

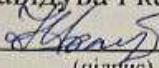
**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри


(підпис)

Наталія ГОЛУБ

«6» серпня 2024р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Технологія виробництва біодизеля з дріжджових ліпідів»

Виконала:

студентка IV курсу, групи БМ-01

Гоман Єлизавета Костянтинівна

Керівник:

старший викладач, к.т.н.,

Зубченко Людмила Сергіївна

Консультант з проектування:

проф., д.т.н, проф.,

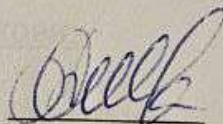
Саблій Лариса Андріївна

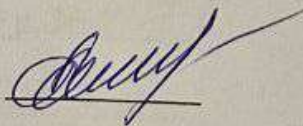
Рецензент:

Доцент, к.б.н.,

Ліновицька Віта Михайлівна

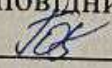








Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студентка 

Київ – 2024 року

**Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

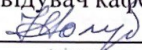
Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри


(підпис)

Наталія ГОЛУБ
(ім'я, прізвище)

«15» квітня 2024р.

**ЗАВДАННЯ
на дипломний проєкт студентці
Гоман Єлизаветі Костянтинівні**

1. Тема проєкту «Технологія виробництва біодизеля з дріжджових ліпідів»

керівник проєкту к.т.н., старший викладач Зубченко Людмила Сергіївна,

затверджені наказом по університету від,

затверджені наказом по університету від «27» травня 2024р. № 2117-С

2. Термін подання студентом проєкту 6 червня 2024 року

3. Вихідні дані до проєкту:

Ферментер для отримання біомаси дріжджів, об'єм ферментера 63 м³, коефіцієнт заповнення 0,7, механічне перемішування.

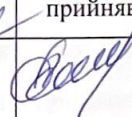
Зміст пояснювальної записки:

Характеристика та обґрунтування вибору виду дріжджів у якості біологічного агенту; обґрунтування технології культивування та виділення ліпідів з дріжджових грибів для виробництва біодизеля; біохімічні основи технологічного процесу одержання ліпідів; технологічна частина: вибір, розрахунок та характеристика обладнання для культивування дріжджів для виробництва біодизеля; охорона праці та охорона довкілля.

4. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо):

Технологічна схема біотехнології одержання ліпідів дріжджових грибів для виробництва біодизеля (A1); апаратурна схема одержання ліпідів дріжджових грибів для виробництва біодизеля (A1); креслення виробничого ферментера (A1).

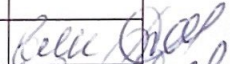
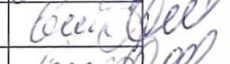
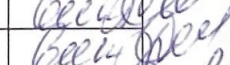
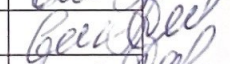
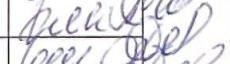
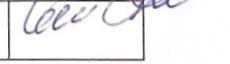
5. Консультанти розділів проекту*

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Графічна частина дипломного проекту	д.т.н., проф. Саблій Л.А.		

6. Дата видачі завдання

15 квітня 2024 року

Календарний план

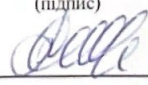
№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1	Вступ	10.05.2024	
2	Розділ 1	15.05.2024	
3	Розділ 2	20.05.2024	
4	Розділ 3	25.05.2024	
5	Розділ 4	27.05.2024	
6	Розділ 5	30.05.2024	
7	Висновки	03.06.2024	
8	Креслення	03.06.2024	
9	Оформлення пояснювальної записки та креслень	10.06.2024	

Студент


(підпис)

Єлизавета ГОМАН

Керівник проекту


(підпис)

Людмила ЗУБЧЕНКО

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка: 85 с., 7 рис., 12 табл., 56 посилань.

У дипломному проекті досліджено використання дріжджових грибів для виробництва ліпідів, які можуть бути використані для виробництва біодизеля. Здійснено вибір дріжджів *Lipomyces starkeyi* як потенційного продуцента. Проведено пошук оптимальних умов культивування біомаси дріжджів та ефективних методів виділення ліпідів.

Розроблено технологію виробництва біодизеля з дріжджової біомаси, включаючи створення технологічної та апаратурної схем, розрахунок обладнання для виробництва ліпідів, креслення виробничого ферментера, матеріальний баланс, вибір сировини та напівпродуктів, параметри контролю, а також заходи щодо охорони праці і довкілля.

