2.1.2); 17 – піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1); 18 − ацетил-КоА ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.9); 19 – ацетат-КоА-трансфераза (КФ 2.8.3.8); 20 – ацетоацетатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.4);

Рис. 4.2. Шлях катаболізму гідролізованого кукурудзяного борошна у *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824



РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обгрунтування способу культивування і типу ферментера

Clostridium acetobutylicum ATCC 824 являється анаеробною, грампозитивною бактерією роду *Clostridium,* по відношенню до температури є мезофілом, оптимальна температура культивування становить 37℃ ± 0,5, найбільша ферментативна активність проявляється у кислому pH середовища, від 4 до 5,5.

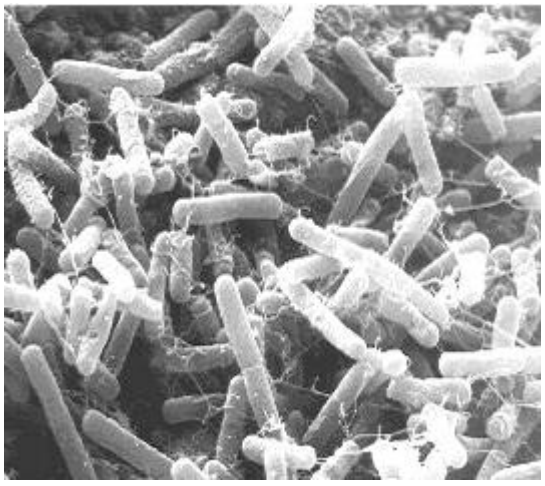


Рис 5.1. Clostridium acetobutylicum [36]

Такі умови культивування є характерними для багатьох видів анаеробних мікроорганізму, тому процес культивування має бути асептичним, оскільки контамінація сторонньою мікрофлорою, призведе до конкуренції за ростовий субстрат та інші поживні елементи, що знизить показники виходу цільового продукту.

Виробничий біосинтез має бути реалізований в строго анаеробних умовах, оскільки *C. acetobutylicum* ATCC 824 є облігантним анаеробом і не переносить навіть відносно низькі концентрації кисню.

Умови промислового культивування *C. acetobutylicum* ATCC 824: температура 37℃ ± 0,5, рівень pH в діапазоні 4,5-5,5 (не нижче 4), безкиснева атмосфера складається з чистого азоту.

Реалізація виробничого культивування має відбуватися з підживленням,

тобто поступовим додаванням певних концентрації ростового субстрату в поживне середовище. Оскільки згідно літературного джерела загальна концентрація ростового субстрату у середовищі має становити 150 г/л. Якщо внести таку велику концентрацію ростового субстрату одразу, то це може викликати катаболічну репресію, що призведе до значного сповільнення росту культури в середовищі.

Виробниче культивування *C. acetobutylicum* ATCC 824 має проводитися глибинним методом, оскільки твердофазне культивування має ряд недоліків, а саме: важка і дорога методика дотримання анаеробних умов, потенційно дорожчий синтетичний або напівсинтетичний субстрат. Також ваговим фактором є повна відсутність даних о реалізації цього методу в літературних джерелах, що говорить про його теоретичну недоцільність.

Промислове культивування *C. acetobutylicum* ATCC 824 має проводитися періодичним методом або безперервним методом [37]. Безперервний варіант культивування є більш зручним та потенційно економічно вигіднішим через спрощення технологічних процесів, але згідно літературних джерел [38] максимальне підвищення концентрації ацетону в середовищі спостерігається в пізню експоненційну - ранню стаціонарну фазу росту, тому безперервне культивування є менш продуктивним з розрахунку граму продукції на літр середовища. Виходячи з вище проаналізованої інформації мною було обрано періодичний метод культивування.

Для того щоб обрати необхідний ферментер для культивування *C. acetobutylicum* ATCC 824 варто враховувати певний ряд факторів затверджених в підрозділі 5.1, а саме: анаеробне, періодичне, глибинне культивування за стабільних умов середовища з можливістю внесення додаткових субстратів під час процесу культивування.

Контроль стабільності фізико-хімічних умов культивування є одним з ключових факторів швидкого розвитку культури, тому ферментер має бути обладнаним вбудованими датчиками pH, термометрами та аналізаторами рівня розчиненого кисню, задля комплексного сканування фізико-хімічних умов у всьому об’ємі культуральної рідини.

Оскільки має бути реалізоване асептичне анаеробне культивування, то ферментер має бути повністю герметичним та з можливістю проведення стерилізації.

Штам бактерій *C. acetobutylicum* ATCC 824 під час свого розвитку продукують CO_2, що може згубно впливати на хід та ефективність ферментації, тому ферментер повинен мати систему газообміну, завдяки якій в ферментер постійно подається атмосфера азоту та відводиться відпрацьований азот та вуглекислий газ.

Виходячи з потреб анаеробного процесу, стерилізації, контролю газообміну на ферментері має бути встановлений манометр задля постійного контролю тиску.

Також для активного масообміну нам необхідний перемішуючий пристрій, оскільки ми не маємо спеціальних потреб до нього, то рекомендується використовувати лопатеву багатоярусну мішалку зі швидкістю обертань 100 об/хв.

Оскільки в якості ростового субстрату використовується кукурудзяне борошно, що є складною сумішшю вуглеводів, білків та інших органічних речовин, активне піноутворення під час ферментації неминуче, тому під час ферментації варто використовувати піногасники механічного типу, тому ферментер має бути оснащений гребінкою для: кукурудзяної муки, ацетату, розчину лугу, розчину кислоти та піногаснику.

Виробниче культивування *C. acetobutylicum* ATCC 824 передбачає використання ферментера об’ємом 20 $м^3$ та коефіцієнтом заповнення 0,8, цей об’єм ферментера вважається великогабаритним, тому при виборі ферментера варто відразу орієнтуватися на індустріальні моделі. Китайська компанія «RUIAN GLOBAL MACHINERY CO., LTD.» виготовляє великогабаритні ферментери в яких передбачений широкий спектр аналітичних приладів.

Оскільки перед виробничим біосинтезом нам необхідно провести декілька стадій підготовки посівного матеріалу, то варто індивідуально спроектувати та замовити всю систему «Multi line fermentation tank», бо в рамках підготовки посівного матеріалу, нам знадобиться використовувати серію ферментерів схожої структури, але різного об’єму.

Ферментери компанії «RUIAN GLOBAL MACHINERY CO., LTD.» оснащуються: pH метром, барометром, тепловою сорочкою, аналізатором рівня

кисню та вуглекислого газу, мішалкою з діапазоном обертів 100-200 об/хв, режим стерилізації, та 8 відсіків для завантаження. Загалом всі характеристики відповідають заявленим нами потребам [39].

5.2. Обґрунтування стадії підготовки стерильного азоту для біосинтезу ацетону культурою бактерій *Clostridium acetobutylicum* АТСС 824

Clostridium acetobutylicum ATCC 824 – є облігантним анаеробом, що робить неможливим пряме використання очищеного аераційного повітря для культивування продуцента, оскільки *Clostridium acetobutylicum ATCC 824* немає спеціальних потреб для сумішей газів, то пропонується використовувати чисту азотну атмосферу замість суміші газів CO_2, O_2, H_2, оскільки це немає вплинути на кінцевий результат культивування, але встановлення додаткових апаратів несе за собою невиправдані витрати для організації та функціонування біотехнологічного процесу.

Для створення анаеробної атмосфери для культивування *Clostridium acetobutylicum ATCC 824* пропонується використовувати стиснений азот в балонах.

Для інокуляторів об'ємом 0,003, 0,03 м^3, 0,25 м^3, 2,5 м^3, та виробничого ферментера об'ємом 20 м^3, чиста атмосфера азоту буде створюватися наступним чином:

1) До комунікацій ресивера в які посередині вбудований фільтр грубої очистки підмикають газовий балон.

2) Азот проходячи фільтр грубої очистки де забирається до 90% всіх часточок розміром більше 1 мкм азот нагнітається в ресивер до позначки тиску 1 МПа, після чого комунікація ресивера відкривається на вихід.

3) Після ресивера азот проходячи головний фільтр HEPA H11, який затримує 99% всіх часточок 0,2 мкм попадає в загальні комунікації подачі азоту до якої приєднані всі інокулятори та ферментер.

4) Перш ніж попасти в апарат азот проходить індивідуальний фільтр який затримує до 99,9% часточок розміром 0,2 мкм.

5.2.1 Обґрунтування стадії підготовки стерильного аераційного повітря для створення біомаси культури дріжджів *S. cerevisiae*

S. cerevisie це факультативний анаероб, що здатний існувати як за анаеробних так і за аеробних умов, оскільки для ко-культивування C. *acetobutylicum ATCC 824* та *S. cerevisie* необхідна саме біомаса дріжджів, то культивування *S. cerevisie* має проводитися за аеробних умов, бо саме в присутності кисню, дріжджі здатні повністю окиснювати ростовий субстрат досягаючи максимальної швидкості накопичення біомаси.

Етапи підготовки аераційного повітря для створення посівного матеріалу в апаратах та виробничого культивування

1. Забір атмосферного повітря організовано через вертикальну магістраль, на вершині якої встановлено повітрозабірний ковпак. Щоб він знаходився на три метри вище найвищої частини будівлі (12 м + 3 м похилого даху), труба підіймається до 18 м від рівня землі.

2. Грубе очищення: частинки, більші за 50 мкм, затримуються плоскими тканинними касетами попередніх фільтрів.

3. Компресори стискають повітря, підвищуючи його температуру до 120 – 200 °C та забезпечують потік повітря до ресиверу.

4. Далі стиснене повітря спрямовується у водяний холодильник «труба-в-трубі», де його охолоджують до точки роси, аби волога конденсувалася.

5. У ресивері конденсат разом із мастильними залишками відділяється, а пульсації потоку згладжуються, що підвищує ефективність наступних стадій.

6. Для стабілізації параметрів повітря його підігрівають паровим теплообмінником до 45–50 °C, вирівнюючи тиск і температуру.

7. Основне очищення відбувається у ємнісних фільтрах із волокнистою насадкою (розміщених поруч із цехом ферментації), які забезпечують близько 95 % затримання домішок.

8. Фінальна стерильність досягається в окремих фільтрах, змонтованих безпосередньо на ферментері; вони забезпечують ступінь очищення 99,99 %.

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

5.3.1. Обгрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів для виробничої ділянки

Для підтримання належного санітарного стану внутрішньої частини обладнання необхідно застосовувати лужні миючі засоби для ефективної очистки від органічних забруднень, а також оскільки у випадку культивування, як і культури *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 так і *S. cerevisiae* необхідне строге підтримання асептичних умов, то використання дезінфікуючих засобів для обробки підлоги, стін, робочих поверхонь є необхідністю.

Після детального аналізу наявної продукції на ринку України промислових миючих засобів було прийнято рішення обрати наступні препарати:

Лужний миючий засіб Данаклін [40]

У рамках цієї проєктної роботи можуть бути залишки культуральної рідини та кукурудзяного борошна, тому лужні миючи засоби ефективно розчинюють широкий спектр органічних забруднень, тому він є ефективним для використання в автоматизованих системах CiP для чистки великогабаритного обладнання та ручної мийки обладнання.

Склад: 2-феноксіетанол −2,0% ± 0,05; катіонактивні ПАР, неіоногенні ПАР до 5,0%; халатний комплекс; антикорозійний комплекс; pH регулятор; вода демінералізована (очищена) до 90%.

Загальний опис:

Засіб мийний з антибактеріальною дією «ДАНАКЛІН» універсальний для миття і очистки поверхонь. Однорідна прозора рідина, від світло-жовтого до зеленого кольору, зі слабким запахом використаної сировини (за потреби, може додаватись віддушка). Робочі розчини мають гарні миючі, дезодоруючі, змочувальні властивості, усувають неприємні запахи, не пошкоджують вироби та поверхні з різних матеріалів. Видаляють механічні, білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів та інші забруднення. Не горючий, пожежо- та вибухобезпечний. Не містить окиснювачів, добре змішується з водою в будь-яких співвідношеннях. Призначений для одночасного миття і дезінфекції в закладах охорони здоров'я,

аптечних закладах, лабораторіях, навчальних закладах, на підприємствах харчової промисловості, в закладах громадського харчування, на транспорті та інших об'єктах.

Відомості про державну реєстрацію: Комісія з державної санітарно-епідеміологічної експертизи Інституту гігієни та екології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця від 21.08.2020 № 12.2-18-5/19548 до 06.10.2025

Безпека:

- За параметрами гострої токсичності належить до 4 класу мало небезпечних речовин.
- Пари засобу в концентрації насичення мало небезпечні (4 клас небезпеки) при інгаляційному надходженні.
- Робочі розчини не подразнюють шкіру, слизові верхніх дихальних шляхів, слабко подразнюють слизові оболонки очей.
- Не виявляє сенсибілізуючих, канцерогенних, мутагенних, ембріотоксичних, тератогенних, гонадотропних та інших віддалених властивостей.

Мийно-дезінфікуючий засіб «СУРФАНІОС ЛЕМОН ФРЕШ» [41]

Застосування дезінфікуючих засобів є необхідністю на виробничий ділянці мікробного синтезу, для того щоб дезактивувати залишкову кількість культуральної рідини, що могла залишатися на стінках тари або реакторів, а також для зменшення мікробіологічного навантаження на робочих поверхнях, підлозі, стінах та вікнах. Також дезінфікуючі засоби необхідні для фінальної очистки виробничого обладнання перед стерилізацією.

Склад препарату:

N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3-діамін – 5%;

N,N-дидецил-N,N-диметиламоній хлорид – 2,5%, дистильована вода- 92,5%.

Відомості про державну реєстрацію: "Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І.Медведя Міністерства охорони здоров'я України", висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 602-123-20-5 від 30.04.2020 р. до 15.07.2025

Опис мийно-дезінфікуючого засобу

Засіб СУРФАНІОС ЛЕМОН ФРЕШ UA – прозорий розчин блакитно-зеленого кольору з лимонним запахом, густина (20°С) – 1,02-1,05 г/см^3, показник заломлення (20°С) – 1,35-1,38, значення pH концентрату –11,6-13,0.

Даний дезінфікуючий засіб є водорозчинним, зі значення pH при концентрації 0.25% дорівнюючим 8.5. Робочий розчин засобу має як чистящі так і дезінфікуючи властивості, завдяки своїй лужні реакції він ефективно видаляє жирові забруднення та чинить дезінфікуючу дію на оброблювану поверхню, завдяки ефективним ПАР, має високу суфрактантну властивість при цьому не залишаючі розводів та зміни матеріальних властивостей поверхні, зокрема корозії. Через використання ароматизаторів робочі розчини не мають неприємного аромату, що спрощує щоденне використання засобу та не потребує додаткових провітрювань приміщення після обробки. Ароматизатор та допоміжні компоненти легко розчиняються у воді, що спрощує їх змивання особливо в умовах дезінфекційної обробки промислового обладнання. Робочими розчинами засобу можна обробляти широкий спектр робочих та промислових поверхонь, зокрема кераміки, скла та нержавіючої сталі.

Характеристика:

Агрегатний стан: рідина. Густина: ~ 1,025. pH (1% розчину): ~ 12

концентрацій робочого розчину (0,01 - 0,5 %).

Токсичність та безпечність засобу.

Засіб "СУРФАНІОС ЛЕМОН ФРЕШ UA" за критеріями гострої токсичності (згідно з ГОСТ 12.1.007-746) демонструє помірну небезпеку (3 клас) при потраплянні до шлунку та низьку небезпеку (4 клас) при контакті зі шкірою. Концентрована форма продукту здатна викликати подразнення шкіри та слизових оболонок очей, а при вдиханні може подразнювати дихальні шляхи.

Водночас, готові робочі розчини не проявляють місцевої подразнюючої дії при одноразовому контакті зі шкірою. Проте, при застосуванні методом зрошування з перевищенням рекомендованої витрати, вони можуть спричинити подразнення верхніх дихальних шляхів. Компоненти засобу не мають здатності викликати алергію, не всмоктуються в кров у значній кількості, не накопичуються в організмі та

не виявляють канцерогенних, мутагенних, тератогенних чи гонадотропних ефектів, а також не впливають негативно на репродуктивну функцію.

Опис мийно-дезінфікуючого засобу «Сурфахлор» [42]

Склад: "Сурфахлор" містить натрієву сіль дихлорізоціанурової кислоти (85,5%), адипінову кислоту (7,0%), бікарбонат натрію (5,5%) та карбонат натрію (2,0%).

Відомості про державну реєстрацію: Засіб "Сурфахлор" внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів у 2020 році під номером 929. Рішення про реєстрацію ґрунтується на висновку санітарно-епідеміологічної експертизи №12.2-18-5/18307 від 11.08.2020 року. Запис у реєстрі датовано 19.08.2020 року, а термін дії реєстрації – до 19.08.2025 року.

Загальний опис: "Сурфахлор" випускається у формі білих таблеток. Таблетки важать близько 3,2 г і швидко розчиняються у воді. Розчинення однієї таблетки у воді забезпечує виділення приблизно 1,6 г активного хлору. Водні розчини "Сурфахлору" прозорі, не мають кольору, мають слабкий запах хлору і pH від 6,0 до 7,0. За бажанням замовника, засіб може мати легкий аромат лимона або морського бризу. Розчини мають антикорозійні властивості, стабілізують воду, сприяють змочуванню поверхонь, усувають запахи, емульгують забруднення, мають мийні та відбілюючі властивості. Вони не пошкоджують вироби з металу, скла, гуми, полімерів, силікону, пластмас, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу, а також поверхні медичних приладів з різними видами покриттів. Розчини ефективно видаляють різні забруднення, включаючи механічні, білкові, жирові, кров та залишки ліків, і не фіксують органічні речовини на поверхнях. Засіб також полегшує видалення мокротиння та інших виділень. "Сурфахлор" є негорючим, вибухобезпечним і сумісний з різними миючими засобами та солями.

Безпека: Згідно з класифікацією за ГОСТ 12.1.007-76, "Сурфахлор" при потраплянні в шлунок відноситься до 3 класу помірно небезпечних речовин, а при вдиханні або контакті зі шкірою – до 4 класу мало небезпечних речовин. При використанні в рекомендованих концентраціях засіб не викликає подразнення шкіри, не має шкірно-резорбтивної та сенсибілізуючої дії, а також не виявляє мутагенних, ембріотоксичних, тератогенних і канцерогенних властивостей.

Дезінфікуючий засіб для рук SeptPower [46]

Склад: Спирт етиловий 75% вода підготовлена 25%

Відомості про державну реєстрацію: Комісія з державної санітарно-епідеміологічної експертизи Державної установи “Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва Національної академії медичних наук України” від 28.01.2021 №12.2-18-5/1103 до 03.03.2026

Загальний опис: "СептПавер" ("SeptPower") - це дезінфікуючий та антисептичний засіб, призначений для обробки рук, шкіри та різних поверхонь. Він застосовується в побуті, медичних закладах, ветеринарії, освітніх установах, спорті, закладах громадського харчування, торгівлі, дитячих закладах, промисловості, сфері послуг, на транспорті, в органах влади та установах виконання покарань. Продукт реалізується через роздрібні та оптові торгові точки, а також аптеки

Заходи безпеки: Не застосовувати на ранах, легкозаймиста речовина, подразнює слизові оболонки шкіри

Таблиця 5.1

Узагальнююча таблиця характеристики дезінфікувальних засобів

Назва засобу	Склад	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість	Джерело
Засоби для обробки внутрішньої поверхні обладнання								
«СУРФАНІОС ЛЕМОН ФРЕШ» (виробник Дезант)	N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3-діамін – 4,59-5,61%; N,N-дидецил-N,N-диметиламоній хлорид – 2,25-2,75%;	Бактерії, віруси, гриби, спори	Засіб добре змішується з водою, значення pH 0,25% робочого розчину засобу приблизно 8,5. Робочі розчини засобу мають досконалі миючі та дезодоруючі властивості, добре змочують поверхні, ефективно розчиняють та видаляють забруднення будь-якого походження (включаючи білкові, жирові, залишки крові, лікарських препаратів тощо) із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів та порожнин виробів медичного призначення (ВМП), не залишають нальоту на поверхні.	Робочі розчини не викликають корозії об'єктів, виготовлених із алюмінію, міді, латуні, нержавіючої сталі, не пошкоджують керамічні поверхні, вироби з граніту, нікелю, титану, тефлону, скла, дерева, поліаміду, поліетилену. Засіб не ушкоджує вироби та інструменти, які потребують обережного ставлення.	Застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації від 0,01% до 0,5%, залежно від сфери застосування, збудника і об'єктів обробки, виду забруднення. Норма витрати робочого розчину – 50 мл/м^2. Способи обробки: ручний, механізований	"Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І.Медведя Міністерства охорони здоров'я України", висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 602-123-20-5 від 30.04.2020 р.	1 л коштує 730 грн	[41]
«Сурфахло» (Виробник Бланідас)	натрієва сіль дихлорізоціанурової кислоти (85,5%), адипінова кислота (7,0%), бікарбонат натрію (5,5%) та карбонат натрію (2,0%).	Бактерії, віруси, гриби, спори	"Сурфахлор" випускається у формі білих таблеток або гранул. Таблетки важать близько 3,2 г і швидко розчиняються у воді. Розчинення однієї таблетки або 2,68 г гранул у воді забезпечує виділення приблизно 1,6 г активного хлору (близько 50%). Водні розчини "Сурфахлору" прозорі, не мають кольору, мають слабкий запах хлору і pH від 6,0 до 7,0.	Обробку обладнання здійснюють циркуляційною дезінфекцією, напиленням, розпиленням, заповненням, протиранням. Тривалість обробки залежить від температури та концентрації препарату. Сумісний з нержавіючою сталлю та керамікою	Робочі розчини препарату з концентрацією 0,05-2% готують розведенням таблетки питною водою безпосередньо перед використанням.	Державна установа "Інститут медицини праці ім. Ю.І.Кундієва НАМН України", висновок державної санітарно експертизи № 12.2-18-5/18307 від 11.08.2020 р.санітарно-епідеміологічної експертизи від 30.11.2020 №12.2-18-5/29847 Наказ від 19.09.2023 №1649 Дійсний до 19.09.2028	1 кг коштує 328 грн	[42]

Закінчення табл. 5.1

Економ DEZ	діюча речовина: 1,3-Дихлор-5,5-диметилгідантоїн ≥ 22,5 %)	Бактерії, віруси, гриби, спори	Сфера застосування: Гранули, розфасовані у пластикові банки. Зручний у застосуванні, зі слабким запахом хлору, добре розчиняється в воді, має відмінні мийні та відбілюючі властивості. Застосовується для знезараження медичних відходів,	Обробку обладнання здійснюють циркуляційною дезінфекцією, напиленням, розпиленням, заповненням, протиранням. Тривалість обробки залежить від температури та концентрації препарату. Сумісний з нержавіючою сталлю та керамікою	Робочі розчини препарату з концентрацією 0,05-2% готують розведенням таблетки питною водою безпосередньо перед використанням.	Комісія з державної санітарно-епідеміологічної експертизи Державної установи “Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва Національної академії медичних наук України” від 02.09.2021 №12.2-18-5/16557 дійсний до 20,09,2026	432	[43]
Вітадез ЕН	діючі речовини: алкіл С12-18 диметилбензиламоній хлорид 18,0%, полі(гексаметиленбігуанід)гідрохлорид – 1,0%, 2-феноксіетанол – 2,5%; комплекс ензимів – 1,3% (протеаза, ліпаза, амілаза).	Бактерії, віруси, гриби, спори	комплекс мийно-очищуючий, який включає ензими, неіоногенні ПАР або інші речовини з еквівалентними мийно-очищуючими властивостями, вміщує хелатний комплекс, pH-регулятор, антикорозійний комплекс.дезінфекції різноманітних поверхонь, включаючи поверхні апаратури та приладів, приміщення в т. ч. під час поточних і генеральних прибирань у шкільних та дошкільних навчальних закладах	Обробку обладнання здійснюють циркуляційною дезінфекцією, напиленням, розпиленням, заповненням, протиранням. Тривалість обробки залежить від температури та концентрації препарату. Сумісний з нержавіючою сталлю та керамікою	Застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації від 0,01% до 0,5%, залежно від сфери застосування, збудника і об’єктів обробки, виду забруднення. Норма витрати робочого розчину – 50 мл/м^2. Способи обробки: ручний, механізований	Інститут гігієни та екології Національного медичного університету О.О. Богомольця, висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 12.2-18-5/16810 від 27.07.2020 р. до 19.08.2025	972	[44]

Таблиця 5.2

Узагальнююча таблиця характеристики мийних засобів

Назва засобу	Склад	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Вартість	Джерело
Засоби для обробки внутрішньої поверхні обладнання						
Данаклін	2-феноксіетанол −2,0% ± 0,05; катіонактивні ПАР, неіоногенні ПАР до 5,0%	Робочі розчини мають гарні миючі, дезодоруючі, змочувальні властивості, усувають неприємні запахи, не пошкоджують вироби та поверхні з різних матеріалів. Видаляють механічні, білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів та інші забруднення. Не горючий, пожежо- та вибухобезпечний	Металеві і неметалеві поверхні, не чинить карозійної дії на нержавіючу сталь	1%	274,8	[40]
Септодор форте	суміш четвертинних амонійних сполук – 37,5%, глутаровий альдегід – 12,5%, вода приготовлена, регулятор pH.	Засіб для дезінфекції та миття, поєднання дезінфекції та передстерилізаційного очищення виробів із різних матеріалів; дезінфекція об'єктів при особливо небезпечних інфекціях (холера, чума, туляремія, сибірка), дезінфекція поверхонь.	Металеві і неметалеві поверхні, не чинить карозійної дії на нержавіючу сталь	0.5	1239	[45]

5.3.2 Розрахунок кількості використання миючих та дезінфікуючих засобів для ділянки виробництва ацетон біотехнологічним методом

Виробництво ацетону біотехнологічним методом за допомогою *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 та *S. cerevisiae* передбачає використання двох виробничих приміщень, окремо для культивування дріжджів та культивування *Clostridium* задля запобігання перехресної контамінації.

Планується що виробництво буде працювати протягом 330 календарних днів на рік і включає підготовку наступного обладнання: виробничий ферментер об'ємом 20 $м^3$, інокулятори об'ємом 2,5 $м^3$, 160 л, 30 л та 3 л для культивування *C. acetobutylicum* та виробничий ферментер 500 л, інокулятор 30 л для культивування дріжджів, а також реактори змішувачі, реактори змішувачі стерилізатори, збірники для титрувальних агентів та мікробіологічна лабораторія з боксом та качалками.

Для біотехнологічних виробництв, що використовують ферментаційне обладнання великого об'єму (від 1 $м^3$ і більше), доцільно враховувати будівельні нормативи. З цієї причини ширина будівлі приймається відповідно до найближчого стандартного значення – 12 м. Довжина споруди – 18м, визначається як кратна довжині типових будівельних плит, тобто 6 м. Габаритні параметри основного технологічного обладнання наведені в таблиці 5.3.

Таблиця 5.3

Специфікація обладнання

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Реактор стерилізатор для приготування розчину NaOH (Р-10)	100	0,508	2,835
Реактор збірник- змішувач для HCI (Р-12)	100	1,1	2,4
Інокулятор (ІН-14)	3	0,35	1,3
Реактор змішувач стерилізатор (Р-16) (Р-24)	40 л (х2)	0,45	1
Інокулятор (х2) (ІН-17, ІН-28)	30 л(х2)	0,44	0,48
Реактор змішувач стерилізатор (Р-20)	300	0,45	1
Інокулятор (ІН-21)	250	1,9	2,6
Інокулятор (ІН-26)	2500	0,86	1,6
Реактор стерилізатор (Р-31)	20	1	1,9
Ферментер для культивування дріжджів (ФЕР-37)	300	0,5	1,6
Реактор збірник (Р-40)	16 000	2,2	5,95
Реактор-стерилізатор для ацетату (Р-48)	2500	1,4	4,13

Закінчення табл. 5.3

Виробничий ферментер (ФЕР-50)	20 000	2,5	4,08
Всього	**42313**		
Всього для СіП	**41000**		
Всього для ручної мийка	**1313**		

Згідно даним *табл. 5.3*, загальний об'єм реакторів-змішувачів та апаратів для вирощування посівного матеріалу і виробничого біосинтезу становить 42,313 м^3.

Протягом виробничого сезону, а саме 330 днів буде проведено 88 циклів виробництва ацетону. Миття підлоги буде проводитися кожен день протягом 330 днів, миття стін та вікон буде проводитися 1 раз на місяць тобто 12 разів. В рамках виробничої будівлі пропонується 4 основних відділення:

Цех ферментації ацетону (довжина приміщення 18 м, ширина приміщення 12 м, висота 2 поверхи (12 м)

Цех ферментації дріжджів (6 м довжина, 6 м ширина, 1 поверх (6 м))

Виробнича лабораторія та (довжина 6 м, ширина 4 м)

Приміщення з качалками (довжина 6 м, ширина 2 м)

Таблиця 5.4

Загальна площа підлоги та стін виробничої будівлі

Приміщення	**Площа підлоги, м^2**	**Площа стін, м^2**	**Загальна площа, м^2**
Цех виробничого біосинтезу ацетону	432	300	732
Цех культивування дріжджів	36	60	96
Мікробіологічна лабораторія	24	50	74
Приміщення з качалками	12	40	52
Загальна площа	**504**	**450**	**954**

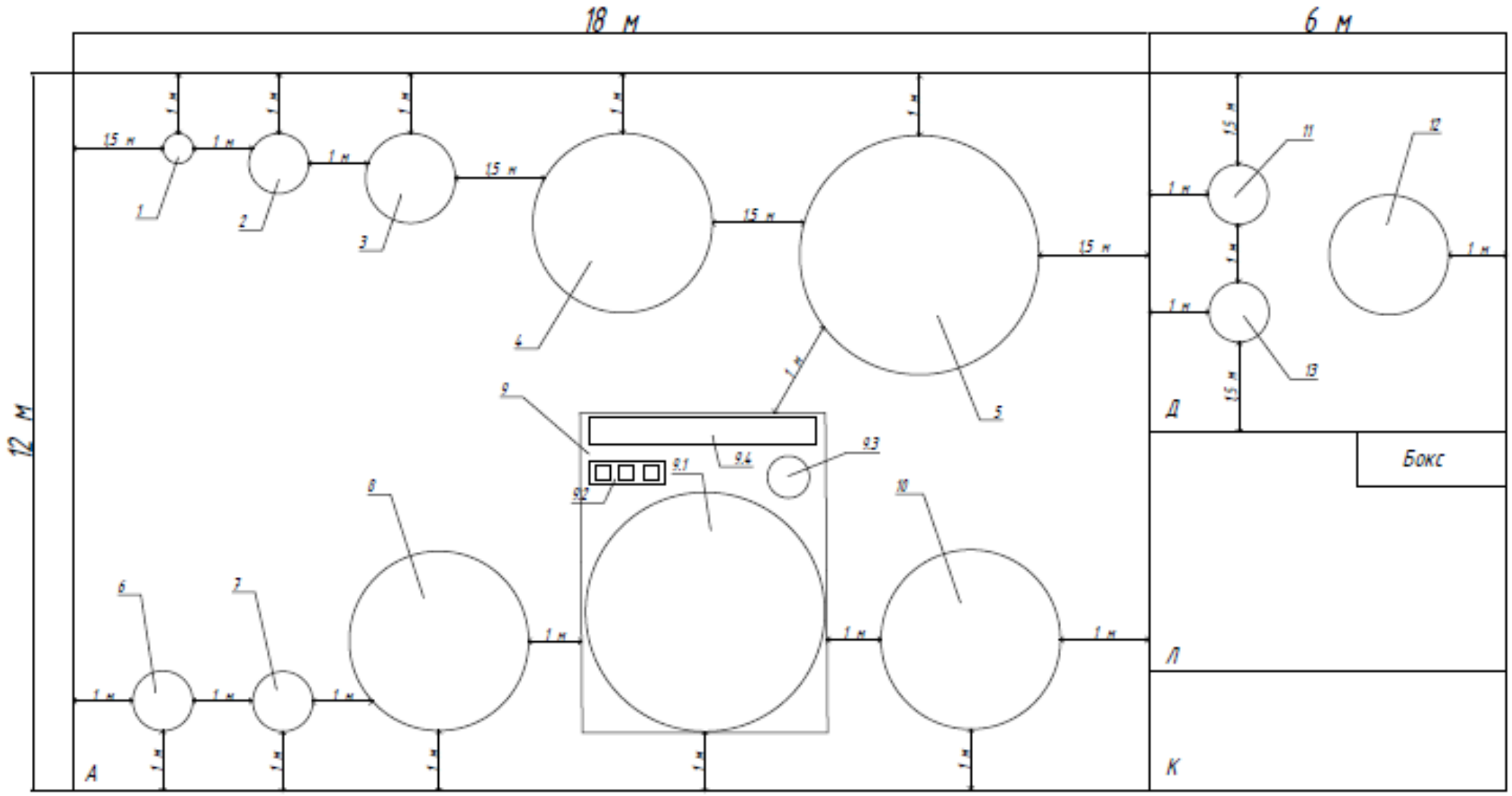

18 м
6 м
12 м
1,5 м
1 м
1
2
3
4
5
6
7
8
9
9.1
9.2
9.3
9.4
10
11
12
13
А
Б
В
Г
Д
Бокс
Л
К

Рис. 5.2. Ескіз плану виробничого приміщення для виробництва ацетону біотехнологічним методом за допомогою ко-культивування *C. acetobutylicum* та *S. cerevisiae* (ЦА – цех виробничого біосинтезу ацетону та вирощування інокуляту (1 – інокулятор 3 л (ІН-14); 2 – інокулятор об'ємом 30 л (ІН-17); 3 – інокулятор 250 л (ІН-21); 4 – інокулятор 2500 л (ІН-26); 5 – ферментер 20 м^3 (ФР-40); 6 – реактор-стерилізатор 50 л (Р-16); 7 – реактор стерилізатор 300 л (Р-20), 8 – реактор-стерилізатор 2000 л (Р-24); 9 – УБС (9.1 - Реактор змішувач 15 м^3 (Р-40), 9.2 - ТО-39, 9.3 - КНШ -36, 9.4 - В-37); 10 – реактор-стерилізатор для розчину ацетату 2000 л (Р-43); 11 - інокулятор об'ємом 30 л (ІН-28); 12 – ферментер для дріжджів 500 л (ФЕР-37); 13 – реактор-стерилізатор для композиції А дріжджів (Р-31)), (Л – мікробіологічна лабораторія; К – приміщення з качалками, Б-бокс).

Розрахунок площі підлоги та стін цеху ацетону:

Площа підлоги: $(18 \cdot 12) \cdot 2 = 432$ м^2

Загальна площа підлоги виробничого цеху ацетону включає розрахунок площі підлоги для двох поверхів будівлі і загалом складає 432 м^2

Площа стін доступних для миття: $5 \cdot 18 \cdot 2 + 5 \cdot 12 \cdot 2 = 300$ м^2

Загальна площа стін будівлі виробничого цеху ацетону, що доступні для миття складає 300 м^2

Розрахунок площі підлоги та стін цеху дріжджів:

Площа підлоги: $6 \cdot 6 = 36$ м^2

Загальна площа підлоги для цеху дріжджів складає 36 м^2

Площа стін придатних для миття: $2{,}5 \cdot 6 \cdot 4 = 60$ м^2

Загальна площа стін цеху дріжджів придатних для миття складає 60 м^2

Розрахунок площі підлоги та стін для виробничої лабораторії та приміщення з качалками:

Площа підлоги: $6 \cdot 6 = 36$ м^2

Загальна площа підлоги виробничої лабораторії та приміщення з качалками складає 36 м^2.

Площа стін придатних для миття:

у виробничій лабораторії: $(2{,}5 \cdot 6 + 2{,}5 \cdot 4) \cdot 2 = 50$ м^2;

у приміщенні з качалками: $(2{,}5 \cdot 6 + 2{,}5 \cdot 2) \cdot 2 = 40$ м^2.

Загальна площа стін виробничої лабораторії що є доступними для миття складає 50 м^2, а у приміщення з качалками - 40 м^2.

Загальна площа підлоги, що буде вимита протягом всього сезону виробництва:

$$504 \cdot 330 = 166\,320 \text{ м}^2$$

Загальна площа стін, що буде вимита протягом всього сезону виробництва:

$$450 \cdot 12 = 5400 \text{ м}^2$$

Загальна площа обладнання, що буде вимита протягом всього сезону виробництва м^2 (м^3):

$$42\,313 \cdot 89 = 3\,765\,857 \text{ м}^2$$

Таблиця 5.5

Загальна площа поверхонь для миття в виробничого приміщення

Об'єкт миття та/або дезінфекції	**Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м^2 (м^3)**	**Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва**	**Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м^2 (м^3)**
Зовнішня частина обладнання	42 313	89	3 765 857
Підлога	504	330	166 320
Стіни, двері, вікна	450	12	5400

Для ємнісного обладнання (об'єм 500 ≥ л) пропонується використовувати CiP мийку, вважається що при використанні CiP мийки витрачається 20-30% об'єму миючого або дезінфікуючого розчину від об'єму апарата. Таким чином загальна витрата кожного миючого та дезінфікуючого розчину складатиме:

$(41\,000 \cdot 0{,}3) \cdot 89 = 1\,094\,700$ л

Оскільки використання CiP системи для миття малогабаритного обладнання (об'єм 500 ≤) не є доцільним, то пропонується їх ручна мийка з заповненням цих апаратів миючими або дезінфікуючими розчинами на 80% об'єму.

$(1313 \cdot 0{,}8) \cdot 89 = 93\,485{,}6$ л

Таблиця 5.6

Розрахунок вартості використання обраних миючих та дезінфікуючих засобів

Назва мийного/дезінфіку вального засобу (діюча речовина)	**Об'єкт миття та/або дезінфекції**	**Концентрація робочого розчину, %**	**Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м²**	**Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л**	**Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн**	**Державна реєстрація до**	**Вартість 1 л робочого розчину, грн**	**Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн**
Дезінфікуючи розчини								
«СУРФАНІОС ЛЕМОН ФРЕШ» [41]	Поверхня обладнання, приміщення	0.15	3 937 577	393 757,7	730	15.07.25	1.1	433 133,47
Еконорм DEZ 58,0 - дихлорізоціанурат натрію, 17,0- кислота трихлорізоціанурова [43]	Поверхня обладнання, приміщення	0,12	3 937 577	393 757,7	432	19.08.25	0,52	204 754
Сурфахлор [42] натрієва сіль дихлоризоциануровой кислоти - 85,52%, адипінова кислота 7%, бікарбонат натрію	Поверхня обладнання, приміщення	0,128	3 937 577	393 757,7	328	19.08.25	0,412	162 228,17
Вітадез ЕН (діючі речовини: алкіл С12-18 диметилбензиламоній хлорид - 9,0%; 2-феноксіетанол – 15,0%; 1,3-пропандіамін,N-(3-амінопропіл)-N-додецил - 1,5%; полі(гексаметиленбігуанід)гідрохлорид - 1,8%) [44]	Поверхня обладнання, приміщення	0,15	3 937 577	393 757,7	972	19.08.25	1,4	551 260,78

Закінчення табл. 5.6

Лужні миючи засоби								
Данаклін[40]	Внутрішня частина обладнання	1	3 774 757	1 188 185,6	274,8	06.10.25	2,748	3 265 134,03
Септодор форте[45]	Внутрішня частина обладнання	0.5	3774 757	1 188 185,6	1239	21.04.25	6,195	7 360 809,79
Дезінфекція рук персоналів								
SeptPower (етиловий спирт 75%) [46]	персонал	100	-	-	75	03.03.26	78	-
"Бланідас 2000» експрес 40,0% спирт пропіловий; 35,0% спирт ізопропіловий; 0,15% алкілдиметилбензиламоній хлорид [47]	персонал	100	-	-	261	19.08.25	261	-

5.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.

Для біосинтезу ацетону продуцентом *Clostridium acetobutylicum ATCC 824* використовується поживне середовище наступного складу:

гідролізоване кукурудзяне борошно – 150 г/л

ацетат – 8 г/л. [19]

В розділі 3, були проведені розрахунки річної потреби в ацетоні та на основі цих даних було виведено, що для закриття певного % річної потреби в ацетоні необхідно використовувати виробничий ферментер об'ємом 20 $м^3$, який має коефіцієнт заповнення 0,8 з об'ємом культуральної рідини 16,5 $м^3$.

Обгрунтування способу попередньої гідролізації кукурудзяного борошна перед процесом стерилізації.

Попередній гідроліз кукурудзяного борошна проводиться за наступною методикою. Після того як борошно було додано до води у реакторі змішувачі, при включеній мішалці температура розчину доводиться до 70°С подачею глухої пари у сорочку апарата та pH доводиться до рівня 6 за допомогою 6%-розчину NaOH. Після чого додається препарат «Альфалад БН Л» [48] який містить α-амілазу з активністю 2000 ОД/мл з розрахунку 8 ОД на 1 грам кукурудзяного борошна та при включеній мішалці та стабільній температурі розчин витримується протягом 45 хв. Наступним кроком буде зниження показника pH до рівня 5 за допомогою 6-% розчину HCI, потім додається препарат глюкоамілази «Глюколад Л» [49] активністю 6000 ОД мл, з розрахунку 120 ОД на 1 г борошна та витримується протягом 60 хв. Після чого відбирається проба на концентрацію редукуючих речовин. По отриманню результатів з виробничої лабораторії розчин готовий до стерилізації.

Обгрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах.

Як відомо із джерела, для створення посівного матеріалу використовували середовище зі зниженою концентрацією кукурудзяного борошна до 5%, оскільки відомо, що для стадії культивування в колбах необхідно 242 мл середовища, то виходячи з розрахунку.

50 · 0,242 = 12,1 г кукурудзяного борошна

4 · 0,242 = 0,97 г ацетату

Першим етапом буде гідролізація кукурудзяного борошна. Для цього етапу стерилізації нам знадобиться препарат «Альфалад БН Л» у концентрації 96,8 ОД (8 · 12,1) або 50 мікролітрів.

2000 ОД – 1 мл

96,8 – 0,05 мл

Та 1452 ОД (120 · 12,1) препарату «Глюколад Л», що еквівалентно 240 мікролітрам

6000 ОД – 1 мл

1452 – 0,24 мл

Для гідролізу ми додаємо 12,1 грам кукурудзяного борошна в 230 мл водопровідної води в колбі об'ємом 1 л, при перемішуванні магнітною мішалкою та додаємо ферменти за вказаною вище методикою, колба щільно закривається марлеватним короком та стерилізується в автоклаві за наступних умов 121°С, 0,1 МПа протягом 30 хв.

Таблиця 5.7

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі 242 мл, г	Композиція	Об'єм композиції, л
гідролізоване кукурудзяне борошно	50	12,1±0,1	А	0,242
вода	230			

Обгрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 3 л.

Для створення посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 3 л необхідно підготувати 2,178 літри середовища.

Для цього нам знадобляться компоненти у наступних кількостях:

50 · 2,2 = 110 г кукурудзяного борошна

Першим етапом буде гідролізація кукурудзяного борошна. Для цього етапу стерилізації нам знадобиться препарат «Альфалад БН Л» у концентрації 880 ОД (8 · 110) або 440 мікролітрів.

2000 ОД – 1 мл

880 – 0,44 мл

Та 13200 ОД (120 · 110) препарату «Глюколад Л», що еквівалентно 2,2 мл

6000 ОД – 1 мл

13200 – 2,2 мл

Для гідролізу ми додаємо 110 грам кукурудзяного борошна в 1,958 л водопровідної води, що була попередньо налита у інокулятор, при додаванні наважки борошна мішалка апарата працює на швидкості 50 об/хв. Додаємо ферменти за вказаною вище методикою. Інокулятор закривається та ставиться на режим стерилізації за наступних умов 112℃, 0,05 МПа протягом 30 хв.

Таблиця 5.8

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 3 літри

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі 2,178 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
гідролізоване кукурудзяне борошно	50	110±1	А	2,178
вода	1958			
Конденсат	220			
Всього				2178

Обгрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л.

Для створення посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л необхідно підготувати 19,8 літри середовища.

Для цього нам знадобляться компоненти у наступних кількостях:

50 · 19,8 = 990 г кукурудзяного борошна

Першим етапом буде гідролізація кукурудзяного борошна. Для цього етапу стерилізації нам знадобиться препарат «Альфалад БН Л» у концентрації 7920 ОД (8 · 990) або 3,96 мл.

2000 ОД – 1 мл

7920 ОД – 3,96 мл

Та 118 800 ОД (120 · 990) препарату «Глюколад Л», що еквівалентно 19,8 мл

6000 ОД – 1 мл

118800 ОД – 19,8 мл

Для гідролізу ми додаємо 990 ± 1 грам кукурудзяного борошна в 17,82 л водопровідної води, що була попередньо налита в реактор, при додаванні наважки борошна мішалка апарата працює на швидкості 50 об/хв. Додаємо ферменти за вказаною вище методикою, інокулятор закривається та ставиться на режим стерилізації за наступних умов 112°С, 0,05 МПа протягом 30 хв.

Після стерилізації розчину гідролізованого кукурудзяного борошна в інокуляторі об’ємом 30 літрів, простерилізований розчину ацетату заливається через посівний бачок апарату в полум’ї факела при включеній мішалці апарату на рівні 50 об/хв.

Таблиця 5.9

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об’ємом 30 літрів

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі 19,8 ± 0,2 л, г	Композиція	Об’єм композиції, л
гідролізоване кукурудзяне борошно	50	990±1	А	19,8
вода	17,82 (л)			
Конденсат	1,98 (л)			
Всього				19,8

Обгрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об’ємом 250 л.

Для створення посівного матеріалу в інокуляторі об’ємом 250 л необхідно підготувати 180 літри середовища.

Для цього нам знадобляться компоненти у наступних кількостях:

50 · 180 = 9000 г кукурудзяного борошна

Першим етапом буде гідролізація кукурудзяного борошна. Для цього етапу стерилізації нам знадобиться препарат «Альфалад БН Л» у концентрації 72 000 ОД (8 · 9000) або 36 мл.

2000 ОД – 1 мл

72000 ОД – 36 мл

Та 1 080 000 ОД (120 · 9000) препарату «Глюколад Л», що еквівалентно 180 мл

6000 ОД – 1 мл

1 080 0000 ОД – 180 мл

Для гідролізу ми додаємо наважку 9000 грам кукурудзяного борошна в 162 л водопровідної води, що була попередньо налита по лічильнику в збірник-стерилізатор об'ємом 0,3 $м^3$, при додаванні наважки борошна мішалка апарата працює на швидкості 50 об/хв. Додаємо ферменти за вказаною вище методикою, реактор збірник закривається та ставиться на режим стерилізації за наступних умов 112℃, 0,05 МПа протягом 30 хв.

По завершенню стерилізації композиції з кукурудзяним борошном, тиск в збірнику-стерилізаторі очищеною атмосферою азоту підвищується до 0,5 МПа, а в попередньо простерилізованому інокуляторі тиск атмосферою азоту нагнітається до 0,05 МПа, після чого відкриваються стерильні комунікації між збірником-стерилізатором та інокулятором та методом перетискування розчин гідролізованого кукурудзяного борошна переганяється в інокулятор.

Після стерилізації розчину гідролізованого кукурудзяного борошна в збірник-стерилізаторі об'ємом 0,3 $м^3$ літрів та перекачки його в інокулятор об'ємом 0,25 $м^3$, простерилізований розчину ацетату заливається через посівний бачок апарату в полум'ї факела при включеній мішалці апарату на рівні 50 об/хв.

Таблиця 5.10

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 250 літрів

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі 180 ± 1 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
гідролізоване кукурудзяне борошно	50	9000±100	А	180
вода	162 (л)			
Конденсат	18 (л)			
Всього				180

Обгрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 2,5 м^3

Для створення посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 2,5 м^3 необхідно підготувати 1,64 м^3 середовища.

Для цього нам знадобляться компоненти у наступних кількостях:

50 · 1640 = 82 кг кукурудзяного борошна

Першим етапом буде гідролізація кукурудзяного борошна. Для цього етапу стерилізації нам знадобиться препарат «Альфалад БН Л» у концентрації 656 000 ОД (8 · 82 000) або 328 мл.

2000 ОД – 1 мл

656 000 ОД – 328 мл

Та 9 840 000 ОД (120 · 82 000) препарату «Глюколад Л», що еквівалентно 1640 мл

6000 ОД – 1 мл

9 840 000 ОД – 1640 мл

Для гідролізу ми по лічильнику заливаємо 1435 л водопровідної води в реактор збірник-стерилізатор об'ємом 3 м^3, включаємо мішалку на рівні 50 об/хв, нагріваємо воду до 70°С та поступово додаємо наважку 80 кг кукурудзяної борошна. Додаємо ферменти за вказаною вище методикою, реактор збірник закривається та ставиться на режим стерилізації за наступних умов 112°С, 0,05 МПа протягом 30 хв.

По завершенню стерилізації композиції з кукурудзяним борошном, тиск в збірнику-стерилізаторі очищеною атмосферою азоту підвищується до 0,5 МПа, а в попередньо простерилізованому інокуляторі тиск атмосферою азоту нагнітається до 0,05 МПа, після чого відкриваються стерильні комунікації між збірником-стерилізатором та інокулятором та методом перетискування розчин гідролізованого кукурудзяного борошна переганяється в інокулятор.

Після стерилізації розчину гідролізованого кукурудзяного борошна в збірнику-стерилізаторі об'ємом 3 м^3 літрів та перекачки його в інокулятор об'ємом 2,5 м^3, простерилізований розчин ацетату зі збірника стерилізатора об'ємом 0,03 м^3 за аналогічною різницею тиску перекачується в інокулятор.

Таблиця 5.11

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 2,5 м^3

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі 1640 л, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
гідролізоване кукурудзяне борошно	50	80 ± 0,5	А	1640
вода	1476			
Конденсат	164			
Всього				1640

Обгрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничої ферментації в ферментері об'ємом 20 м^3

Для виробничої ферментації необхідно підготувати 14,9 м^3 поживного середовища, концентрація кукурудзяного борошна у поживному середовищі складає 150 г/л.

150 · 14900 = 2235 кг кукурудзяного о борошна

8 · 14900 = 119,2 кг ацетату

Оскільки відомо, що кукурудзяне борошно складається з кукурудзяного крохмалю щонайменше на 70%, то після гідролізу загальна концентрація може досягати 105 г/л.

Обгрунтування способу попередньої гідролізації кукурудзяного борошна перед процесом стерилізації.

По лічильнику в реактор збірник-стерилізатор наливаємо 11,980 м^3 води водопровідної, шляхом подачі пари в сорочку апарата нагріваємо воду до 70℃ та за допомогою титрувальних агентів pH доводиться до рівня 6, та при включеній мішалці 50 об/хв, порціонно через люк апарата додаємо 2235 кг кукурудзяного борошна. Після чого додаємо 8 940 мл препарату «Альфалад БН Л» та при незмінних умовах чекаємо протягом 45 хв.

Для цього етапу гідролізу нам знадобиться препарат «Альфалад БН Л» у концентрації 17 880 000 ОД (8 · 2 235 000) або 8 940 мл.

2000 ОД – 1 мл

17 880 000 ОД – 8 940 мл

По завершенню 45 хв, pH за допомогою 6% розчину HCI, знижується до 5 та додається 44,7 л препарату «Глюколад Л», після чого за тих самих умов розчин витримується протягом 60 хв.

Та 268 200 000 ОД (120 · 2 235 000) препарату «Глюколад Л», що еквівалентно 44 700 мл

6000 ОД – 1 мл

268 200 000 ОД – 44 700 мл

Стерилізація композиції кукурудзяного борошна об'ємом 11,98 м^3

Після завершення гідролізу кукурудзяного борошна та висновків виробничої лабораторії щодо концентрації загальних редукуючих речовин, реактор збірник об'ємом 16 м^3 закривається та по комунікаціям розчин гідролізованого кукурудзяного борошна поступає на УБС-20, де стерилізується короткочасним нагріванням до 140℃, після стерилізації в УБС-20 розчин поступає в попередньо простерилізований виробничий ферментер об'ємом 20 м^3.

Композиція Б, буде простерилізована наступним чином, у реактор збірник-стерилізатор об'ємом 0,4 м^3, по лічильнику заливається 150 ± 1 л водопровідної води та порціонно додається 49,3 ± 0,5 кг ацетату при включеній мішалці 50 об/хв.

14 990 л – 59,6 кг ацетату

12 400 л – 49,3 кг ацетату

Після чого реактор зачиняється та встановлюється режим стерилізації на рівні 131°С, 0,15 МПа, 40 хв.

Обгрунтування способу стерилізації композиції Б для виробничого культивування

В реактор-стерилізатор об'ємом 2 м^3, подається за допомогою лічильника 1430,4 л водопровідної води, після чого за допомогою вагового-об'ємного дозатора подають 119,2 кг крижаного ацетату, після чого розчин стерилізують при температурі 131°С 40 хв 0,15 МПа.

Таблиця 5.12

Композиції стерилізації компонентів для виробничого культивуання в ферментері об'ємом 20 м^3

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі 14 900 л, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
гідролізоване кукурудзяне борошно	150	2235 (кг)	А	13311
вода	11980			
Конденсат	1331,1			
Ацетат	8	119,2 (кг)	Б	1589
вода	1430,4			
Конденсат	158,9			
Всього				14900

5.4.1 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування *S. cerevisiae*

Для біосинтезу ацетону продуцентом *Clostridium acetobutylicum ATCC 824* також використовується допоміжний біологічний агент *S.cerevisiae* використовується поживне середовище наступного складу г/л:

глюкоза 41,7, дріжджовий екстракт 8,5, $(NH_4)_2SO_4$ 1,3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 та $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,06.

В розділі 3, були проведені розрахунки річної потреби в ацетоні та на основі цих даних було виведено, що для закриття певного % річної потреби в ацетоні необхідно

використовувати ферментер для дріжджів об'ємом 0,3 $м^3$, який має коефіцієнт заповнення 0,6 з об'ємом культуральної рідини 182 л, інокулятор об'ємом 0,03 $м^3$ та 18 качалочних колб.

Обгрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах.

Оскільки поживне середовище складається з органічних термолабільних компонентів таких як глюкоза та дріжджовий екстракт, та неорганічних термостабільних компонентів, то поживне середовище буде розділено на 2 композиції.

Композиція А: глюкоза та дріжджовий екстракт (112℃ 30 хвилин 0,05 МПа)

Композиція Б: $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ та $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (131℃ 40 хвилин 0,15 МПа)

Таблиця 5.13

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі 2 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	41,7	83,4	А	1,5
Дріжджовий екстракт	8,5	17		
вода	1500			
$(NH_4)_2SO_4$	1,3	2,6	Б	0,5
$MgSO_4$	0,1	0,2		
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,06	0,12		
вода	500			
Всього				2

Обгрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування посівного матерілу в інокуляторі об'ємом 30 л

Оскільки поживне середовище складається з органічних термолабільних компонентів таких як глюкоза та дріжджовий екстракт, та неорганічних термостабільних компонентів, то поживне середовище буде розділено на 2 композиції.

Композиція А: глюкоза та дріжджовий екстракт (112℃ 30 хвилин 0,05 МПа)

Композиція Б: $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ та $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (131℃ 40 хвилин 0,15 МПа)

Таблиця 5.14

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі 18,02 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	41,7	751,43	А	2
Дріжджовий екстракт	8,5	153,2		
вода	2000			
$(NH_4)_2SO_4$	1,3	23,43	Б	16,02
$MgSO_4$	0,1	0,18		
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,06	1,1		
вода	14,418			
Конденсат	1,6			
Всього				18,02

Обгрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування дріжджової культури в ферментері об'ємом 300 л

Оскільки поживне середовище складається з органічних термолабільних компонентів таких як глюкоза та дріжджовий екстракт, та неорганічних термостабільних компонентів, то поживне середовище буде розділено на 2 композиції.

Композиція А: глюкоза та дріжджовий екстракт (112℃ 30 хвилин 0,05 МПа)

Композиція Б: $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ та $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (131℃ 40 хвилин 0,15 МПа)

Таблиця 5.15

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 300 л

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі 163,8 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	41,7	6830,5	А	13,8
Дріжджовий екстракт	8,5	1392,3		
вода	12,42			
конденсат	1,38			
$(NH_4)_2SO_4$	1,3	213	Б	150
$MgSO_4$	0,1	16,80		
$CaCl_2*2H_2O$	0,06	9,8		
вода	135			
Конденсат	15			
Всього				163,8

5.4. Стерилізація розчинів титрувальних агентів

Обгрунтування використання та приготування 6% розчину HCI для гідролізу кукурудзяного борошна

Оскільки для гідролізу кукурудзяного борошна необхідно спочатку понизити pH середовища до 6 (орієнтовно на 1 значення pH) для препарату «Альфалад» після чого понизити pH середовища ще на 1 значення для препарату «Глюколад», то загалом протягом гідролізу необхідно знизити pH середовища на 2 значення, як відомо 2 мл 6% розчину HCI знижують pH розчину на 1 значення, таким чином, для проведення процесу гідролізу необхідно приготувати:

0,242 + 2,178 + 19,8 + 180 + 1,64 + 11 980 = 12 183,86 · 4 = 48 735,44 мл

Для приготування 48,735 літрів HCI нам необхідно залити 40,8 ± 0,2 л дистильованої води в реактор об'ємом 0,1 м^3 та стерилізувати за наступних умов 131°C, 0,15 МПа, 40 хв. Після охолодження води, через комунікації апарату вноситься 6,39 літри 36% розчину HCI при працюючий мішалці 50 об/хв

Обгрунтування використання та приготування 6% розчину NaOH для виробничого культивування

Згідно статті [19] pH регулювалося одноразово за допомогою додавання 3розчину NaOH перед внесенням дріжджової культури до виробничого ферментера pH доводили до рівня 5, орієнтовно з 4. Враховуючи той факт що на момент внесення дріжджів об'єм середовища становить 15 $м^3$, то для доведення необхідно 30 л 6% розчину NaOH, виходячі з того що 2 мл 6% розчину NaOH змінюють значення pH на 1. Також зі статті відомо, що для культивування дріжджів pH стабільно підтримували на рівні 6, але не зазначається яким саме титруючим агентом, тому пропонується взяти 6% розчин NaOH, як відомо з *таблиці 3.2* для культивування дріжджів загалом створюється (182 + 20 = 202) 202 л культуральної рідини, для якої необхідно (2 · 202 = 404) 404 мл 6% розчину NaOH.

Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для виробничого культивування.

Для приготування 30 л 6% розчину NaOH необхідно взяти 1,8 кг безводного NaOH та розчинити в 28,2 л дистильованої води, стерилізація буде проводитися в реакторі-стерилізаторі об'ємом 60 л за наступних умов 131°C 40 хв 0,15 МПа

Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для культивування дріжджів.