БІОДИЗЕЛЬ, ДРІЖДЖОВІ ГРИБИ, БІОТЕХНОЛОГІЯ, ПЕРІОДИЧНЕ КУЛЬТИВУВАННЯ З ПІДЖИВЛЕННЯМ, ФЕРМЕНТЕР, БІОЕНЕРГЕТИКА.

ABSTRACT

Explanatory note: 85 pages, 7 figures, 12 tables, 56 references.

The diploma project investigated the use of yeast fungi for the production of lipids, which can be used for the production of biodiesel. *Lipomyces starkeyi* yeast was selected as a potential producer. The search for optimal conditions for the cultivation of yeast biomass and effective methods of lipid extraction was carried out.

The technology for the production of biodiesel from yeast biomass has been developed, including the creation of technological and equipment schemes, the calculation of equipment for the production of lipids, drawings of the production fermenter, material balance, the selection of raw materials and semi-products, control parameters, as well as measures for labor and environmental protection.

BIODIESEL, YEAST MUSHROOMS, BIOTECHNOLOGY,
PERIODIC CULTIVATION WITH NUTRITION, FERMENTER,
BIOENERGY.

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА, ВИБІР СИРОВИНИ ТА ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ	11
1.1 Вибір продуцента ліпідів для виробництва біодизеля	11
1.1.1 Характеристика та перспективи використання мікроорганізмів як продуцентів ліпідів для виробництва біодизеля	11
1.1.2 Обґрунтування вибору виду дріжджових грибів для отримання біодизельного пального.....	14
1.2 Обґрунтування вибору технології культивування дріжджів для виробництва біодизеля	17
1.2.1. Характеристика технології культивування дріжджів <i>Lipomyces starkeyi</i> з метою отримання ліпідів та подальшим виробництвом біодизеля	17
1.2.3 Вплив режиму та умов культивування на ріст дріжджів <i>Lipomyces starkeyi</i> та вихід цільового продукту.....	24
1.3 Виділення дріжджових ліпідів	28
1.4 Характеристика процесу трансестерифікації	36
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ПРОЦЕСИ ВИРОБНИЦТВА ЛІПІДІВ ДРІЖДЖАМИ	39
2.1 Метаболізм ліпідів у дріжджів <i>Lipomyces starkeyi</i>	39
2.2 Характеристика біодизеля, отриманого з ліпідів дріжджів <i>Lipomyces starkeyi</i>	42
РОЗДІЛ 3. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	45
3.1. Сировина і матеріали	45
3.2 Опис технологічного процесу виробництва дріжджових ліпідів з подальшим отриманням біодизеля.....	47
3.3. Матеріальний баланс	55
3.4. Контроль виробництва	57

					КББЕ.БМ01.ПЗ		
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ЗМІСТ		
Розроб.	Гоман Є.К.						
Перевір.	Зубченко Л.С.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд					КПІ ім. І. Сікорського ФБТ		
					Літ.	Арк.	Аркушів
						6	85

РОЗДІЛ 4. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІПІДІВ	60
4.1. Обґрунтування вибору виробничого ферментера	60
4.2 Розрахунок виробничого ферментера.	63
4.2.1 Конструктивний розрахунок ферментера.....	63
4.2.2. Розрахунок виробничої потужності.	67
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ТА БЕЗПЕКА ПРАЦІ. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	69
ВИСНОВКИ.....	74
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	76
ДОДАТКИ.....	83

ВСТУП

Останнім часом внаслідок технічного прогресу і збільшення населення виникає зростання потреби в паливі. Окрім такого попиту, поширюється і занепокоєність людства щодо кліматичних змін та екологічних проблем, пов'язаних з використанням традиційних джерел енергії. Серед них викиди парникових газів, численні забруднення довкілля, скорочення біорізноманіття та інше.

Окрім проблем, пов'язаних з довкіллям, виникають економічні питання, адже вартість нафти та інших викопних видів палива невпинно зростає. У зв'язку з цим багато країн звертають увагу на розвиток та використання відновлюваних джерел енергії, зокрема і біоенергетики.

Постановка проблеми. У сучасному світі однією з ключових проблем є залежність від нафтопродуктів та їх негативний вплив на довкілля. Емісія парникових газів з традиційного палива є однією з головних причин глобального потепління та зміни клімату. А видобуток, транспортування та спалювання нафтопродуктів призводить до серйозного забруднення повітря, водойм та ґрунту.

Багато країн досі залежні від імпортованої нафти, що створює загрозу їх енергетичній безпеці, адже ціни на паливо можуть значно змінюватися через різноманітні геополітичні та економічні чинники.

Біопаливо, як екологічно чисте альтернативне джерело енергії, може допомогти подолати кілька вищезгаданих проблем. Біодизель - це тип рідкого біопалива, який виготовляють з різних джерел біомаси.

					КББЕ.БМ01.ПЗ								
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП					Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.	Гоман Є.К.												
Перевір.	Зубченко Л.С.											8	85
Реценз.										КПІ ім. І. Сікорського ФБТ			
Н. Контр.													
Затверд													

Основним сировинним матеріалом для виробництва біодизеля часто є рослинні олії, такі як соя, рапс або пальмова олія. Але вирощування рослин для виробництва біодизеля вимагає великих площ, що призводить до зменшення доступної землі для вирощування сільськогосподарських культур для харчових потреб людства. Крім цього варто відмітити, що врожайність рослин для виробництва біодизеля часто залежить від погодних умов і не завжди є високою. Ці та інші проблеми підкреслюють важливість розвитку нових та ефективних методів виробництва біодизеля.

Актуальність. Сьогодні все більше країн намагається переходити на біодизель. На протязі останніх десятиліть Європейський Союз (ЄС) розглядав питання біопалива з різних перспектив, включаючи його використання як альтернативного джерела енергії для зменшення викидів парникових газів та залежності від нафтопродуктів. Євросоюз також встановив систему стандартів та критеріїв стосовно сталості біопалива, включаючи викиди парникових газів, використання землі та ефективність виробництва. Оскільки курс щодо біопалива зазнавав змін через постійні обговорення стосовно його ефективності, то ЄС також розвиває нові підходи до біопалива, такі як продовження досліджень у напрямку використання відходів та біомаси з нехарчових джерел, а також збільшення використання продуктивності виробництва біопалива.

Виробництво біодизеля з ліпідів олійних дріжджів є актуальним інноваційним напрямком в області біоенергетики.

Олійні дріжджі - це мікроорганізми, які можуть бути використані для виробництва олії, яка подібна до рослинної олії. Олійні дріжджі можуть бути вирощені на відходах, що робить їх досить доступними, адже сировина для їх культивування є відносно дешевим матеріалом. До того ж, культивування дріжджів потребує значно менших площ землі. Культивування грибів значно легше контролювати, ніж цілі площі полів з енергетичними рослинами. Окрім цього, ліпіди, які містяться в олійних дріжджах, можуть становити до 70% їх сухої маси.

Тож у зв'язку зі зростаючим попитом на стійкі та екологічно чисті джерела енергії, виробництво біодизеля з ліпідів олійних дріжджів має значний потенціал.

Мета роботи. Метою роботи є вибір та обґрунтування технології виробництва дріжджових ліпідів як основи для отримання біодизельного палива.

Завдання дипломного проекту:

1. На основі аналізу наукової літератури розглянути переваги та недоліки існуючих видів дріжджів з точки зору можливості їх використання у якості продуцента ліпідів та обрати продуцента для виробництва грибних ліпідів; обґрунтувати склад поживного середовища для вирощування обраного продуцента;
2. Обрати оптимальні умови, параметри та технологію культивування олійних дріжджів для виробництва ліпідів та обрати і обґрунтувати технологію одержання біодизеля з дріжджових ліпідів;
3. Розробити технологічну і апаратурну схеми культивування олійних дріжджів для виробництва біодизеля; розробити креслення розрахованого ферментера;
4. Розрахувати матеріальний баланс, технічні показники обраного типу ферментера та іншого обладнання для культивування дріжджів;
5. Розглянути питання безпеки праці і охорони навколишнього середовища на виробництві.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА, ВИБІР СИРОВИНИ ТА ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ

1.1 Вибір продуцента ліпідів для виробництва біодизеля

1.1.1 Характеристика та перспективи використання мікроорганізмів як продуцентів ліпідів для виробництва біодизеля