Для приготування 404 мл 6% розчину NaOH необхідно взяти 24,24 г безводного NaOH та розчинити в 379,76 мл дистильованої води, стерилізація буде проводитися в колбі в автоклаві за наступних умов 131°C 40 хв 0,15 МПа.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ АПАРАТУРНОЇ СХЕМИ КУЛЬТИВУВАННЯ *C. ACETOBUTILICUM 824* ДЛЯ ОТРИМАННЯ АЦЕТОНУ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)
1	*2*	*3*	*4*
Б-1	Балони с азотом	1	Балон с азотом об’єм 40 л. Максимальний робочий тиск 14,7 МПа [50]
Ф-2 Ф-9	Головна фільтр-система очистки	2	Кишеньковий мішок фільтр Клас очистки: H10 [51]
ПЗ-3	Повітрязабірник	1	Повітрозабірник стіновий NavyFlex VLB100 [52]
ФГО-4	Фільтр грубоочистки	1	Матеріал: вологостійкий полімерний, розміри 594 х 594 х 95 мм, пропускна здатність 4250 $м^3$ $год^{-1}$, назва «AmAir 300 GT», назва виробника «AAF international». Клас очистки G4 Виробник США [53]
К-5	Компресор для стиснення повітря	1	Потужність двигуна 7,5 кВт [54]
ТО-6	Теплообмінник охолоджувач для охолодження стисненого повітря	1	Охолоджувач повітря Aerostar SWC 50-25/3R [55]
Р-7	Ресивер для стабілізації подачі повітря	1	Максимальний робочий тиск 1 бар Вага ресивера - 245 кг Розміри (ДхШхВ), мм - 902х1002х2237 Об’єм 900 л. Виробник: Україна [56]
ТН-8	Теплообмінник нагрівач для стабілізації показників повітря	1	Теплообмінник нагрівач ПНВ-211-202М [57]
ДЗ-10 ДЗ-15	Ваговий дозатор для реактора 60 л для NaOH	2	Ваги лабораторні MWP-N 3000 CAS Максимальна вага: 3 кг [58]
Р-11	Реактор-стерилізатор об’ємом 60літрів для приготування, зберігання та стерилізації розчину NaOH	1	Робочий об'єм, л – 60 Довжина, мм - 1437 Ширина,мм - 856 Висота, мм – 1580 [59]

Продовження табл. 6.1

ДЗ-12 ДЗ-19 ДЗ-30	Ваговий дозатор для реактора для приготування розчину соляної кислоти	1	Ваги торговельні SW - 10 CAS Максимальне навантаження - 10 кг [60]
ЗЗ-13	Реактор-збірник для розчину HCI	1	Номінальний об'єм л 110 Робочий об'єм л 100 Швидкість обертання мішалки об/хв 200-400 плавнорегульована Робочий тиск у корпусі бар атмосферний Встановлена потужність кВт 1,5 Габаритні розміри, не більше довжина мм 1070 ширина мм 700 висота мм 1330 Маса, не більше кг 121 [61]
ІН-14	Інокулятор об’ємом 3 літри	1	Загальна висота: 400 мм Внутрішня висота посудини: 241 мм Внутрішній діаметр посудини: 130 мм Матеріал компонента: нержавіюча сталь 316L [62]
Р-16	Реактор-змішувач стерилізатор об’єм 50 літрів	1	Робочий об'єм, л - 50 довжина - 876 ширина - 525 висота - 1310 Маса реактора, кг, не більше – 80 [63]
Н-17	Перистальтичний насос для перекачки комп. А в інокултяор об’ємом 30 л	1	Макс. витрата - 3500 мл/хв Діапазон робочих температур від 5 до 40 °С [64]
ІН-18 ІН-28	Інокулятор об’ємом 30 літрів	2	Висота - 646 мм Внутрішній діаметр - 245 мм Об'єм: 30 л [65]
Р-20	Реактор змішувач-стерилізатор об’єм 300 літрів	1	Матеріал конструкції: нержавіюча сталь Об’єм – 300 л [66]
Н-21	Перистальтичний насос для перекачки комп. А в інокулятор 250 л	1	Мін. Витрата - 0,12 л/год Макс. витрата – 3300 л/год Діапазон робочих температур від 5 до 40 °С [67]

Продовження табл. 6.1

ІН-22	Інокулятор об’ємом 250 л	1	Загальний об’єм: 250 л Робочий об’єм: 30%~70% Бак: Джакетований бак з нержавіючої сталі SS316 і SS304 Робочий тиск бака: 0.3 МПа Робочий тиск джакета: 0.35 МПа Полірування: 0.4-0.6 мкм Співвідношення діаметра до висоти: 1:2.2-2.5 Сенсори: Сенсор pH: Hamilton/Mettler (Швейцарія), діапазон: 2.00-12.00 ±0.1 Сенсор DO: Hamilton/Mettler (Швейцарія), діапазон: 0-150 ±3%, точність 0.1% Передавач тиску: BD (Німеччина) Тиск: Автоматичний контроль тиску [68]
ДЗ-23 ДЗ-33 ДЗ-42	Дозатор для подачі кукурудзяного борошна в апарат	1	Границі дозування, від 5 до 50 кг Клас точності від 0,2* Продуктивність, не менше 400 мішків/год Габаритні розміри, не більше, мм 805х615х610 Маса, не більше, кг 71 Живлення від мережі напругою 220 В, частотою 50 Гц Споживана потужність, не більше, 25 ВА Номінальний тиск стисненого повітря, МПа (0,4 ± 0,04) Витрата повітря, 0,5 $м^3$/год Управління дозатором електропневматичне Робоча температура навколишнього повітря від -10 до +40 ºС Робоча відносна вологість 85 % [69]
Р-24 Р-43	Реактор-змішувач стерилізатор об’єм 2000 літрів	1	Реактор Lee Industries, об'ємом 2000 літрів, модель 2000 "DP", нержавіюча сталь 316L, вертикальний. [70]
Н-25 Н-32 Н-44	Перистальтичний насос	3	Максимальна швидкість потоку - 186,6 л/хв Максимальна температура - 80ºС Тверді речовини 55 мм [71]
ІН-26	Інокулятор об’ємом 2.5 $м^3$	1	Матеріал - Нержавіюча сталь Обсяг - 2500 літрів. Мотор - 1,1кВт [72]
ІФ-27	Фільтр індивідуальної очистки	1	Зона фільтрації - 1,5 $м^2$ Розмір пор – 0,2 μm [73]
ФР-29	Ферментер для культивування дріжджів	1	Ширина - 1400 мм Довжина - 1450 мм Висота - 3400 мм [74]
Р-31	Реактор-стерилізатор для термолабільних компонентів для культивування дріжджів	1	Діаметр - 300 мм Висота - 1600 мм Міскість заповнення - 65%-80% [75]

Продовження табл. 6.1

Н-32	Насос перистальтичний для перекачування композиції А в ферметер 300 л	1	Мін. витрата - 0,004 мл/хв Макс. витрата - 3500 мл/хв [76]
Р-34	Реактор збірник об'ємом 16 $м^3$	1	Діаметр - 2200 мм Довжина - 2650 мм Ширина - 2650 мм Висота - 5700 мм [77]
Н-35	Відцентровий насос для УБС	1	Країна виробник - Україна Максимальний напір - 140 м Пропускна здатність - 8 куб.м/год Номінальна частота обертання вала - 3000 об/хв [78]
КНШ-36	Колонка швидкісного нагріву	1	Виробник Tetrapack Швеція Продуктивність: 500–10000 л/год Температура стерилізації: 85~150 °C Тиск пари: 0,5 МПа Час нагрівання: 4–15 секунд [79]
В-37	Витримувач для УБС 20	1	Витримувач виробництва: Польща Діаметр труб 65 мм. [80]
ТО-38	Теплообмінник рекуператор	1	Характеристики теплообмінника: Несуча рама: Тип: розбірна конструкція з можливістю зміни площі теплообміну Матеріал: вуглецева сталь пофарбована RAL 5012 (Royal Blue), нержавіюча сталь, плакована. Стягуючі шпильки, болти: Призначення: для стягування пакета пластин Матеріал: вуглецева сталь оцинкована, нержавіюча сталь Клас міцності: 8.8 Приєднувальні патрубки: Типи: трубне різьблення R 11/4 "ISO7 / 1, молочне різьблення 11/4" DIN11851, різьблення, приварка, фланець Матеріал: вуглецева сталь, нержавіюча сталь Опції: нестандартні патрубки за запитом Теплообмінна поверхня: Тип: пакет пластин виробництва TRANTER Товщина пластин: 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм Матеріал: нержавіюча сталь 254SMO, AISI304 (1.4301), AISI316 (1.4401), титан Ущільнення: Призначення: герметизація каналів теплообмінника Матеріал: EPDM-P, NBR-P, VITON Залежність: від корозійної активності середовища і робочої температури [81]

Закінчення табл. 6.1

ТО-39	Теплообмінник охолоджувач	1	Виробництво: Україна Різьба до рукава: G1/2" BSP Максимальний тиск: 25 бар Маса: 6 кг Напруга підводу: DC 24 В Пропускна здатність: 40 л/хв Обертів за хвилину кулера: 4100 об/хв Діаметр кулера: 170 мм [82]
ФР-40	Виробничий ферментер об’ємом 20 $м^3$	1	Діаметр - 2550 мм Висота - 4080 мм [83]
ІФ-41	Фільтр індивідуальної очистки	1	Зона фільтрації - 2,25 $м^2$ Розмір по р- 0,2 μm [84]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ АЦЕТОНУ ЗА ДОПОМОГОЮ *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM ATCC 824*

Технологічна схема виробництва ацетону *Clostridium acetobutylicum ATCC 824* передбачає настуні стадії: допоміжні роботи(підготовка інертного газу, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес – підготовка посівного матеріалу та виробничий біосинтез

ДР 1. Підготовка інертного газу

ДР 1.1. Фільтрація в головному фільтрі

З балону (Б-1) азот подається до головного фільтра класу Н10 (Ф-2), який затримує 99% часточок розміром 0,2 мкм.

ДР 1.2. Фільтрація в індивідуальних фільтрах

На кожний апарат де проводяться ферментивні процеси встановлюється фільтр індивідуальної очистки (ІФ-41), з ефективністю затримання домішок більших за 0,2 мкм на рівні 99,9%

ДР 2. Підготовка стисненого аераційного повітря для культивування S. cerevisiae

ДР 2.1. Захоплення атмосферного повітря

Забір повітря здійснюється через приймальну шахту (ПЗ-3), яка розташована на висоті 2–3 м вище найвищої точки споруди. Це рішення прийнято з урахуванням того, що концентрація мікроорганізмів у повітрі зменшується з висотою. У даній системі передбачено висоту 16 м, що два поверхи будівлі (12 м) та похилий дах.

ДР 2.2. Первинне очищення повітря

На початковому етапі повітря проходить через фільтри грубої очистки (ФГО-4), які видаляють великі частинки аерозолів, зокрема пил. Це не лише сприяє зниженню забрудненості, але й зменшує навантаження на компресорне обладнання, що покращує ефективність наступних етапів очищення.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Для подолання опору подальших фільтраційних систем і забезпечення диспергування у культуральному середовищі, повітря стискається турбокомпресором (К-5) до тиску 0,35 – 0,5 МПа. Під час цього процесу відбувається нагрівання повітря до 120 – 250°С.

ДР 2.4. Осушення та охолодження повітря

Стиснене повітря, що надходить із попереднього етапу (ДР 2.3), проходить охолодження у теплообміннику-осушувачі (ТО-6) до температури 25 – 30°С, що сприяє видаленню надлишкової вологи. Додатково використовується ресивер (Р-7), який виконує функцію осушення та стабілізації потоку, усуваючи можливі пульсації, що можуть впливати на ефективність роботи фільтраційного обладнання. Оптимальна вологість повітря після цього етапу становить 60 – 70%.

ДР 2.5. Стабілізація параметрів повітря

Зважаючи на те, що температура та вологість повітря можуть змінюватися в процесі його проходження через систему, перед наступним етапом очищення необхідно стабілізувати ці параметри. Для цього застосовується теплообмінник-нагрівач (ТН-8), який підвищує температуру до приблизно 50°С та встановлює рівень вологості на позначці 60%.

ДР 2.6. Тонка фільтрація повітря

Після стабілізації параметрів (ДР 2.5), повітря подається у фільтр високого ступеня очищення (Ф-9), який здатний затримувати 99,9% частинок розміром понад 0,2 мкм.

ДР 2.7. Фінальне очищення перед подачею у ферментаційну систему

Очищене на попередньому етапі повітря (ДР 2.6) спрямовується у загальну систему подачі аераційного повітря. Перед безпосередньою подачею в апарати воно додатково проходить індивідуальні фільтри (ІФ-27), який забезпечує видалення 99,997% частинок розміром 0,2 мкм і більше.

ДР 3. Підготовка та стерилізація розчинів титрувальних агентів

ДР 3.1. Приготування та стерилізація 6%-розчину NaOH

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація 6%-розчину NaOH для виробничого культивування C. acetobutylicum

Як було визначено в 5-му розділі даної роботи, для забезпечення виробничого процесу лужним титрувальним розчином, необхідно приготувати 30 літрів 6%-розчину NaOH, для цього в попередньо перевірений та очищений реактор-стерилізатор (Р-11) об'ємом 60 л необхідно по лічильнику набрати 28,2 л дистильованої води та включити мішалку апарата на рівні 50 об/хв, після чого зважити наважку 1,8 кг безводного NaOH на технічних лабораторних вагах (ДЗ-10) та порціонно подати до реактора (Р-11) з 28,2 літрами води. Після чого мішалку залишають увімкненою до повного розчинення лугу. Після повного розчинення лугу розчин стерилізують глухою та гострою парою при температурі 131℃ протягом 40 хв.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація 6%-розчину NaOH для культивування S. cerevisiae

Як було визначено в 5-му розділі даної роботи, для повного забезпечення культивування *S. cerevisiae* лужним титрувальним розчином, необхідно приготувати 404 мл 6%-розчину NaOH, для цього в попередньо перевірену та очищену колбу об'ємом 1 л необхідно мірним циліндром на 500 мл набрати 379,76 мл дистильованої води, після чого зважити наважку 24,24 г безводного NaOH на технічних лабораторних вагах та подати до колби з 379,76 мл води. Після чого розчин перемішують до повного розчинення лугу. Після повного розчинення лугу розчин стерилізують в автоклаві при температурі 131℃ протягом 40 хв.

ДР. 3.2 Приготування та стерилізація 6%-розчину HCl

Як було визначено в 5-му розділі даної роботи, для повного забезпечення процесу кислим титрувальним розчином, необхідно приготувати 48,735 літрів 6%-розчину HCl. Для приготування 48,735 літрів HCl нам необхідно залити по лічильнику 40,8 ± 0,2 л дистильованої води в реактор об'ємом 0,1 м^3 (ЗЗ-13). Після через посівний бачок вноситься попередньо відважені на технічних вагах (ДЗ-12) 6,39 кг 36% розчину HCl при працюючий мішалці 50 об/хв.

ДР 4. Підготовка та стерилізація розчинів підживлення

ДР 4.1. Приготування та стерилізація розчину ацетату для культивування *C. acetobutylicum*

В реактор стерилізатор (Р-43) за лічильником подають 1430,4 л води водопровідної, після чого за допомогою об'ємно-вагового дозатора (ДЗ-42) в реактор подається 119,2 кг крижаного ацетату, після чого обороти мішалки встановлюють на рівні 100 об/хв та чекають протягом 3-5 хв для повного змішування компонентів. Після чого реактор встановлюється в режим стерилізації за наступних умов 131℃ 0,15 МПа протягом 40 хв.

ДР 5. Підготовка та стерилізація поживного середовища

ДР 5.1. Гідроліз та стерилізація композиції А для стадії культивування в колбах

Для гідролізу ми додаємо наважку 12,1 грам кукурудзяного борошна попередньо зваженого на технічних лабораторних вагах в 230 мл водопровідної води, яка була залита в колбу об'ємом 1 л, після чого додаємо обертовий елемент магнітної мішалки в колбу та при перемішуванні магнітною мішалкою ставимо довгий електрод pH метра та за допомогою титрувальних розчинів доводимо pH до рівня 6, після чого додаємо 50 мкл ферментного препарату «Альфалад БН Л» з допомогою піпетки-дозатора. Ставимо колбу у водяну баню за температури 70℃ протягом 45 хв. Після чого колба знову ставиться на магнітну мішалку та титрувальними розчинами pH опускається до значення 5 після чого за допомогою піпетки-дозатора додається 240 мкл препарату «Глюколад Л» та ставится назад у водяну баню при 70℃ на 60 хв, колба щільно закривається марле-ватним короком та стерилізується в автоклаві за наступних умов 112℃, 0,05 МПа протягом 40 хв.

ДР 5.2. Гідроліз та стерилізація композиції А для створення посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 3 літри

Для гідролізу ми додаємо наважку 110 грам кукурудзяного борошна попередньо зваженого на технічних лабораторних вагах в 1 958 мл води дистильованої яка була нагріта до 70℃, яка була залита в колбу об'ємом 2 л, після чого додаємо обертовий елемент магнітної мішалки з підігрівом в колбу та при перемішуванні магнітною

мішалкою ставимо довгий електрод pH метра та за допомогою титрувальних розчинів доводимо pH до рівня 6, після чого додаємо 440 мкл ферментного препарату «Альфалад БН Л» з допомогою піпетки-дозатора. Ставимо колбу у водяну баню за температури 70℃ протягом 45 хв. Після чого колба знову ставиться на магнітну мішалку та титрувальними розчинами pH опускається до значення 5 після чого за допомогою піпетки-дозатора додається 2.2 мл препарату «Глюколад Л» та ставится назад у водяну баню при 70℃ на 60 хв, після цього розчин гідролізованого кукурудзяного борошна подається в інокулятор (ІН-14) та за допомогою пари інокулятор ставлять на режим стерилізації: 112 ℃ протягом 30 хв 0,05 МПа.

ДР 5.3. Гідроліз та стерилізація композиції А для створення посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

Лічильник подачі водопровідної води встановлюється на рівні 17,82 л, після чого вода по лічильнику подається в реактор об'ємом 50 л (Р-16). Після заповнення реактора відповідним об'ємом води, мішалка апарата запускається та працює на режимі 50 об/хв, а також встановлюється режим підігріву глухою парою на рівні 70℃, протягом нагрівання на технічних лабораторних вагах зважується наважка 990 г кукурудзяного борошна та поступово подається в реактор через кришку апарата. Також після додавання кукурудзяного борошна регулюється pH за допомогою титрувальних агентів він доводиться до рівня 6. Після доведення pH та повного суспендування борошна за допомогою піпетки додають 3,96 мл препарату «Альфалад БН Л», та витримують розчин за стабільної температури та перемішуванні протягом 40 хв. По завершенню 40 хв, за допомогою титрувальних агентів pH розчину доводять до рівня 5 та за допомогою мірного циліндра в реактор додають 19,8 мл розчину «Глюколад Л» та витримують за стабільних умов протягом 60 хв. Після чого реактор герметично закривають, відключають мішалку та встановлюють режим стерилізації глухою та гострою парою за наступних умов: 112 ℃ протягом 30 хв 0,05 МПа.

ДР 5.4. Гідроліз та стерилізація композиції А для створення посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 250 л

Лічильник подачі водопровідної води встановлюється на рівні 162 л, після чого вода по лічильнику подається в збірник-стерилізатор об'ємом 300 л (Р-20). Після

заповнення збірника-стерилізатор відповідним об’ємом води, мішалка апарата запускається та працює на режимі 50 об/хв, а також встановлюється режим підігріву глухою парою на рівні 70°С, протягом нагрівання за допомогою технічних ваг (ДЗ-19) зважується наважка 9000 г кукурудзяного борошна та поступово подається в реактор через кришку апарата, наступна порція подається тільки після ресуспендування попердньої. Також після додавання кукурудзяного борошна регулюється pH за допомогою титрувальних агентів він доводиться до рівня 6. Після доведення pH та підігріву за допомогою піпетки додають 36 мл препарату «Альфалад БН Л», та витримують розчин за стабільної температури та перемішуванні протягом 40 хв. По завершенню 40 хв, за допомогою титрувальних агентів pH розчину доводять до рівня 5 та за допомогою мірного циліндра в реактор (Р-20) додають 180 мл розчину «Глюколад Л» та витримують за стабільних умов протягом 60 хв. Після чого реактор герметично закривають, відключають мішалку та встановлюють режим стерилізації глухою та гострою парою за наступних умов: 112 °С протягом 30 хв 0,05 МПа.

ДР 5.5. Гідроліз та стерилізація композиції А для створення посівного матеріалу в інокуляторі об’ємом 2,5 м^3

Лічильник подачі водопровідної води встановлюється на рівні 1476 л, після чого вода по лічильнику подається в збірник-стерилізатор об’ємом 2 м^3 (Р-24). Після заповнення збірника-стерилізатора відповідним об’ємом води, мішалка апарата запускається та працює на режимі 50 об/хв, а також встановлюється режим підігріву глухою парою на рівні 70°С, протягом нагрівання через ваговий дозатор (ДЗ-23) подається 80 кг кукурудзяного борошна поступово вносять в реактор через кришку апарата порціями не більше 5 кг (мінімальна роздільна здатність дозатора). Також після додавання кукурудзяного борошна регулюється pH за допомогою титрувальних агентів він доводиться до рівня 6. Після доведення pH та підігріву за допомогою піпетки додають 328 мл препарату «Альфалад БН Л», та витримують розчин за стабільної температури та перемішуванні протягом 40 хв. По завершенню 40 хв, за допомогою титрувальних агентів pH розчину доводять до рівня 5 та за допомогою мірного циліндра в реактор додають 1640 мл розчину «Глюколад Л» та витримують за стабільних умов протягом 60 хв. Після чого реактор герметично закривають,

відключають мішалку та встановлюють режим стерилізації глухою та гострою парою за наступних умов: 112 ℃ протягом 30 хв 0,05 МПа.

ДР 5.6. Гідроліз та стерилізація композиції А для виробничої ферментації в ферментері об'ємом 20 м^3

По лічильнику в реактор збірник-змішувач (Р-34) наливаємо за лічильником 11 980 л води водопровідної, після чого шляхом подачі пари в сорочку апарата нагріваємо воду до 70℃, протягом нагрівання води за допомогою вагового дозатора (ДЗ-33) завантажується 2235 кг кукурудзяного борошна та порційно вноситься у збірник-змішувач (по 25 кг) при включеній на 50 об/хв мішалці. Після внесення повної наважки борошна за допомогою титрувальних агентів pH доводиться до рівня 6, після досягнення 70℃ додається 8 940 мл препарату «Альфалад БН Л» який відміряється за допомогою тари об'ємом 5 л та мірного циліндра. Після додавання препарату залишаємо розчин за стабільних умов протягом 40 хв. По завершенню 40 хв, за допомогою титрувальних агентів pH розчину доводять до рівня 5 та за допомогою вимірювальної тари в збірник-змішувач додають 44,7 л розчину «Глюколад Л» та витримують за стабільних умов протягом 60 хв. Після чого утворений розчин гідролізованої кукурудзяного борошна з ректора збірника (Р-34) подають шнековим насосом (Н-35) в УБС-20 (ТО-38, КШН-36, В-37, ТО-39), де розчин проходить стерилізацію при 140℃, після чого розчин по стерильним комунікаціям відправляється в попередньо простерилізований та очищений ферментер об'ємом 20 м^3 (ФР-40).

ДР 6. Підготовка та стерилізація поживного середовища для культивування S. cerevisiae

ДР 6.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в колбах на качалках

ДР 6.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На лабораторних вагах необхідно зважити наважки глюкози 83,4 г та дріжджового екстракту 17 г, за допомогою мірного циліндру в мірний стакан подають 500 мл води дистильованої та додають наважки при перемішуванні за допомогою магнітної мішалки, після повного змішування компонентів розчин переливають у

мірний циліндр об’ємом 2 л та доводять до об’єму 1500 мл. Після чого створений розчин наливають в колбу об’ємом 2 л, щільно закривають ватно-марлевим корком та ставлять в автоклав на стерилізацію при 112 ℃ протягом 40 хв 0,05 МПа.

ДР 6.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На лабораторних вагах необхідно зважити наважки $(NH_4)_2SO_4$ 2,6 г, $MgSO_4$ 0,2 г та $CaCI_2 \cdot 2H_2O$ 0,12 г, після чого за допомогою мірного циліндру в мірний стакан подають 500 мл води дистильованої та додають наважки при перемішуванні за допомогою магнітної мішалки, після повного змішування компонентів розчин переливають у мірний циліндр об’ємом 1 л та доводять до об’єму 500 мл. Після чого створений розчин наливають в колбу об’ємом 2 л, щільно закривають ватно-марлевим корком та ставлять в автоклав на стерилізацію при 131 ℃ протягом 40 хв 0,15 МПа.

ДР 6.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об’ємом 30 л

ДР 6.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На лабораторних вагах необхідно зважити наважки глюкози 751,43 г та дріжджового екстракту 153,2 г, за допомогою мірного циліндру в мірний стакан подають 2 л води дистильованої та додають наважки при перемішуванні за допомогою магнітної мішалки, після повного змішування компонентів розчин переливають у мірний циліндр об’ємом 2 л та доводять до об’єму 2 л. Після чого створений розчин наливають в колбу об’ємом 2 л, щільно закривають ватно-марлевим корком та ставлять в автоклав на стерилізацію при 112 ℃ протягом 40 хв 0,05 МПа.

ДР 6.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На лабораторних вагах необхідно зважити наважки $(NH_4)_2SO_4$ 23,43 г, $MgSO_4$ 0,18 г та $CaCI_2 \cdot 2H_2O$ 1,1 г, після чого за допомогою мірного циліндру в мірний стакан подають 500 мл води дистильованої та додають наважки при перемішуванні за допомогою магнітної мішалки, після повного змішування компонентів розчин переливають у мірний циліндр об’ємом 1 л та доводять до об’єму 1000 мл. Після чого створений розчин наливають в колбу об’ємом 2 л та подають в інокулятор (ІН-28) з попередньо набраними за допомогою лічильника 13,418 літрами води після чого

інокулятор ставиться в режим стерилізації за наступних умов 131 ℃ протягом 40 хв 0,15 МПа.

ДР 6.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в ферментері об'ємом 300 л

ДР 6.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних лабораторних вагах (ДЗ-30) зважують наважки термолабільних компонентів, а саме глюкози 6830,5 г та дріжджового екстракту 1392,3 г. Після чого за допомогою лічильника в реактор стерилізатор (Р-31) об'ємом 20 л подають 12,42 л води водопровідної та нагрівають водо за допомогою подачі глухої пари в сорочку апарата до 70℃ після чого запускають мішалку на рівень 50 об/хв та подають наважки очікуючи їх повного розчинення, після розчинення наважок компонентів реактор ставиться в режим стерилізації за наступних умов 112 ℃ протягом 40 хв 0,05 МПа.

ДР 6.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На лабораторних вагах необхідно зважити наважки $(NH_4)_2SO_4$ 213 г, $MgSO_4$ 16,8 г та $CaCI_2 \cdot 2H_2O$ 9,8 г після чого за допомогою мірного циліндру в мірний стакан подають 750 мл води дистильованої та додають наважки при перемішуванні за допомогою магнітної мішалки, після повного змішування компонентів розчин переливають у мірний циліндр об'ємом 1 л та доводять до об'єму 1000 мл. Після чого створений розчин наливають в колбу об'ємом 2 л та подають в ферментер (ФР-29) з попередньо набраними 134 л води водопровідної після чого інокулятор ставиться в режим стерилізації за наступних умов 131 ℃ протягом 40 хв 0,15 МПа.

ТП 7. Підготовка посівного матеріалу C. acetobutylicum

ТП 7.1. Підтримання музейної культури

Культуру *Clostridium acetobutylicum ATCC 824* зберігають в холодильній установці при температурі 2-4 °С на скошеному агаризованому 5% розчині гідролізованого кукурудзяного борошна. Культуру необхідно пересівати через кожні 2-3 місяці, оскільки є високий ризик висихання середовища та втрати культури.

Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних, анаеробних умовах в спеціальних боксах.

ТП 7.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру в анаеробній камері з вбудованими рукавицями «855-Series Anaerobic Chamber Glove Box» методом виснажувального штриха пересівають у чашку Петрі з агаризованим 5% розчином гідролізованого кукурудзяного борошна для одержання ізольованих колоній. Культивують у термостаті за температури 35-37ºС протягом 36 год.

ТП 7.3. Вирощування культури на скошених агаризованих середовищах

Одержані ізольовані колонії (від ТП 7.2) в анаеробних умовах пересівають петлею у пробірки з аналогічним поживним середовищем. Культивують у термостаті за температури 37 ºС протягом 36 год.

ТП 7.4. Вирощування культури в колбах

В асептичних умовах у стерильному боксі в колбу з композицією А (від ДР 5.1) і розливають у 2 колби об’ємом 750 мл по 121 мл середовища.

У пробірку з робочою культурою *Clostridium acetobutylicum ATCC* 824 (від ТП 7.3) вносять 10 мл фізіологічного розчину або стерилізованої водопровідної води, суспендують клітини, піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію об’ємом 10 мл, одержану з однієї пробірки. Після засіву щільно закривають резиновим корком, потім ставлять у безкисневий термостат за температури 37 ºС протягом та інкубують протягом 36 год.

ТП 7.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 3 л

В інокуляторі об'ємом 3 л (ІН-14) міститься 2,178 л композиції А (від ДР 5.2). Далі вносять 6% розчин HCI або NaOH (від ДР 3) до досягнення pH 5. Після чого протягом 10 хв під надлишковим тиском через барботер реактора подають азот задля витіснення розчиненого кисню з середовища. Після 10 хв прокачування стерильного очищеного азоту через барботер інокулятора (від ДР 1.2) подають посівний матеріал (від ТП 7.4), попередньо злитий з колб у ємність для стерильної передачі з анаеробними умовами. Культивування здійснюють при температурі 37ºС упродовж 36 год при працюючий мішалці на рівні 50 об/хв, та продуванні чистим азотом на рівні 3 л азоту на 1 літр середовища на год. Протягом культивування пробу відбирають лише 1 раз на 10 год, для контролю чистоти культури.

ТП 7.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

В реакторі об'ємом 50 л (Р-16) відкриваються комунікації на передачу насосом (Н-17) 19,8 л композиції А (від ДР 5.3) подають в інокулятор (ІН-18). Далі вносять 6% розчин NaOH або HCI (від ДР 3) до досягнення pH 5. Після чого протягом 10 хв під надлишковим тиском через барботер реактора подають азот задля витіснення розчиненого кисню з середовища. Після 10 хв прокачування азоту (від ДР 1.2) подають посівний матеріал (від ТП 7.5), через трубу перетискування. Культивування здійснюють при температурі 37ºС упродовж 20 год при працюючий мішалці на рівні 50 об/хв, та продуванні чистим азотом на рівні 3 л азоту на 1 літр середовища на год. Проби відбираються кожні 5 год для дослідження динаміку розвитку культури та аналізу чистоти культури.

ТП 7.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 250 л

Зі збірника-стерилізатора (Р-20) де знаходиться простерилізована композиція А (від ДР 5.4) через передачу насосом (Н-21) композиція переливається в попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 250 л (ІН-22). Далі вносять 6% розчин NaOH або HCI (від ДР 3) до досягнення pH 5. Після чого протягом 10 хв під надлишковим тиском через барботер реактора подають азот задля витіснення розчиненого кисню з середовища. Після 10 хв прокачування азоту (від ДР 1.2) подають посівний матеріал (від ТП 7.6), через трубу перетискування. Культивування здійснюють при температурі 37ºС упродовж 20 год при працюючий мішалці на рівні 50 об/хв, та продуванні чистим азотом на рівні 3 л азоту на 1 літр середовища на год. Проби відбираються кожні 5 год для дослідження динаміку розвитку культури та аналізу чистоти культури.

ТП 7.8. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 2500 л

Зі збірника-стерилізатора (Р-24) де знаходиться простерилізована композиція А (від ДР 5.5) за допомогою перистальтичного насосу (Н-25) композиція перекачується в попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 2500 л (ІН-26). Далі вносять 6% розчин NaOH або HCI (від ДР 3) до досягнення pH 5. Після чого протягом 10 хв під надлишковим тиском через барботер реактора подають азот (від ДР 1.2.) задля витіснення розчиненого кисню з середовища. Після 10 хв прокачування азоту

подають посівний матеріал (від ТП 7.7), через трубу перетискування. Культивування здійснюють при температурі 37ºС упродовж 20 год при працюючий мішалці на рівні 50 об/хв, та продуванні чистим азотом на рівні 3 л азоту на 1 літр середовища на год. Проби відбираються кожні 5 год для дослідження динаміку розвитку культури та аналізу чистоти культури.

ТП 8. Підготовка посівного матеріалу S. cerevisiae

ТП 8.1. Підтримання музейної культури

Культуру *S. cerevisiae* зберігають в холодильній установці при температурі 2-4 °С на скошеному агаризованому YPD агарі. Культуру необхідно пересівати через кожні 2-3 місяці, оскільки є високий ризик висихання середовища та втрати культури**.**

Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах в спеціальних боксах.

ТП 8.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру в асептичному боксі методом виснажувального штриха пересівають у чашку Петрі з YPD агаром для одержання ізольованих колоній. Культивують у термостаті за температури 30ºС протягом 36 год.

ТП 8.3. Вирощування культури на скошених агаризованих середовищах

Одержані ізольовані колонії від ТП 8.2 пересівають петлею у пробірки з аналогічним поживним середовищем. Культивують у термостаті за температури 30 ºС протягом 24 год.

ТП 8.4. Вирощування культури в колбах

В асептичних умовах у стерильному боксі в колбу з композицією А (від ДР 6.1.1) додають композицію Б (від ДР 6.1.2) і розливають у 18 колб об’ємом 750 мл по 111 мл середовища.

У пробірку з робочою культурою *S. cerevisiae* (від ТП 8.3) вносять 10 мл фізіологічного розчину або стерилізованої водопровідної води, суспендують клітини, піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію об’ємом 10 мл, одержану з однієї пробірки. Після засіву щільно закривають

резиновим корком, потім ставлять у безкисневий термостат за температури 30 ºС протягом та інкубують протягом 24 год.

ТП 8.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

В інокуляторі об'ємом 30 л (ІН-28) з композицією А (від ДР 6.2.1) та композицією Б (від ДР 6.2.2). Далі вносять 6% розчин NaOH (від ДР 3.1.2) до досягнення pH 6, після чого через посівний бачок подають посівний матеріал (від ТП 8.4), попередньо злитий з колб у одну стерильну колбу об'ємом 2 л. Культивування здійснюють при температурі 30ºС упродовж 24 год при працюючий мішалці на рівні 240 об/хв. Проби на концентрацію біомаси відбирають кожні 3 год.

ТП 8.6. Вирощування культури *S. cerevisiae* в ферментері об'ємом 300 л

В ферментері об'ємом 300 л (ФР-27) з композицією А (від ДР 6.3.1) та композиції Б (від ДР 6.3.2). Далі вносять 6% розчин NaOH (від ДР 3.1.2) до досягнення pH 6, після чого через трубу перетискування подають посівний матеріал (від ТП 8.5). Культивування здійснюють при температурі 30ºС упродовж орієнтовно 24 год при працюючий мішалці на рівні 240 об/хв. Проби на концентрацію біомаси та концентрації глюкози відбирають кожні 2 год, культивують до досягнення сухої біомаси на рівні 20 г/л.

ТП 9 Виробничий біосинтез.

ТП 9.1. *Виробничий біосинтез у ферментері 20 м^3*

У ферментер (ФР-40) об'ємом 20 м^3, в якому міститься 13 311 л композиції А (від ДР 5.6) вносять 6% розчин NaOH або HCl (від ДР 3) до досягнення pH 5. Після чого протягом 10 хв під надлишковим тиском через барботер реактора подають азот задля витіснення розчиненого кисню з середовища. Після 10 хв прокачування азоту (від ДР 1.2) подають посівний матеріал (від ТП 7.8), через трубу перетискування. На 30 годину культивування за допомогою труби перетискування подають культуру дріжджів (від ДР 8.6) та за допомогою перистальтичного насосу (Н-44) вносять 794,5 л підживлюючого розчину ацетату з реактора (Р-43). На 40 годину культивування шляхом перекачування перистальтичним насосом (Н-44) подають 397,25 л підживлюючого розчину ацетату. Та на 45 годину культивування шляхом перекачування перистальтичним насосом (Н-44) подають 397,25 л підживлюючого

розчину ацетату. Культивування здійснюють при температурі 37ºС упродовж орієнтовно 65 год, культивування завершують по досягненню концентрації ацетону в середовищі на рівні 8,56 грам на літр параметри перемішування та продуванні азотом наступні при працюючий мішалці на рівні 50 об/хв, та продуванні чистим азотом на рівні 3 л азоту на 1 літр середовища на год. Проби на концентрацію ацетату відбирають одразу після його додавання та змішування, проби на концентрацію ацетону відбирають після 30 год культивування кожні 3 год, проби на концентрацію глюкози та амінного азоту відбирають кожні 4 год до 30 год культивування (на 30 год орієнтовна концентрація глюкози має бути між 0-5 г/л).

РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ АЦЕТОНУ

Загалом існує широкий спектр методів виділення та очищення ацетону з культуральної рідиини через певні його фізико-хімічні особливості, а саме високу полярність та летючість, що дозволяє використовувати методики, як рідинної так і дистиляційної екстракції.

Згідно наукових джерел останніх років, відомо використання наступних методик виділення ацетону:

Наразі широкого розповсюдження набувають технології іммобілізації клітин на нерухомому носії, що представляє собою поживний субстрат, що виступає поживним середовище для бактерій. Бактерії перетворюючи субстрат, наприклад глюкозу, в продукти АБЕ бродіння, та виділяють його в навколишній розчин, після чого розчин змішується з екстрактивними речовинами олеїлом та деконолом у співвідношенні до 4:1. Така система була запропонована авторами Sandip B. Bankar a,b, Shrikant A. Survase a, [85] мембранна технологія дозволила отримувати продукти АБЕ бродіння в умовах безперервної ферментації з продуктивністю 2.5 г/л продуктів АБЕ бродіння. Але ця система є несумісною зі звичайним періодичним культивуванням, тому реалізація не є можливою в рамках цього курсового проєктування.

Також в літературі широко висвітлюються можливості рідинної екстракції ацетону, зокрема автори [86]. За допомогою комп'ютерного моделювання виявили, що новий розчинник, а саме триметилбензол виявляє більшу ефективність в екстракції, а саме у порівнянні з олеїлом та іншими малорозчинними багатоатомними спиртами, що значно зменшило собівартість екстракції у 2-3 рази у порівнянні з класичними методиками.

Автори в статті [87]. порівняли 2 підходи до екстракції ацетону з культуральної рідини, а саме:

Екстракція в процесі Реактивної Дистиляції (RD):

Використовує естери (переважно бутилбутират) як екстракційний розчинник.

Ключова особливість: ці естери виробляються безпосередньо в самому процесі шляхом реакції проміжних кислот (оцтової, масляної) та спиртів (етанолу, бутанолу), що утворюються під час ферментації. Ця реакція відбувається у спеціальній колоні реактивної дистиляції.

Зазвичай включає два етапи екстракції: попередню (для вилучення компонентів для виробництва естерів) та основну (для вилучення АВЕ за допомогою вироблених естерів).

Подвійна Екстракція (DE):

Використовує два різні зовнішні розчинники у двох послідовних етапах екстракції.

Перший етап: застосовується високоефективний, але потенційно токсичний для мікроорганізмів розчинник (у статті - 2-метил-1-гексанол) для максимального вилучення АВЕ з культуральної рідини.

Другий етап: використовується інший розчинник (у статті - циклопентан) спеціально для того, щоб видалити залишки першого (токсичного) розчинника з культуральної рідини перед її поверненням до ферментера. Це забезпечує біосумісність процесу.

Як висновок авторами було зазначено, що дана технологія потребує 4.97 кДж/кг отриманого субстрату, що є втричі менше ніж при використанні класичних стратегії.

Автори дослідження [86] пропонують ефективну енергозберігаючу систему з використанням нового розчинника мезитилену та широкою системою рециркуляції потоків з різних стації, що дозволяє суттєво знизити енерговитрати на виробництво, тому для цієї курсової роботи було обрано саме метод з цієї статті.

Виділення ацетону з культуральної рідини

Як вже було згадано для виділення ацетону та загалом продуктів АБЕ бродіння з культуральної рідини існує широкий спектр методик, в рамках цього курсового проєкту пропонується використовувати методику рідинної екстракції за допомогою 1,3,5-триметилбензолу як екстрагента.[86]

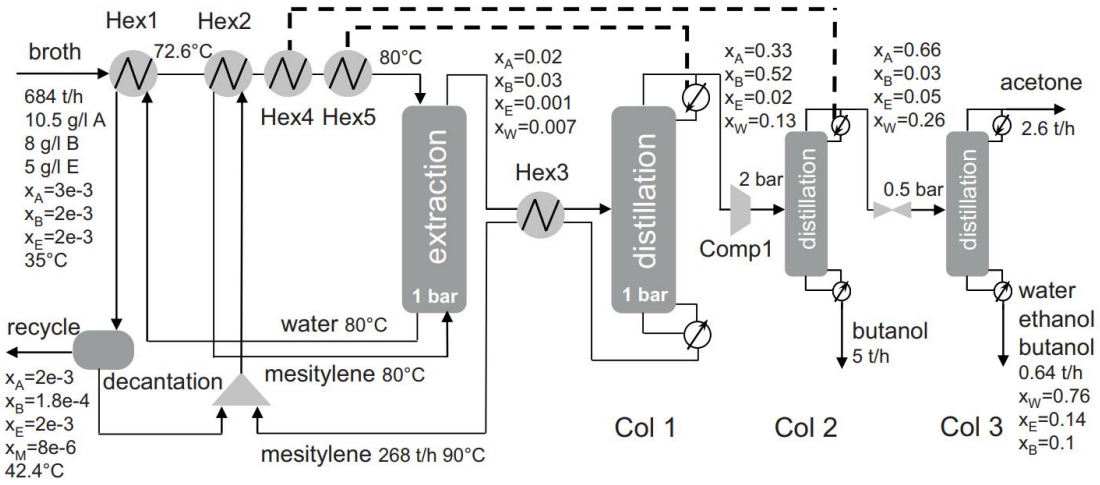


Рис 8.1. Запропонована схема в наукових джерелах схема виділення ацетону та продуктів АБЕ бродіння з культуральної рідини [24]

1) **Культуральна рідина сепарується** від біомаси за допомогою сепаратора, важливо, щоб під час виділення ацетону в систему поступала тільки рідка фаза.

2) Супернатант КР подається з температурою 35℃ до 4 теплообмінників рекуператорів. Перший та другий теплообмінники рекуператори (Hex1, Hex2) нагрівають супернатант КР до 72.6℃ завдяки нагрітій оборотній воді з етапу екстракції. В теплообмінниках 4-5 (Hex4, Hex5), супернатант КР доводиться до температури 80℃ завдяки горячому конденсату з етапу дистиляції.

3) **Екстракційна колонка (екстракція)**: попередньо нагрітий бульйон при 80℃ і розчинник, мезитилен (1,3,5 триметилбензол), при 80℃. Після цього компоненти подаються протитечією в екстракційну колону. Тут компоненти АБЕ вибірково переносяться з фази водного бульйону в фазу органічного мезитилену. Колонка працює при тиску 1 бар.

4) **Потік екстракту**: потік екстракту залишає верхню частину екстракційної колони, що складається в основному з мезитилену з екстрагованим АВЕ і невеликою кількістю води. Потім цей потік направляють на подальше розділення шляхом перегонки.

5) **Потік рафінату**: потік рафінату виходить із нижньої частини екстракційної колони. Це водна фаза (вода) зі значно зниженою концентрацією АБЕ.