Біодизель – одне з найкращих альтернативних видів палива, адже є найбільш стійким і відновлюваним заміномником викопного. В останні роки інтерес до нього невпинно зростає, зокрема через його екологічність і дефіцити поставок нафти. Зазвичай біодизель одержують хімічним шляхом переестерифікації, де триацилгліцериди, незалежно від їх походження, взаємодіють з коротколанцюговими спиртами (часто етанол/метанол) з утворенням алкілових ефірів (метилових/етилових ефірів) [1]. Таке пальне можна використовувати для звичайних дизельних двигунів, адже відомо, що біодизель має кращі змащувальні властивості, що може сприяти підвищенню тривалості роботи двигуна та зменшенню його зносу. Крім цього, біопаливо має значно менший вміст сірки, що сприяє зменшенню забруднення повітря, а емісія парникових газів для біодизеля в рази менша порівняно з звичайним дизельним паливом. незалежно від їх походження. Сировиною для виробництва такого біопалива можуть бути мікробні чи рослинні олії, тваринні жири або навіть відпрацьована харчова олія[2].

На сьогоднішній день мікробні олії вважаються найкращою сировиною для виробництва біодизеля через їх схожість з рослинними оліями та рядом інших переваг [1]. Зокрема, продуктивність синтезу ліпідів у мікроорганізмів, як правило, вища ніж у рослин, також простіше здійснити переробку з метою виділення цільового продукту.

					КББЕ.БМ01.ПЗ						
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА, ВИБІР СИРОВИНИ ТА ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ	Літ.		Арк.	Аркушів		
Розроб.	Гоман Є.К.							11	85		
Перевір.	Зубченко Л.С.										
Реценз.											
Н. Контр.											
Затверд											
						КПІ ім. І.Сікорського ФБТ					

Водночас, мікроорганізми легше піддаються генетичним модифікаціям (якщо в них є потреба) для посилення синтезу певних продуктів і вони можуть швидко рости в контрольованому середовищі незалежно від погодних умов.

Серед мікроорганізмів, що здатні накопичувати велику кількість ліпідів вирізняють мікроводорості, дріжджі, міцеліальні гриби та певні види бактерій [3]. Продуктивність синтезу і накопичення ліпідів у організмів кожного виду в першу чергу залежить від біохімічних та фізіологічних властивостей, а також підібраного поживного середовища.

Таблиця 1.1 – Приклади олійних мікроорганізмів та їх здатність до ліпідоутворення [2].

Мікроорганізм	Субстрат	Вміст синтезованих ліпідів (%w/w)
Мікроводорості		
<i>Chlorella protothecoides</i>	Глюкоза	49
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	Гідролізат березової біомаси	66
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Глюкоза	59
<i>Botryococcus braunii</i>	Модифіковане середовище Чу	28
Міцеліальні гриби та дріжджі		
<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i>	Відпрацьований осад освітленого масла	70
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Пивоварне зерно	56
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Ксилоза і глюкоза	48
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Глюкоза	53
<i>Cryptococcus sp.</i>	Гідролізат бананової шкірки	34
<i>Fusarium oxysporum</i>	Глюкоза	53
<i>Sarocladium kiliense</i>	Глюкоза і гліцерин	33
<i>Mortierella alpina</i>	Глюкоза з нітратом калію	31
Бактерії		
<i>Rhodococcus opacus</i>	Декстроza	70
<i>Rhodococcus opacus</i>	Стічні води молочної промисловості	14

Олійні мікроводорості є доволі перспективними для виробництва біодизеля, зокрема завдяки їх здатності до фотосинтезу. Мікроводорості можуть використовувати як органічні так і неорганічні джерела вуглецю, адже існує чотири способи їх культивування: автотрофний, міксотрофний, гетеротрофний та фотогетеротрофний [2]. Проте основними недоліками є відносно низька продуктивність біомаси та ліпідів, а також потреба у фотобіореакторах, що не завжди економічно вигідні. Модифікації ядерних або хлоропластних геномів даних еукаріотичної клітин є складними процесами, що також створює певні перешкоди[4].

Загалом, більшість грибів можна культивувати на недорогій сировині, такій як патока, стічна вода, відходи харчової промисловості тощо.