6) **Рекуперація тепла рафінату та декантація**: гарячий потік рафінату з екстракційної колони (80°C) проходить через теплообмінники Hex1 і Hex2, де передає тепло бульйону, що надходить. Після охолодження до 42,4 °C потік рафінату надходить у декантер. Через низьку розчинність мезитилену у воді при цій нижчій температурі будь-який розчинений мезитилен відокремлюється як органічна фаза. Водна фаза з декантатора, повертається назад у реактор збірник води. Відокремлений мезитілен.

7) **Дистиляційна колона 1 (Колонка 1):** потік екстракту з екстракційної колони подається в першу дистиляційну колону (Колонка 1). Ця колонка працює при тиску 1 бар. Його основною функцією є відокремлення компонентів АВЕ з нижчою температурою кипіння та води від мезитиленового розчинника з вищою температурою кипіння.

8) **Верхній потік (дистилят):** Верхній потік (дистилят) з колони 1 є сумішшю АВЕ та води. Потім цей потік направляють у наступні дистиляційні колони для подальшого очищення компонентів АБЕ. Тепло від конденсатора Col 1 використовується для попереднього нагрівання бульйону, що надходить у Hex4.

9) **Нижній потік (рециркуляція мезитилену):** нижній потік колони 1 - це головним чином перероблений розчинник мезитилену (268 т/год при 90°C) Цей гарячий потік використовується для інтеграції тепла в Hex3 (нагрівання екстракту перед колонкою 1) перед охолодженням і рециркуляцією назад у екстракційну колону.

10) **Дистиляційна колона 2 (Col 2)**: Потік верхнього погону з Col 1 подається в другу дистиляційну колону (Col 2). Ця колона працює при більш високому тиску 2 бар. Цей підвищений тиск зміщує азеотропні композиції, полегшуючи відділення ацетону.

11) **Верхній потік (ацетон):** Нижній потік з колонки 2 – це в основному чистий бутанол (5 т/год) з високою концентрацією Тепло від конденсатора Col 2 використовується для попереднього нагрівання бульйону, що надходить у Hex5.

12) **Дистиляційна колона 3 (Колонка 3)**: Верхній потік з Колони 2 подається в третю дистиляційну колону (Колонка 3). Ця колона працює при нижчому тиску 0,5 бар. Таке коливання тиску допомагає відокремити ацетон та залишок води/етанолу, який дистилюється з швидкістю 2,6 т/год

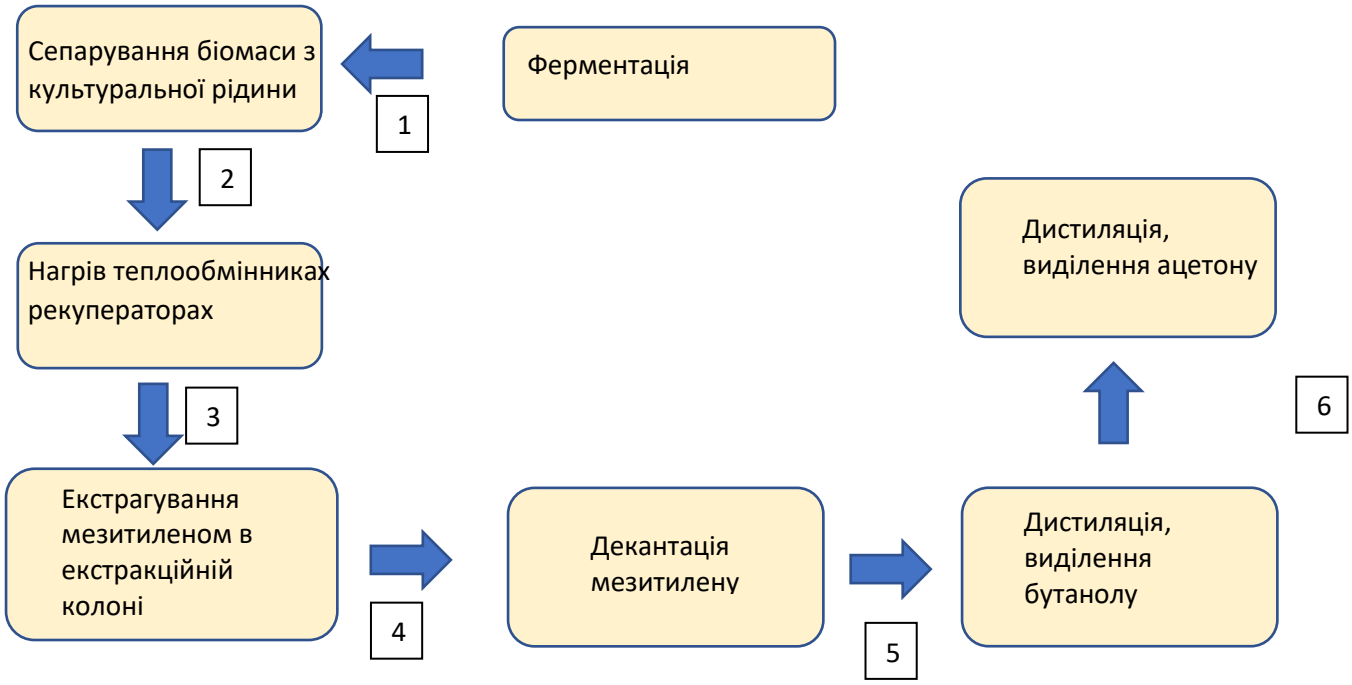


Рис. 8.2. Умовна схема виділення та очищення ацетону

Параметри процесів

1) Культуральна ріди сепарується при кімнатній температурі при 5000 об/хв з продуктивністю до 10000 л/год

2) Нагрів відбувається в 3 теплообмінниках рекуператорах, в першому температура доводиться до 72,6°С, після до 80°С в 3-х наступних.

3) Екстрагування вібувається в екстракційній колоні рециркуляцією мизетелену нагрітому на 80°С при тиску 1 бар

4) Розчин ацетону та мезителену нагрівається до 90°С та подається в 1 дестиляційну колону яка працює при тиску 1 бар, після випарювання розчинників мезитилен рециркулюється

5) В наступній дистиляційній колоні що працює при тиску 2 бар поток ацетону, бутанолу, етанолу з температурою 90°С ацетон, бутанол та деяка кількість

води випаровується в наступну колону, а бутанол знаходящись в рідкій фазі виводиться із системи

6) В наступній колоні при температурі 90°С та тиску 0,5 бар ацетон дистилюється та виводиться із системи, залишки розчинників та вода йдуть на систему водоочистки

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Методики мікробіологічного контролю стерильності поживного середовища

Методика контролю стерильності стерилізованого поживного середовища:

Методика контролю стерильності поживного середовища передбачає собою прямий висів на селективні поживні середовища, а саме МПА для бактерій, Сусло-агар для грибів та дріжджів та рідке тіогліколятне середовище для анаеробних організмів. Методика є універсальною, та використовується як для аналізу стерильності поживного середовищу *Clostridium acetobutylicum* так і для *Saccharomyces cerevisie*

Метод прямого висіву на чашки Петрі:

1) Перед визначенням стерильності самого поживного середовища рекомендується розлити поживне середовище для росту бактерій (МПА) та середовище для росту грибів (Сусло-агар) в чашки Петрі, та на одну з кожного типу середовища висіяти мікроорганізми: *Bacillus subtilis* на МПА та *Candida ablicans* на Сусло-агар у концентрації КУО не більше 100 на мл, щоб перевірити здатність поживних середовищ до підтримку росту мікроорганізмів.

2) Після того як було підтверджено, що середовища придатні до культивування грибів та дріжджів, то 1-3 мл асептично відібраного поживного середовища на чашку Петрі з МПА та пробірку з Тіогліколятним середовищем, та стільки ж на чашку з Сусло агаром. Інокуляція має проводитись в строго асептичних умовах.

3) Після інокулювання чашок Петрі їх необхідно інкубувати впродовж не більше 30 годин у наступних умовах: МПА 37°С та Сусло агар 30°С. Необхідно щонайменше кожні 8 годин візуально перевіряти чашки на наявність утворених колоній.

4) Якщо впродовж 30 годин жодна колонія не виросла в чашках Петрі, то поживне середовище слід вважати стерильним. Якщо умови стерилізації не змінюються, то час інкубації середовищ можна скорочувати до 20 годин.

Як експресс метод для прийняття рішення продовження технологінчого процесу Після стерилізації середовища, 0.1 мл середовища аналізується на наявність живої мікробіоти за допомогою світлової мікроскопії при 900-1000х збільшенні.

9.2 Мікробіологічний контроль чистоти посівного матеріалу

Clostridium acetobutylicum ATCC 824 є анаеробною бактерією, що певною мірою ускладнює культивування цього виду бактерій на чашках Петрі в звичайних умовах, тому для їх культивування та для оцінки чистоти культури варто застосовувати анаеробні шафи з атмосферою з інертного газу [88].

Аналіз чистоти посівного матеріалу буде проведений методикою прямого посіву інокуляту на поживні середовища.

Як відомо з літературних джерел [89], бактерії виду *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ростуть на МПА, тому задля аналізу будуть використані 2 чашки Петрі, одна з МПА, а друга с сусло-агаром

Стерильно та анаеробно відібрану пробу інокуляту поміщають в бокс з інертним газом, де 1 мл інокуляту висівають на середовище МПА та середовище Сусло-агар перше інкубують в атмосфері інертного газу, а друге просто в термостаті. Культивують до появи виражених колоній при температурі 30°С для сусло агару та 37°С для МПА.

На середовищі МПА колонії *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 мають мати наступний вигляд від 2—5 мм в діаметрі, круглі, підняті з цілим краєм, від сірого до сірувато-білого кольору, напівпрозорі, глянцеві [89].

Визначення мікробіологічної чистоти посівного матеріалу

Мікроскопіювання має бути проведено на світловому мікроскопі, попередньо клітини мають бути пофарбовані за грамом, що дозволить диференціювати грам негативні клостридії від інших грампозитивних анаеробних організмів

Морфологія клітин *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824: показано, що вегетативні клітини мають форму прямих коротких або довгих паличок із

закругленими кінцями, середній розмір 0,5-0,9 до 1,5-6 мкм, розміщені поодиноко або утворюють пари, грампозитивна, рухлива. [90]

Підсумовуючи можна сказати, що наявність будь-яких грампозитивних бактерій або еукариотичних клітин може означати забруднення посівного матеріалу сторонньою мікрофлорою.

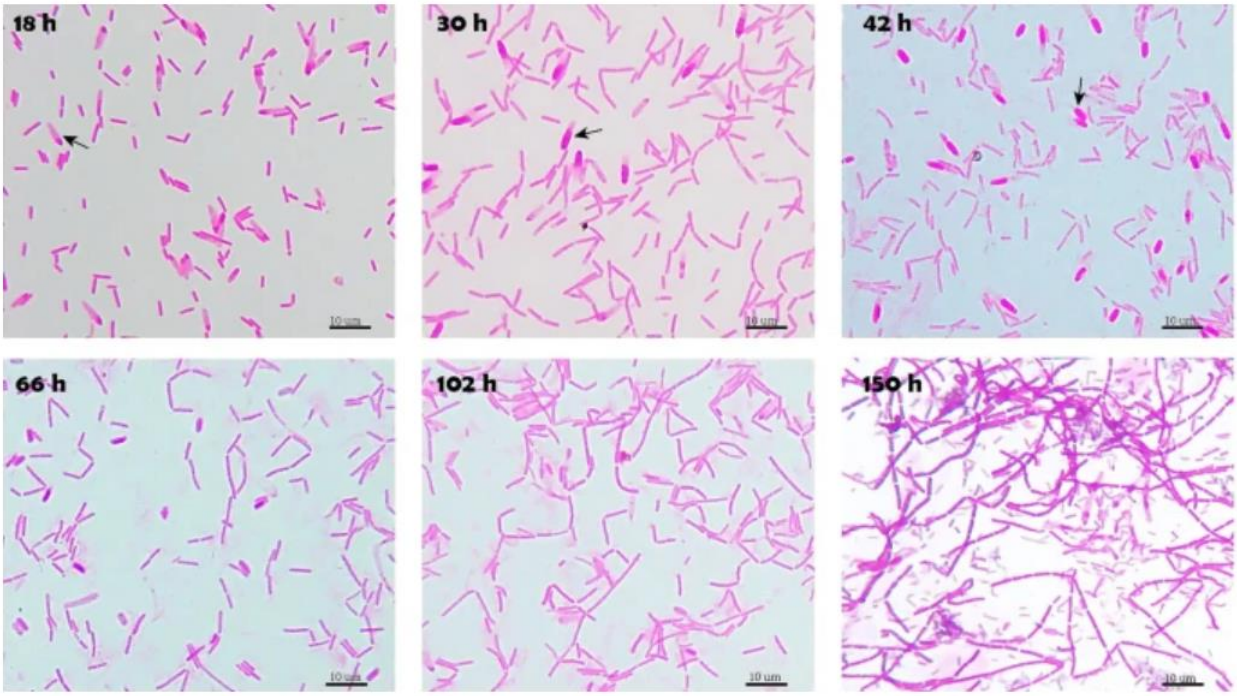


Рис. 9.1. Морфологія бактерій виду *Clostridium acetobytilicum* в залежності від періоду культивування

9.2.1 Методика визначення чистоти посівного матеріалу для культури *S. cerevisie*

Методика перевірки чистоти культури S. cerevisie буде також використано 2 типових поживних середовища, а саме Сусло-агар для дріжджів та грибів та МПА для бактерії. Як відомо дріжджі здатні швидко рости на Сусло-агарі і вже протягом 15-24 год можна провести первинний морфологічний аналіз колоній:

Колір і блиск. Переважно кремово-білі або білі, гладенькі, блискучі колонії без пігменту [91].

Форма й край. Круглі, з рівним краєм; під час швидкого росту піднімаються у невисокий купол , іноді стають майже плоскими після 72 год.

Розмір. На Сусло-агарі при 30 °C за 24 год досягають ≈ 1–3 мм у діаметрі; через 2–3 доби окремі штами наростають до 4–5 мм.

Текстура. Зволожені, кремові, інколи слизуваті;

Морфологічний аналіз клітин проводять шляхом аналізу 0,1 мл культуральної рідини під світловим мікроскопом. *S. cerevisie* має наступні клітинні морфологічні ознаки.

Форма: Сферична чи овоїдна; поділ шляхом мульти-латерального брунькування (кілька рубців на материнській клітині)

Розмір: 5–10 μм у діаметрі; середній розмір для *S. cerevisiae* — 7,5 × 5,5 μм

S. cerevisiae легко впізнати за маленькими, гладкими кремовими колоніями та овальними клітинами 5–10 μм із мульти-латеральним брунькуванням..

9.3 Методика визначення концентрації цільового продукту

Концентрацію ацетону визначали за допомогою газового хроматографу Agilent 7890.

Пробопідготовка: Перед аналізом стерильно відібрану пробу необхідно про центрифугувати при 13000 об/хв, температурі 4°C протягом 3 хв. Виділений фугат використовують для подальшого аналізу.[92]

Характеристика хроматографічного аналізу:

Газовий хроматограф обладнаним капілярною колонкою HP-INNOWAX з внутрішнім діаметром 0,25 мм, довжиною 30 мм, покритий поліетиленгліколем (товщина плівки 0,25 мкм).

Газом-носій: азот при швидкості потоку 2 мл/хв.

Об’єм ін’єкції становив 1 мкл.

Температура інжектора становила 180°C із співвідношенням розподілу 90:1, а температура полум’яно-іонізаційного детектора становила 220°C.

Температуру колонки програмували наступним чином: спочатку колонку витримували при 70°C протягом 0,5 хв, потім підвищували до 190°C при 20°C/хв і витримували протягом 4 хв.

Перелік необхідних матеріалів та реактивів:

- Ацетон

- Дистильована вода

- Ізобутанол

Умови проведення визначення: базовий розчин ацетону приготовлений в концентрації 60 г/л у дистильованій воді. Для побудови калібрувальних кривих приготували розчин аналіту з ізобутанолом як внутрішнім стандартом (IS; 6 г/л). Хроматографічні дані записували та інтегрували за допомогою програмного забезпечення Agilent Chemstation. Увівши зразок до ГХ він спочатку пройшов газифікацію у вкладиші інжектороного порту, а потім потрапив у капілярну колонку з коефіцієнтом розподілу 90:1. Фактичний об'єм ін'єкції становив 0,011 мкл, тому не було пошкодження колонки [93,94].

Обладнання для проведення роботи:

Технічні характеристики хроматографа Agilent Chemstation:

- Діапазон робочої температури: от +4 ...+450 °С.
- Крок температури: 0,1 °С.
- Максимальна швидкість нагріву: 120 °С/мин
- Розміри: 490×580×510 мм
- Вага: 49 кг
- Робоча температура навколишнього середовища: від 15 °С до 35 °С
- Робоча вологість навколишнього середовища: від 5% до 95% (без конденсації).

Концентрація ацетону в культуральному середовищі була визначена шляхом порівняння площ піків розчину порівняння та прощі піку культуральної рідини за калібрувальною кривою.

9.4 Концентрація джерела вуглецю

Джерело вуглецю – глюкоза, що міститься в гідролізованому кукурудзяному борошні. Глюкозу проаналізовано за допомогою біосенсорного аналізатора SBA-40C [95].

Принцип методу біосенсорного аналізатора заснований на іммобілізованому ферментному сенсорі. Він включав у себе реакційну комірку, оснащену двома електродами з перекисом водню. Поверхня електродів була покрита іммобілізованою мембраною глюкозооксидази.

Глюкоза у ферментаційному бульйоні контактувала з оксидазною мембраною і утворювався перекис водню (H_2O_2) на мембрані. Кількість H_2O_2, накопиченого на електроді, був лінійно пропорційний концентрації глюкози. На поверхні перекисно-водневого електрода відбувається перенесення електрона, що зумовлює перетворення електричного сигналу на цифровий за допомогою вбудованих електронних компонентів. Далі сигнал розраховували як глюкозу, яка відображалася на екрані.

З культуральної рідини видалили біомасу шляхом центрифугуванням за умов 13000 об/хв, температурі 4°С протягом 3 хв.

Покрокова інструкція з аналізу концентрації глюкози у культуральному середовищі за допомогою приладу SBA-40C:

1) Задля аналізу необхідно приготувати розчин стандарту з відомою концентрацією глюкози та центрифугат культурального середовища.

2) Потім підготовлені розчини розводяться у фосфатному буфері з pH 6,5 та додається глюкооксидаза з в концентрації 100 ОД/мл

3) 25 мкл розведенного зразка та стандарту ввести в кювети приладу, після 30 секунд аналізу отримати результат. [95].

9.5 Концентрація джерела азоту

Джерелом азоту в середовищі є білок кукурудзяного борошна, в якому представлений амінний азот, тому у якості методу визначення джерела азоту варто розглянути прості хімічні методи.

Підготовка зразка:

Пробу культуральної рідини центрифугують з наступних умов: 13000 об/хв, 5 хв, 4°С. Після чого відбирають фугат об’ємом 2 мл

2 мл фугату культурального середовище змішують з 18 мл води і 5 краплями 0,04%-го розчину бромтимолу синього. Суміш нейтралізують до pH 7,0, додаючи по краплинах 0,05 н розчин HCI, якщо суміш синя, або 0,05 н розчин NaOH, якщо вона жовтого кольору. Після доведення кислотності дослідного розчину до pH 7,0 (забарвлення розчину слабо-зелене) із мірного циліндра додають 2 мл формольної суміші і титрують з мікробюретки 0,05 н розчином NaOH до добре вираженого синьо-

фіолетового кольору розчину. Як контроль використовують аналогічний аналіз на дистольованій воді.

Різниця між кількістю лугу, що пішов на титрування дослідного та контрольного розчинів, помножена на 0,7, відповідає кількості міліграмів азоту амінокислот у 2 мл досліджуваної рідини (вважають, що кількість титрованих карбоксильних груп еквівалентна кількості зв'язаних формальдегідом змінних груп).

Реактиви

1. 0,04 % -й розчин бромтимолу синього (0,1 г бромтимолу синього розтирають у ступці з 3,2 мл 0,05 н розчину NaOH, переводять у мірну колбу на 250 мл і доводять до позначки дистильованою водою).

2. Формольна суміш (50 мл 40 %-го розчину формальдегіду змішують з 2 мл 0,5 %-го розчину фенолфталеїну і титрують 0,2 н розчином NaOH до слабо-рожевого кольору. Формалін з підвищеною кислотністю обробляють крейдою протягом доби. Формольну суміш готують кожні 2-3 дні).

3. 0,05 н розчин NaOH. [96].