Олійні дріжджі є добре вивченими мікроорганізмами і включають види родів *Candida*, *Rhodospiridium*, *Yarrowia*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Lipomyces* і *Trichosporon*. Частина з них здатна накопичувати ліпіди до 80% від маси їх сухої речовини [2]. Ліпідоутворюючі дріжджі здатні рости до високої щільності клітин разом із високим вмістом ліпідів на різних джерелах вуглецю [2,5]. Метаболізм даних видів дріжджів добре вивчений, а вчені продовжують відбирати та модифікувати різні штами для збільшення виробництва ліпідів.

Олійні міцеліальні гриби є також перспективними для виробництва біопалива. Даний тип має унікальні профілі жирних кислот, зокрема γ-ліноленова кислота, яка не може бути синтезована у великих кількостях іншими олійними мікроорганізмами [2,6].

Олійні бактерії, хоч і здатні накопичувати ліпіди, проте їх використання обмежене для виробництва біодизеля порівняно з вищезгаданими організмами, хоч їм і властиві такі переваги як: висока швидкість росту, легкість культивування, використання різноманітних субстратів для росту, можливі генетичні або метаболічні модифікації [2,7].

Незважаючи на усі позитивні аспекти та можливості мікроорганізмів, ключовим важелем у виробництві є економічна оцінка. Важливо обрати технологію та сировину, які будуть водночас ефективними та не дороговартісними. Окрім цього, мікроорганізм також має характеризуватися високою продуктивністю та здатністю накопичувати ліпіди, використовуючи в процесі життєдіяльності доступний субстрат.

Таким чином, робимо висновок, що найбільш перспективним для цілей біоенергетики є використання саме олійних дріжджів. За певних умов рівень накопичення ліпідів даними організмами становить приблизно 50-70%, вони легко піддаються біоінженерним модифікаціям та не виробляють ендотоксинів, що робить їх більш безпечними в порівнянні з бактеріями. Дріжджі не потребують фотобіореакторів, що так необхідні мікроводоростям, а обслуговування ферментера є дешевшим, адже він не потребує стільки енергії на освітлення. Водночас дріжджі спроможні споживати різні джерела вуглецю, серед яких можуть бути і відходи харчового виробництва. Такі альтернативні види субстрату зроблять виробництво більш економічно вигідним.

1.1.2 Обґрунтування вибору виду дріжджових грибів для отримання біодизельного пального.

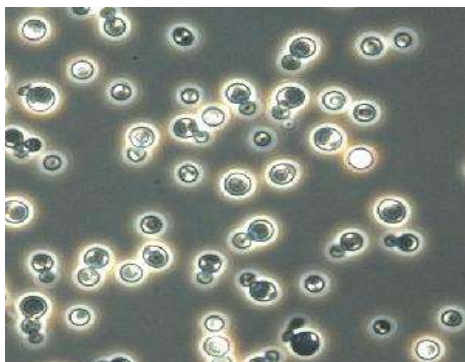


Рисунок 1.1 – *Lipomyces starkeyi* Фото: Кріс Калві та Томас Джеффріс [10]

Незважаючи на широкий вибір олійних дріжджів, увагу слід приділяти конкретним видам. Олійні дріжджі *Lipomyces starkeyi* (рис.1.1) досить цікаві для промислового виробництва біодизеля. Серед видів родини *Lipomyces*, дані одноклітинні еукаріотичні дріжджі, є найбільш широко

вивченими через їх потенціал для синтезу ліпідів. Їх можна культивувати з використанням широкого діапазону сировини. Варто зазначити, що даний вид дріжджів може виробляти велику кількість необхідних ліпідів для біодизельного палива, а здатність повторно використовувати невелику кількість ліпідів робить їх кращими порівняно з іншими видами [8,9,11].

Таблиця 1.2 – Наукова класифікація *Lipomyces starkeyi* [8]

<i>Lipomyces starkeyi</i>			
Царство	Гриби (<i>Fungi</i>)	Родина	<i>Dipodascaceae</i>
Тип	<i>Ascomycota</i>	Рід	<i>Lipomyces</i>
Підтип	<i>Saccharomycotina</i>	Вид	<i>Lipomyces starkeyi</i>
Клас	<i>Saccharomycetes</i>		

L. starkeyi вперше був виділений із ґрунту в США. Колонії даного виду дріжджів гладкі, слизуваті та клейкі. Вегетативні клітини кулястої або еліпсоїдної форми, що розмножуються багатостороннім брунькуванням. Клітини незабарвлені, як правило, оточені товстою слизовою капсулою.