9.6 Аналіз концентрації біомаси

Для аналізу кривої росту культури, яка необхідна для визначення фази росту мікроорганізмів (пересів відбувається на середині експоненційної фази росту) необхідно постійно визначати динаміку накопичення біомаси культурою, це твердження справедливе для обох культур в рамках ко-культивування. Найшвидшим методом для аналізу динаміки розвитку культури є колориметричний аналіз культуральної рідини за допомогою спектрофотометра видимого спектра на довжині хвилі 600 нм.

9.6.1 Послідовність аналізу динаміки росту культури для *C. acetobutylicum* [97]

Створення калібрувальної кривої

1. **Відбір:** Через гумовий накінечник пробовідбірника ферментера ввести стерильний шприц, продутий N_2; набрати 5 мл суспензії.

3. **Центрифугування:** 5 хв, 10 000 g, 4 °C; супернатант злити.

4. **Промивка:** Долити 1 мл дистильованої води, ресуспендувати, знову осадити;

5. **Розведення:** Ресуспендований осад розвести водою з розрахунку 1, 10, 20 г сухої біомаси на 1 л.

6. **Вимірювання:** Обнулити прилад водою; виміряти OD_{600}. Та сформувати калібрувальну криву по наступним точкам: 1,10, 20 г/л біомаси.

Аналіз культуральної рідини під час технологічного процесу

1. **Відбір:** Через гумовий септум ферментера ввести стерильний шприц, продутий N_2; набрати 5 мл суспензії.

2. **Вимірювання:** Обнулити прилад водою та виміряти поглинання на спектрофотометрі на довжині хвилі 600 нм, нанести отримане значення на калібрувальну криву та за допомогою рівняння кривої визначають орієнтовну концентрацію біомаси.

9.6.2 Послідовність аналізу динаміки росту культури для *S. cerevisie* [98]

Побудова калібрувальної кривої

1. **Відбір:** Піпеткою відбирають 5 мл культури з ферментера.

2. **Центрифугування:** 5 хв, 4000 g.

3. **Розведення:** Центрифуговану біомасу розводять у співвідношенні 1, 10 та 20 г/л.

4. **Вимір:** Обнуляють спектрофометр кюветою з дистильованою водою, після чого вимірюють оптичну густину кожного зразка будуючі калібрувальну криву на 3-м точкам 1 г/л, 10 г/л та 20 г/л

Аналіз культуральної рідини під час технологічного процесу

1. **Відбір:** З відібранної проби відбирають 5 мл

2.**Вимірювання:** Обнулити прилад водою та виміряти поглинання на спектрофотометрі на довжині хвилі 600 нм, нанести отримане значення на калібрувальну криву та за допомогою рівняння кривої визначають орієнтовну концентрацію біомаси.

Таблиця 9.1

Карта точок контролю технологічного процесу біосинтезу ацетону *Clostridium acetobutylicum* АТСС 824

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, ДР 1.1 Фільтрація в головному фільтрі	**Азот,** Перепад тиску, ступінь очищення	Манометр Аерозольний фотометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	1 раз на 90 днів	Перепад тиску згідно тех. Паспорта фільтрів Е=99%, d = 0,2 мкм
Кт, Км, ДР 1.2 Фільтрація в індивідуальних фільтрах	**Азот,** Перепад тиску, ступінь очищення, мікробіологічну чистоту	Манометр Аерозольний фотометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	1 раз на 90 днів	Перепад тиску згідно тех. Паспорта фільтрів *Е=99,9%,* d = 0,2 мкм Мікробіологічна чистота
Кт 2.2 Первинне очищення повітря	**Повітря на виході з фільтра грубого очищення**, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	Е= 80 %, тиск згідно паспорту
Кт *2.3 Стиснення повітря*	**Стиснене повітря**, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	Р=0,35-0,5 МПа t=120-250 °С;
Кт *2.4 Осушення та охолодження повітря*	**Охолоджене повітря**, температура, вологість	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря, після видалення зайвої вологи;	t= 25-30 °С; W= 60-70 %;
Кт *2.5 Стабілізація параметрів повітря*	**Повітря**, температура, вологість	Термометр технічний, психрометричний метод	Після нагрівання повітря	Т = 50 °С; W= 60 %;

Продовження табл. 9.1.

Кт *2.6* *Тонка фільтрація повітря*	**Очищене повітря**, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головному фільтрі	E= 99,9 %, d = 0,2 мкм, тиск згідно паспорту
Кт *2.7* *Фінальне очищення перед подачею у ферментаційну систему*	**Очищене повітря**, ступінь очищення, перепад тисків	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E= 99,997 %, d = 0,2 мкм, тиск згідно паспорту
Кт, Км, Кх *ДР 3.1* *Приготування та стерилізація 6%-розчину NaOH*	**6%-розчин NaOH** Тиск, температура концентрація, відсутність мікробіоти	Хімічний аналіз концентрації, манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, C_{NaOH}=6%
Км, Кх *ДР 3.2* *Приготування та стерилізація 6%-розчину HCI*	**6%-розчин HCI** концентрація, відсутність мікробіоти	Хімічний аналіз концентрації мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводиться перед початком змішування (контроль стерильної дист. води)	відсутність мікробіоти, C_{HCI}=6%
Кт, Км *ДР 4.1* *Приготування та стерилізація розчину ацетату для культивування C. acetobutylicum*	**Композиція Б** Тиск, температура, час, мікробіологічна чистота	термометр, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається постійно, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, τ = 40 хв, P = 0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт,, Кх, Км *ДР 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6* *Гідроліз та стерилізація композиції А*	**Композиція А** Тиск, температура, час, мікробіологічна чистота	термометр, годинник, pH метр	Температура та pH визначається постійно за допомогою електродів, мікробіологічний контроль після стерилізації	t_1 = 70 °C, τ_1 = 105 хв, pH = 6 (Альфа амілаза), pH = 5 (Глюкоамілаза), t = 112 °C, τ = 40 хв, P = 0,05 МПа, Мікробіологічна частота

Продовження табл. 9.1.

Кт, Км ДР 6.1.1, 6.2.1, 6.3.1 Приготування та стерилізація Композиції А	**Композиція А** Тиск, температура, час, мікробіологічна чистота	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,05МПа, t = 112 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 6.1.2, 6.2.2, 6.3.2 Приготування та стерилізація Композиції Б	**Композиція Б** Тиск, температура, час, мікробіологічна чистота	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,15МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км ТП 7.1 Підтримання музейної культури	**Колекційна культура *Clostridium acetobutylicum ATCC 824*** Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти.	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль мікроскопіювання	Мікробіологічний контроль проводять кожні 2-3 місяці	t = 2-4 °С, τ = 2-3 міс, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км ТП 7.2 Одержання робочої культури	**Робоча культура *Clostridium acetobutylicum ATCC 824*** Температура, тривалість вирощуваня, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник мікробіологічний контроль, мікроскопіювання	Мікробіологічний контроль МПА проводять після його стерилізації	t = 35-37 °С, τ = 36 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км ТП 7.3 Вирощування культури на скошених агаризованих середовищах	**Робоча культура *Clostridium acetobutylicum ATCC 824*** Температура, тривалість вирощуваня, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль мікроскопіювання	Температура постійна, мікробіологічний контроль	t = 37 °С, τ = 36 год, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 9.1.

Кт, Км, Кх ТП 7.4 Вирощування культури в колбах	**Посівний матеріал** Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термометр годинник, тахометр, мікробіологічний контроль, мікроскопіювання	Температура і швидкість обертання (автоматично), та мікроскопіювання (кожні 8 годин)	t = 37 °С, τ = 36 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх ТП 7.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 3 л	**Посівний матеріал** Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, тахометр, pH метр мікробіологічний контроль, мікроскопіювання	Температура, швидкість обертання, рівень pH (автоматично) мікроскопіювання (кожні 3 год),	t = 37 °С, τ = 36 год, pH = 5, n = 50 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх ТП 7.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л	**Посівний матеріал** Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, тахометр, pH метр мікробіологічний контроль, мікроскопіювання	Температура, швидкість обертання, рівень pH (автоматично) мікроскопіювання (кожні 3 год)	t = 37 °С, τ = 20 год, pH = 5, n = 50 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх ТП 7.7 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 300 л	**Посівний матеріал** Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, тахометр, pH метр мікробіологічний контроль, мікроскопіювання	Температура, швидкість обертання, рівень pH (автоматично) мікроскопіювання (кожні 3 год)	t = 37 °С, τ = 20 год, pH = 5, n = 50 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх ТП 7.8 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 2500 л	**Посівний матеріал** Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, тахометр, pH метр мікробіологічний контроль, мікроскопіювання	Температура, швидкість обертання, рівень pH (автоматично) мікроскопіювання (кожні 3 год)	t = 37 °С, τ = 20 год, pH = 5, n = 50 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 9.1.

Кт, Км ТП 8.1 Підтримання музейної культури	**Колекційна культура *S. cerevisiae*** Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти.	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль мікроскопіювання	Мікробіологічний контроль проводять кожні 2-3 місяці	t = 2-4 °С, τ = 2-3 міс, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км ТП 8.2 Одержання робочої культури	**Робоча культура *S. cerevisiae*** Температура, тривалість вирощуваня, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник мікробіологічний контроль, мікроскопіювання	Мікробіологічний контроль МПА проводять після його стерилізації	t = 30 °С, τ = 36 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км ТП 8.3 Вирощування культури на скошених агаризованих середовищах	**Робоча культура *S. cerevisiae*** Температура, тривалість вирощуваня, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль мікроскопіювання	Температура постійна, мікробіологічний контроль	t = 30 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх ТП 8.4 Вирощування культури в колбах	**Посівний матеріал** Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термометр годинник, тахометр, мікробіологічний контроль, мікроскопіювання	Температура і швидкість обертання (автоматично), та мікроскопіювання (кожні 8 годин)	t = 30 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх ТП 8.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л	**Посівний матеріал** Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, тахометр, pH метр мікробіологічний контроль, мікроскопіювання	Температура, швидкість обертання, рівень pH (автоматично) мікроскопіювання (кожні 3 год),	t = 30 °С, τ = 24 год, pH = 6, n = 240 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл. 9.1

Кт, Км, Кх ТП 8.6 Вирощування культури S. cerevisiae в ферментері об'ємом 300 л	**Посівний матеріал** Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, тахометр, pH метр мікробіологічний контроль, мікроскопіювання	Температура, Швидкість обертання, рівень pH (автоматично) мікроскопіювання (кожні 3 год),	t = 30 °C, τ = 24 год, pH = 6, n = 240 об/хв, $C_б$=20г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км ТП 9.1 Виробний біосинтез у ферментері об'ємом 20 м^3	**Культуральна рідина:** Температура, час, частота обертів мішалки, рівень pH, мікробіологічна чистота культури, концентрація ацетону	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, датчик pH, мікроскоп та газовий хроматограф, мікробіологічний контроль	Температура, швидкість обертання мішалки, рівень pH, (автоматично) Концентрація ацетону, джерел азотного та вуглецевого живлення та мікроскопіювання (кожні 6 годин)	t = 37 °C, τ = 65 год, n = 50 об/хв, pH = 5, Концентрація ацетону 8,56 г/л відсутність сторонньої мікробіоти, використано 85-90% джерел вуглецевого живлення

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Butanol production from lignocellulosic biomass: revisiting fermentation performance indicators with exploratory data analysis / C. Birgen et al. Biotechnology for Biofuels. 2019. Vol. 12, no. 1. URL: https://doi.org/10.1186/s13068-019-1508-6

2. Enhancing acetone biosynthesis and acetone–butanol–ethanol fermentation performance by co-culturing Clostridium acetobutylicum/Saccharomyces cerevisiae integrated with exogenous acetate addition / H. Luo et al. Bioresource Technology. 2016. Vol. 200. P. 111–120. URL: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.116

3. Ацетон. Довідник хімічних речовин. URL: https://vue.gov.ua/Ацетон

4. 99,9% чистоти ацетон Cas 67-64-1. Gnee Bio. -[Електронний ресурс].- https://ua.biolchina.com/organic-chemicals/99-9-purity-acetone-cas-67-64-1.html

5. Acetone. Australian Government. -[Електронний ресурс].- https://www.dcceew.gov.au/environment/protection/npi/substances/fact-sheets/acetone

6. ЛЕТКІ ОТРУТИ .-[Електронний ресурс].- https://www.uzhnu.edu.ua/uk/infocentre/get/23584

7. What is Acetone? - [Електронний ресурс].- https://byjus.com/chemistry/acetone/

8. Ацетон — ВУЕ.-[Електронний ресурс].- https://vue.gov.ua/Ацетон

9. Acetone CAS 67-64-1. Yuze.-[Електронний ресурс].- https://www.shyzchem.com/basic-chemicals/organic-chemicals/acetone-cas-67-64-1.html

10. (30 травня 2016). Використання ацетону (техніка безпеки). Маркетплейс UB.UA. -[Електронний ресурс].- https://analitic.ub.ua/24002-vikoristannya-acetonu-tehnika-bezpeki.html

11. What is Acetone and How is it Used as an Industrial Solvent? Maretek. -[Електронний ресурс].- https://maratekenvironmental.com/what-is-acetone-and-how-is-it-used-as-an-industrial-solvent/

12. ACETON technický. -[Електронний ресурс].- https://www.nhhk.cz/produkty/aceton-technicky-detail-35

13. Acetone Manufacturers in 2025. Metoree. .-[Електронний ресурс].- https://us.metoree.com/categories/6817/

14. Acetone Companies. .-[Електронний ресурс].-https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/acetone-market/companies

15. Köhler, K. A., Rühl, J., Blank, L. M., & Schmid, A. (2015). Integration of biocatalyst and process engineering for sustainable and efficient n-butanol production. Engineering in Life Sciences, 15(1), 4-19.

16. Ley, C., Elvers, B., Bellussi, G., & Bus, J. (2011). Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry.

17. Zhou, J., Zhang, H., Zhang, Y., Li, Y., & Ma, Y. (2012). Designing and creating a modularized synthetic pathway in cyanobacterium Synechocystis enables production of acetone from carbon dioxide. Metabolic engineering, 14(4), 394-400.

18. Wu, M., Wang, M., Liu, J., & Huo, H. (2007). Life-cycle assessment of corn-based butanol as a potential transportation fuel (No. ANL/ESD/07-10). Argonne National Lab.(ANL), Argonne, IL (United States).

19. Luo, H., Ge, L., Zhang, J., Ding, J., Chen, R., & Shi, Z. (2016). Enhancing acetone biosynthesis and acetone–butanol–ethanol fermentation performance by co-culturing Clostridium acetobutylicum/Saccharomyces cerevisiae integrated with exogenous acetate addition. Bioresource technology, 200, 111-120.

20. Ezeji, T., & Blaschek, H. P. (2008). Fermentation of dried distillers' grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic clostridia. Bioresource technology, 99(12), 5232-5242.

21. Shaheen, R., Shirley, M., & Jones, D. T. (2000). Comparative fermentation studies of industrial strains belonging to four species of solvent-producing clostridia. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2(1), 115-124.

22. ABIS ENCYCLOPEDIA- Електронний ресурс- https://tgw1916.net/Clostridium/acetobutylicum.html

23. Вікіпедія- Електронний ресурс- https://uk.wikipedia.org/wiki/Clostridium_acetobutylicum

24. Google patents- Електронний ресурс- https://patents.google.com/patent/RU2080382C1/ru

25. Інтегрована система таксономічної інформації- Електронний ресурс- https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=960726#null

26. Ub.Ua. (30 травня 2016) Використання ацетону (техніка безпеки).- [Електронний ресурс].- https://analitic.ub.ua/24002-vikoristannya-acetonu-tehnika-bezpeki.html

27. Торхim group. (26.05.2023). Які розчинники використовують в промисловості. -[Електронний ресурс].- https://tophim.com.ua/ua/iaki-rozchynnyky-vykorystovuiut-v-prom/

28. Державна служба статистики України, Вернер І. Є. (2023). Статистичний щорічник України за 2022 рік. -[Електронний ресурс].- https://stat.gov.ua/sites/default/files/2024-02/%D0%97%D0%B1%D1%96%D1%80%D0%BD%D0%B8%D0%BA%20%D0%A1%D1%82%D0%B0%D1%82%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%BD%D0%B8%D0%B9%20%D1%89%D0%BE%D1%80%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%B8%D0%BA%20%D0%A3%D0%BA%D1%80%D0%B0%D1%97%D0%BD%D0%B8%202022%20%D1%80%D1%96%D0%BA.pdf

29. Zebra. Про нас. -[Електронний ресурс].- https://www.zebra.ua/about-us/

30. Борошно кукурудзяне- [Електронний ресурс].- https://docs.google.com/presentation/d/1q5y8Bg4rCPXy_AKO0XIF-6ri7KLqB2qW/edit?usp=drive_link&ouid=106026382774531750216&rtpof=true&sd=true

31. Li, X., Li, Z., Zheng, J., Shi, Z., & Li, L. (2012). Yeast extract promotes phase shift of bio-butanol fermentation by Clostridium acetobutylicum ATCC824 using cassava as substrate. Bioresource Technology, 125, 43–51. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.056

32. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. https://www.kegg.jp/pathway/cac00010

33. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. https://www.kegg.jp/entry/C00149

34. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. https://www.kegg.jp/pathway/cac00220
35. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. https://www.kegg.jp/pathway/cac00650
36. Sk F. Journal Vol – 15 No -7, July 2020 Journal > Journal > Journal Vol – 15 No -7, July 2020 > Page 6 PERFORMANCE AND EMISSION CHARACTERISTICS OF GASOLINE-ETHANOL BLENDS ON PFI-SI ENGINE Authors: D.Vinay Kumar ,G.Samhita Priyadarsini,V.Jagadeesh Babu,Y.Sai Varun Teja, DOI NO: https://doi.org/10.26782/jmcms.2020.07.00051 admin July 26, 2020
37. Ezeji T., Qureshi N., Blaschek H. P. Production of acetone–butanol–ethanol (ABE) in a continuous flow bioreactor using degermed corn and Clostridium beijerinckii. Process Biochemistry. 2007. Vol. 42, no. 1. P. 34–39. URL: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.07.020
38. Mutschlechner, O., Swoboda, H., & Gapes, J. R. (2000). Continuous two-stage ABE-fermentation using Clostridium beijerinckii NRRL B 592 operating with a growth rate in the first stage vessel close to its maximal value. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 2(1), 101-105.
39. Ферментери-[Електронний ресурс]. - https://www.zeta.com/files/content/blog/Whitepaper/ZETA_White_Paper_Upscaling_Bioreactor.pdf
40. Данаклін лужний миючо-дезінфікуючий засіб [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://hlorka.ua/product/danaklin_universalnyy_5_l/?srsltid=AfmBOooQy814kbDfie1e1Vs9lC-4jStBcquYryHOGertUnzJZbGo3Kvy.
41. Інструкція із застосування дезінфікуючого засобу Surfanios Lemon Fresh [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/instruktsiya-po-primeneniyu-dezsredstva-surfanios-lemon-fresh/.
42. Інструкція із застосування дезінфікуючого засобу Суфрахлор [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://med-line.com.ua/ua/surfahlor-300-tablets.

43. Інструкція із застосування дезінфікуючого засобу Еконорм ДЕЗ[Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1197584676-ekonormdez-hlor.html.
44. Інструкція із застосування дезінфікуючого засобу Вітадез ЕН [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://hlorka.in.ua/ua/p1466489639-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-vitadez.html?srsltid=AfmBOoqSvY6CHhDlv2TQTvHNR95W2dsG0Kinhjx-yBvOeyrK7qrZv-RC .
45. Інструкція із застосування дезінфікуючого засобу Септодор форте [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://mdmgroup.com.ua/zasoby-dlya-dezinfekciyi-instrumentiv/zasib-dezinfekcijnyj-septodor-forte#MED010768 .
46. Інструкція із застосування дезінфікуючого засобу SeptPower [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://teplonositel.kiev.ua/shop/antiseptik-dlya-ruk-septpower-ridkij-5-l .
47. Інструкція із застосування дезінфікуючого засобу Бланідас 2000 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://lysoform.in.ua/zasib-dezinfikuiuchyi-blanidas-2000-ekspres-blanidas-2000-express-1000ml-z-dozuiuchym-prystroiem/.
48. Alfa-амілаза - [Електронний ресурс]- Доступно за адресою: https://market.enzim.biz/fermenti/alfa-amilaza
49. Alfa-амілаза - [Електронний ресурс]- Доступно за адресою: https://market.enzim.biz/fermenti/alfa-amilaza
50. Балон азотний 40 л –[Електронний ресурс]- https://lkv.com.ua/product/ballon-azotnyj-40l/
51. Кишеньковий мішок фільтр H10- [Електронний ресурс]- https://www.alibaba.com/product-detail/Pocket-Bag-Filter-for-HVAC-New_11000021965663.html
52. Повітрозабірник стіновий NavyFlex VLB100 - [Електронний ресурс]- https://aes.in.ua/uk/povitrozabirnik-stinovij-navyflex-vlb100/’
53. Фільтр грубої очистки - [Електронний ресурс]- https://aafasia.com/wp-content/uploads/2022/07/AmAir-300-GT_2022.pdf

54. Компресор для стиснення повітря - [Електронний ресурс]- https://pneumatic-service.com.ua/vintovye-kompressory_catalog/vintovye-kompressory-standartnye/vintovoy-promyshlennyy-kompressor-keshidi-ksd-10a/?utm_campaign=pneumatic-service.com.ua&utm_medium=pneumatic-service.com.ua&utm_source=pneumatic-service.com.ua&sku=888&gad_source=1&gad_campaignid=21290157499&gbraid=0AAAADklmKCWfoJMgoiIHTjm_STWXv9s&gclid=Cj0KCQjwuvrBBhDcARIsAKRrkje8n7p4hv6LIutOTbU9RKMtBolThjMwnpGYn5LpeE7H76ypYK2CkN0aAvLdEALw_wcB
55. Охолоджувач повітря Aerostar SWC 50-25/3R –[Електронний ресурс]- https://climatinvest.com/vodyanoj-vozduhoohladytel-aerostar-swc-50-253r?gad_source=1&gad_campaignid=22519976813&gbraid=0AAAAACdO5-4X6aP7_Rx77mQL31CJfMXf&gclid=Cj0KCQjwuvrBBhDcARIsAKRrkjcc6cGqAZzavDZyI4VUTHH7GBpJa6Fs2__iyMggaAGSEOT1JMXKdmMaAoEaEALw_wcB
56. Ресивер для стабілізації подачі повітря–[Електронний ресурс]- https://tusk.ua/product/resiver-vozdushnyij-lider-10-bar-900-l-rv90081801-dlya-kompressora/
57. Теплообмінник нагрівач–[Електронний ресурс]- https://ukrvent.ua/kalorifer-pnv211-202m_33?gad_source=1&gad_campaignid=22266028202&gbraid=0AAAAA9SS2A2rg-FnIV1OLOQrAtV-Z-nbA&gclid=Cj0KCQjwuvrBBhDcARIsAKRrkjdLDe_r-j71hYiA5TPzTZ-z80dhrTcAdhd7jlu7Z8iyUcbo7syZWOcaAgrMEALw_wcB
58. Ваговий дозатор –[Електронний ресурс]- https://horecaua.com.ua/ru/vahy-laboratorni-mwp-n-3000-cas/?gad_source=1&gad_campaignid=20741381187&gbraid=0AAAAAqceqdcZClI-zhfvS_Ji1qEC2fPfW&gclid=Cj0KCQjwuvrBBhDcARIsAKRrkjdNoXEm08_mZONZ7nWl8VsU2tqNeTjjZ5yHP7GSsS1ujU96dt5VEfsaAqeVEALw_wcB

59. Реактор-стерилізатор об’ємом 60літрів –[Електронний ресурс]- https://promvit.com.ua/reaktor-fermenter-rf-60/
60. Ваговий дозатор–[Електронний ресурс]- https://horecaua.com.ua/ru/vahy-torhovelni-nastilni-sw-10-cas-fasuvalni/?gad_source=1&gad_campaignid=20741381187&gbraid=0AAAAAqceqdcZClI-zhfvS_Ji1qEC2fPfW&gclid=Cj0KCQjwuvrBBhDcARIsAKRrkjcut9xIcoJVmsBehEjnSb92p83w-JbDa4zw17fQQLPIELZu5BICiZAaAsEIEALw_wcB
61. Реактор-збірник 100л –[Електронний ресурс]- https://promvit.com.ua/smesitel-ss-100-mobilnyj-dezinficiruyushhix-sredstv/
62. Інокулятор об’ємом 3 літри –[Електронний ресурс]- https://www.broadleyjames.com/product/3-liter-bioreactor-assembly-jacketed-cell-culture/
63. Реактор-змішувач стерилізатор об’єм 50 літрів–[Електронний ресурс]- https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-inekcionnyh-rastvorov-rs-50/
64. Перестальтичний насос–[Електронний ресурс]- https://www.wmfts.com/en-us/biopharm-products/watson-marlow-pumps/cased-pumps/500-series-cased-pump/
65. Інокулятор об’ємом 30 літрів–[Електронний ресурс]- https://infors-ht.com/getmedia/a5eae247-ed48-4982-ae53-fbab4cc830e0/Product-Data-Sheet-Techfors-S-3-en-GB-1
66. Реактор змішувач-стерилізатор об’єм 300 літрів –[Електронний ресурс]- https://fedequip.com/inventory/tanks-kettles/300-liter-precision-stainless-mixing-tank.html
67. Перистальтичний насос для перекачки комп. А в інокулятор 250 л –[Електронний ресурс]- https://www.wmfts.com/en/watson-marlow-pumps/cased-pumps/700-series-cased-pump/
68. China Make Bioreactor Stainless Steel Fermentation Tanks Wine 250L-[Електронний ресурс]- https://bailunbio.en.made-in-china.com/product/pOLaUuVZnors/China-Make-Bioreactor-Stainless-Steel-Fermentation-Tanks-Wine-250L.html

69. Ваговий дозатор -[Електронний ресурс]- https://sweda.com.ua/produktsiya/dozator-v-meshki-otkrytogo-tipa
70. Реактор-змішувач стерилізатор об'єм 2000 літрів -[Електронний ресурс]- https://www.aaronequipment.com/usedequipment/reactors/stainless-steel-500-999-gallon/lee-ind-2000l-dp-52566003
71. Перестальтичний насос–[Електронний ресурс]- https://www.castlepumps.com/pumps/pump/boyser-fmp-60-series-peristaltic-pump
72. Інокулятор об'ємом 2.5м^3–[Електронний ресурс]- https://www.foeth.com/en/reactors/stainless-steel-reactors/albi-alois-binderberger-2500-ltr-bioreactor-stainless-steel-reactor-404u1229
73. Фільтр індивідуальної очистки–[Електронний ресурс]- https://www.sartorius.com/download/457370/data-sartofluor-ga-lg-1000054588-e-ver2018-03-3--data.pdf
74. Ферментер для культивування дріжджів –[Електронний ресурс]- https://infors-ht.com/getmedia/965fc4cc-3c3c-4b2f-b3b8-e409a6a76542/Product-Data-Sheet-Techfors-2-en-GB-1
75. Реактор-стерилізатор для термолабільних компонентів для культивування дріжджів –[Електронний ресурс]- https://ruianglobal.en.made-in-china.com/product/DSFELIwvCrYT/China-Stainless-Steel-Mixing-Tank-for-Injection.html
76. Насос перистальтичний –[Електронний ресурс]- https://www.wmfts.com/en/watson-marlow-pumps/cased-pumps/500-series-cased-pump/
77. Реактор збірник об'ємом 16 м^3–[Електронний ресурс]- https://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php
78. Відцентровий насос–[Електронний ресурс]- https://turbonasos.com/ua/p1871871978-tsnsk-140-stal.html?source=merchant_center&gad_source=1&gad_campaignid=21712898071&gbraid=0AAAAAqVVYEmBPJj7wZ67yBY6sXdaXAb6d&gclid=Cj0KCQjwuvr

BBhDcARIsAKRrkjdIuRcHaEQnTOte6dIzhQKwQxk_MhuSvHJc0zxIHx1Ge8Hh1rnKMzMaAnhnEALw_wcB

79. Колонка швидкісного нагріву–[Електронний ресурс]- https://www.alibaba.com/product-detail/3000l-h-4000l-h-5000l-h_1600444995382.html
80. Витримувач –[Електронний ресурс]- https://agrovektor.com/physical_product/3562859-vitrimuvach-dlya pasterizaciynoi-ustanovki.html
81. Теплообмінник рекуператор –[Електронний ресурс]- https://opeks.ua/ua/plastinchastij-teploobminnik-thermaks-rta-gc-16/
82. Теплообмінник охолоджувач –[Електронний ресурс]- https://www.paskal.ua/ua/product/teploobmennik-whe-2010_612.html
83. Виробничий ферментер об'ємом 20 м^3 –[Електронний ресурс]- https://www.zeta.com/files/content/blog/Whitepaper/ZETA_White_Paper_Upscaling_Bioreactor.pdf
84. Фільтр індивідуальної очистки –[Електронний ресурс]- https://www.sartorius.com/download/457370/data-sartofluor-ga-lg-1000054588-e-ver2018-03-3--data.pdf
85. Bankar, S. B., Survase, S. A., Singhal, R. S., & Granström, T. (2012). Continuous two stage acetone–butanol–ethanol fermentation with integrated solvent removal using Clostridium acetobutylicum B 5313. Bioresource Technology, 106, 110-116.
86. Kraemer, K., Harwardt, A., Bronneberg, R., & Marquardt, W. (2011). Separation of butanol from acetone–butanol–ethanol fermentation by a hybrid extraction–distillation process. Computers & Chemical Engineering, 35(5), 949-963
87. Kurkijärvi, A. J., Melin, K., & Lehtonen, J. (2016). Comparison of reactive distillation and dual extraction processes for the separation of acetone, butanol, and ethanol from fermentation broth. Industrial & Engineering Chemistry Research, 55(7), 1952-1964

88. Bugno, A., Saes, D.P.S., Almodovar, A.A.B. et al. Performance Survey and Comparison Between Rapid Sterility Testing Method and Pharmacopoeia Sterility Test. J Pharm Innov 13, 27–35 (2018). https://doi.org/10.1007/s12247-017-9303-z
89. Berovic, M. (2005). Sterilisation in biotechnology. Biotechnology annual review, 11, 257-279
90. THERAPEUTIC GOODS ADMINISTRATION (AUSTRALIA). TGA Guidelines for Sterility Testing of Therapeutic Goods: Therapeutic Goods Administration. Therapeutic Goods Administration, 1998.
91. Saccharomyces cerevisiae–[Електронний ресурс]- adelaide.edu.audrfungus.org
92. Lin, X., Fan, J., Wen, Q., Li, R., Jin, X., Wu, J., ... & Ying, H. (2014). Optimization and validation of a GC–FID method for the determination of acetone-butanol-ethanol fermentation products. Journal of chromatographic science, 52(3), 264-270.
93. Humphreys JR, Debebe BJ, Diggle SP and Winzer K (2023) Clostridium beijerinckii strain degeneration is driven by the loss of Spo0A activity. Front. Microbiol. 13:1075609. doi: 10.3389/fmicb.2022.1075609
94. Identification of solventogenic bacteria Clostridium beijerinckii and Clostridium acetobutylicum isolated from natural sources / S. Skrotskyi et al. Scientific Works of National University of Food Technologies. 2019. Vol. 25, no. 4. P. 41–50. URL: https://doi.org/10.24263/2225-2924-2019-25-4-6
95. Wang, Y., Wang, M., Cai, D., Wang, B., Wang, Z., Qin, P., & Tan, T. (2016). Efficient L-lactic acid production from sweet sorghum bagasse by open simultaneous saccharification and fermentation. RSC advances, 6(42), 35771-35777.
96. Zakari, S., Martha, M., Bawa, I., Ogbu, C. O., Zakari, H., Itodo, O. M., & Matilda, A. F. (2022). Comparative Analysis of Protein in Selected Infant Formula Using Dye-Binding and Formol Methods. International Journal of Biochemistry Research & Review, 31(4), 11-16.
97. *Zhao, X., Condruz, S., Chen, J., & Jolicoeur, M. (2016). A quantitative metabolomics study of high sodium response in Clostridium acetobutylicum ATCC 824 acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation. Scientific reports, 6(1), 28307.*

98. *Gu, H., Zhu, Y., Peng, Y., Liang, X., Liu, X., Shao, L., ... & Li, J. (2019). Physiological mechanism of improved tolerance of Saccharomyces cerevisiae to lignin-derived phenolic acids in lignocellulosic ethanol fermentation by short-term adaptation. Biotechnology for Biofuels, 12, 1-14.*

ДОДАТКИ

ІНСТРУКЦІЯ
щодо використання засобу дезінфікуюч
«Сурфахлор»
з метою дезінфекції об'єктів, достерилізаційного
очищення виробів медичного призначення

1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

1.1. Повна назва засобу – засіб дезінфікуючий «Сурфахлор» за ТУ У 20.2-36423868-020:2016

1.2. Виробник – ТОВ «Бланідас» (Україна). Компанія сертифікована за стандартами ISO 9001.

1.3. Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %: натрієва сіль дихлорізоціанурової кислоти - 85,5 (діюча речовина); адипінова кислота - 7,0; бікарбонат натрію -5,5; карбонат натрію-2,0 (допоміжні речовини).

1.4. Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу. Засіб випускається у вигляді таблеток білого кольору, вагою 3,2±0,2 г, які добре розчиняються у воді (протягом 2-3 хв.) або гранул. При розчиненні однієї таблетки або 2,68г гранул у воді виділяється 1,6±0,1 г активного хлору (50%). Таблетки засобу можуть мати на поверхні розподільні насічки, які дозволяють ділити таблетку при приготуванні робочих розчинів. Водні розчини засобу прозорі, безбарвні, з легким запахом хлору, pH 6,0-7,0. За потребою клієнта, засіб може мати легкий запах лимону або морського бризу. Робочі розчини засобу володіють антикорозійними, стабілізуючими властивостями, пом'якшують воду, мають змочувальні, дезодоруючі, емулыгуючі, мийні та відбілюючі властивості, не пошкоджують об'єкти, що виготовлені із корозійностійкого металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, силікону, пластмас, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу та поверхні медичних приладів, апаратів і устаткування з лакофарбовим, гальванічним і полімерним покриттям, не фіксують забруднення органічного походження на поверхні виробів медичного призначення, добре змиваються, не залишають нальоту на поверхнях об'єктів, що піддаються обробці. Видаляють механічні, білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів та порожнин виробів медичного призначення, гомогенізують мокротиння та інші виділення. Засіб не горить, вибухобезпечний, сумісний з милами, сульфованими маслами, аніонними поверхнево-активними речовинами, амфотерними та неіоногенними речовинами, солями лужних металів неорганічних і органічних кислот.

1.5. Призначення засобу. Засіб «Сурфахлор» призначений:

- для проведення поточної, заключної та профілактичної дезінфекції, генеральних прибирань при інфекціях бактеріальної (включаючи туберкульоз, псевдотуберкульоз, дизентерію, легіонельоз, клостридії, туляремію, чуму, холеру, коліти, ентерити, гастроентерити, черевний тиф, паратифи, мультирезистентний стафілокок (MRSA), ентерогеморагічна кишкова паличка (Escherichia coli), сальмонельози, дифтерію, скарлатину, коклюш, менінгококову інфекцію, інфекції, викликані синьогнійною паличкою тощо), вірусної (включаючи гепатити А, парентеральні вірусні гепатити (В, С), вірус СНІД

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
щодо застосування засобу
СУРФАНІОС ЛЕМОН ФРЕШ UA
з метою дезінфекції, очищення, у т. ч. достерилізаційного очищення, дезінфекції високого рівня та стерилізації

1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

1.1. Повна назва засобу – засіб для дезінфекції, очищення, у т. ч. достерилізаційного очищення, дезінфекції високого рівня та стерилізації СУРФАНІОС ЛЕМОН ФРЕШ UA.

1.2. Фірма-виробник – ТОВ «Дезант» (Україна)
за ТУ У 24.2-34351252-001:2009 із Змінами №1-4 до них із сировини Laboratoires ANIOS (Франція).

1.3. Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас.%:
діючі речовини:
N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3-діамін – 4,59-5,61;
N,N-дидецил-N,N-диметиламоній хлорид – 2,25-2,75;
допоміжні речовини: детергенти, барвник, ароматизатор, інші функціональні домішки та вода – до 100.

1.4. Форма випуску та фізико-хімічні властивості засобу.
Засіб СУРФАНІОС ЛЕМОН ФРЕШ UA – прозорий розчин блакитно-зеленого кольору з лимонним запахом, густина (20^oC) – 1,02-1,05 г/$см^3$, показник заломлення (20^oC) – 1,35-1,38, значення pH концентрату –11,6-13,0.
Засіб добре змішується з водою, значення pH 0,25% робочого розчину засобу приблизно 8,5. Робочі розчини засобу мають досконалі миючі та дезодоруючі властивості, добре змочують поверхні, ефективно розчиняють та видаляють забруднення будь-якого походження (включаючи білкові, жирові, залишки крові, лікарських препаратів тощо) із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів та порожнин виробів медичного призначення (ВМП), не залишають нальоту на поверхні, не ушкоджують та не знебарвлюють об'єкти, які ними обробляються, не зменшують міцність тканин. Водні розчини прозорі, практично без запаху. Засіб особливо рекомендований для зон, чутливих до запахів (наприклад, неонатальні відділення, блоки інтенсивної терапії, а також при виробництві чутливої продукції у косметичній, фармацевтичній промисловості та інш.).
Розчинами засобу можна обробляти вироби з різних матеріалів.

Директор В.Л.Малюга

ІНСТРУКЦІЯ щодо застосування засобу «ДАНАКЛІН» універсальний

1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

1.1. Повна назва засобу – Засіб мийний з антибактеріальною дією **«ДАНАКЛІН»** універсальний для миття і очистки поверхонь».

1.2. Фірма виробник – «ДАНА МЕДІКАЛ» (Україна), що виготовляється у відповідності із ТУ У 20.2-40220141-005:2020 «Засоби дезінфікуючі «ДАНАКЛІН». Технічні умови» .

1.3. Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас., %: 2-феноксіетанол – 2,0%±0,05; катіонактивні ПАР, неіногенні ПАР – до 5,0% халатний комплекс , антикорозійний комплекс, Рн регулятор, інші функціональні добавки, вода демінералізована (очищена) – до 100,0%.

1.4. Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу. Засіб «ДАНАКЛІН»універсальний – однорідна прозора рідина, від світло жовтого до зеленого кольору, із слабким запахом використаної сировини (за потреби, може додаватись віддушка, при цьому засіб та його робочі розчини набувають запаху віддушки). Величина Рн 0,5% - 5,0% розчину – 7,5 – 10,5. Робочі розчини засобу мають гарні миючі, дезодоруючі, змочувальні, властивості, усуває неприємні запахи, в т.ч. пов'язані із утворенням цвілі, не пошкоджують вироби та поверхні із різноманітних матеріалів. Видаляють механічні, білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів та інші. «ДАНАКЛІН»універсальний є не горючим, пожежо- та вибухобезпечним. Дезінфекційний засіб «ДАНАКЛІН»універсальний не містить окиснювачів, добре змішується з водою в будь яких співвідношеннях.

1.5.Призначення засобу. Засіб «ДАНАКЛІН»універсальний застосовується для одночасного миття і дезінфекції в закладах охорони здоров'я усіх профілів, включаючи зони догляду за хворими, пацієнтами; аптечних закладах; лабораторіях; навчально-виховних та учбових закладах різних рівнів акредитації, дитячих дошкільних закладах; у військових частинах; на підприємствах харчової та переробної промисловості, агропромислового комплексу, мікробіологічної, фармацевтичної, парфумерно – косметичної промисловості, ресторанному господарстві, підприємствах громадського харчування та торгівлі, на об'єктах комунально-побутового обслуговування; на автомобільному, залізничному, авіаційному та водному транспорті; закладах та установах соціального захисту, пенітенціарних установах, закладах зв'язку та банківських установах; в місцях загального користування, на інших епідемічнозначимих об'єктах, діяльність яких вимагає проведення дезінфекційних робіт відповідно до діючих санітарно-гігієнічних та протиепідемічних норм і правил, у вогнищах інфекційних хвороб.

1.6.Спектр антимікробної дії. Спектр протимікробної активності підтверджений лабораторними дослідженнями, що проводились у відповідності з чинними нормативними документами, що гармонізовані із EN стандартами ЄС. Засіб «ДАНАКЛІН»універсальний має антимікробну активність по відношенню до грам негативних і грам позитивних бактерій, віруліцидну та фунгіцидну дію, виражені миючі властивості.

1.7. Токсичність та безпечність засобу. Засіб «ДАНАКЛІН»універсальний, за параметрами гострої токсичності та при нанесенні на шкіру відповідно до вимог ГОСТ 12.1.007-76, належить до 4 класу мало небезпечних. Пари засобу в концентрації насичення ало небезпечні (4 клас небезпеки) при інгаляційному надходженні. В умовах застосування вміст хімічних речовин у повітрі робочої зони та тих, що попадають в стічні води після застосування засобу не перевищує гранично допустимих концентрацій встановлених чинним законодавством. Робочі розчини засобу не подразнюють шкіру, слизові верхніх дихальних шляхів,