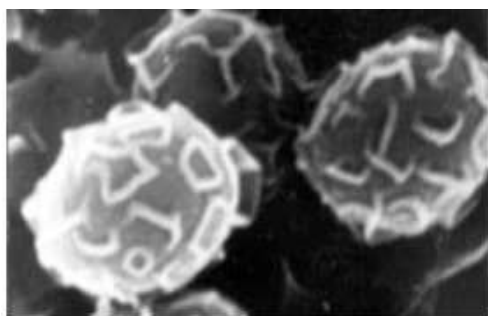


Рисунок 1.2 – Аскоспори *Lipomyces starkeyi* [15]

Іноді здатні до утворення коротких слабозвинених псевдогіфів [12]. Як і інші дріжджі, *L. starkeyi* утворюють аски, однак кожен аск може містити від 2 до 20 спор. Крім того, частота споруляції *Lipomyces starkeyi* надзвичайно низька [13]. Аскоспори (рис. 1.2) кулясті, забарвлення стінок бурштиново-

коричневе, поверхня їх складчаста [12,14].

Lipomyces starkeyi здатен накопичувати ліпіди понад 60% від маси сухої речовини. Оптимальними температурами для накопичення ліпідів у даного виду дріжджів є діапазон від 25,5 до 29,5 °C. Основне місце серед

синтезованих жирних кислот займає олеїнова кислота (C18:1) [11]. Аналізи жирних кислот клітин даного виду дріжджів показали також високий вміст пальмітинової, стеаринової та лінолевої кислоти, як переважаючі жирні кислоти у фракції триацилгліцеринів. У фосфоліпідній фракції також переважали олеїнова та лінолева кислоти [10]. Високі вмісти даних кислот є неабиякою перевагою для використання мікробної олії з метою одержання біодизеля [11]. Крім того, *L. starkeyi* демонструє хорошу толерантність до сполук, що інгібують ріст, таких як сполуки фурану і органічні кислоти, які зазвичай присутні в гідролізатах лігноцелюлозної біомаси.

Висока вартість виробництва є основною перешкодою для великомасштабного виробництва. Однак у випадку дріжджів можливість зниження ціни існує за рахунок використання дешевшої сировини [11]. Адже вартість субстрату складає близько 70% вартості біодизеля. Оскільки дріжджі *Lipomyces starkeyi* здатні рости на різних субстратах: глюкозі, ксилозі, сільськогосподарських відходах, патоці, гліцерині тощо, то це питання можна вирішити обравши оптимальні умови культивування та необхідний субстрат, що виправдовуватиме свою вартість.

Отже, зважаючи на низку переваг перед іншими продуцентами ліпідів, серед яких висока продуктивність накопичення ліпідів та можливість використання широкого спектру субстратів, *Lipomyces starkeyi* було обрано як продуцент ліпідів для виробництва біодизеля.

1.2 Обґрунтування вибору технології культивування дріжджів для виробництва біодизеля

1.2.1. Характеристика технології культивування дріжджів *Lipomyces starkeyi* з метою отримання ліпідів та подальшим виробництвом біодизеля

При виробництві біопалива дріжджі можуть використовуватися з двома цілями:

- 1) Для синтезу речовин, таких як ліпіди чи вуглеводи, з подальшим перетворенням їх у біопаливо;
- 2) Для синтезу безпосередньо молекул палива (етанолу, водню, метану тощо).

Оскільки ціллю є отримання біодизеля, то культивування дріжджів *Lipomyces starkeyi* повинно бути спрямованим на високий вихід жирів. Таким чином технологію виробництва біодизеля з ліпідів грибів можна поділити на наступні етапи:

- Підготовка поживного середовища
- Підготовка посівного матеріалу
- Культивування *Lipomyces starkeyi*
- Виділення ліпідів
- Проведення трансетерифікації
- Очистка біодизеля
- Отримання готового продукту
- Реалізація побічних продуктів.

Відповідно до даних блок-схеми (рис. 1.3) бачимо, що в процесі виробництва у великій кількості будуть утворюватися залишки біомаси та гліцерол. Зруйновані клітини дріжджів та інші рештки органічних речовин можна додатково реалізувати, використавши для виробництва кормів для

тварин, виробництва біогазу, компосту тощо. Гліцерол можна використовувати і як джерело вуглецю, з поверненням у виробничий цикл, і як основу в парфумерії чи інших галузях, де в ньому є необхідність.

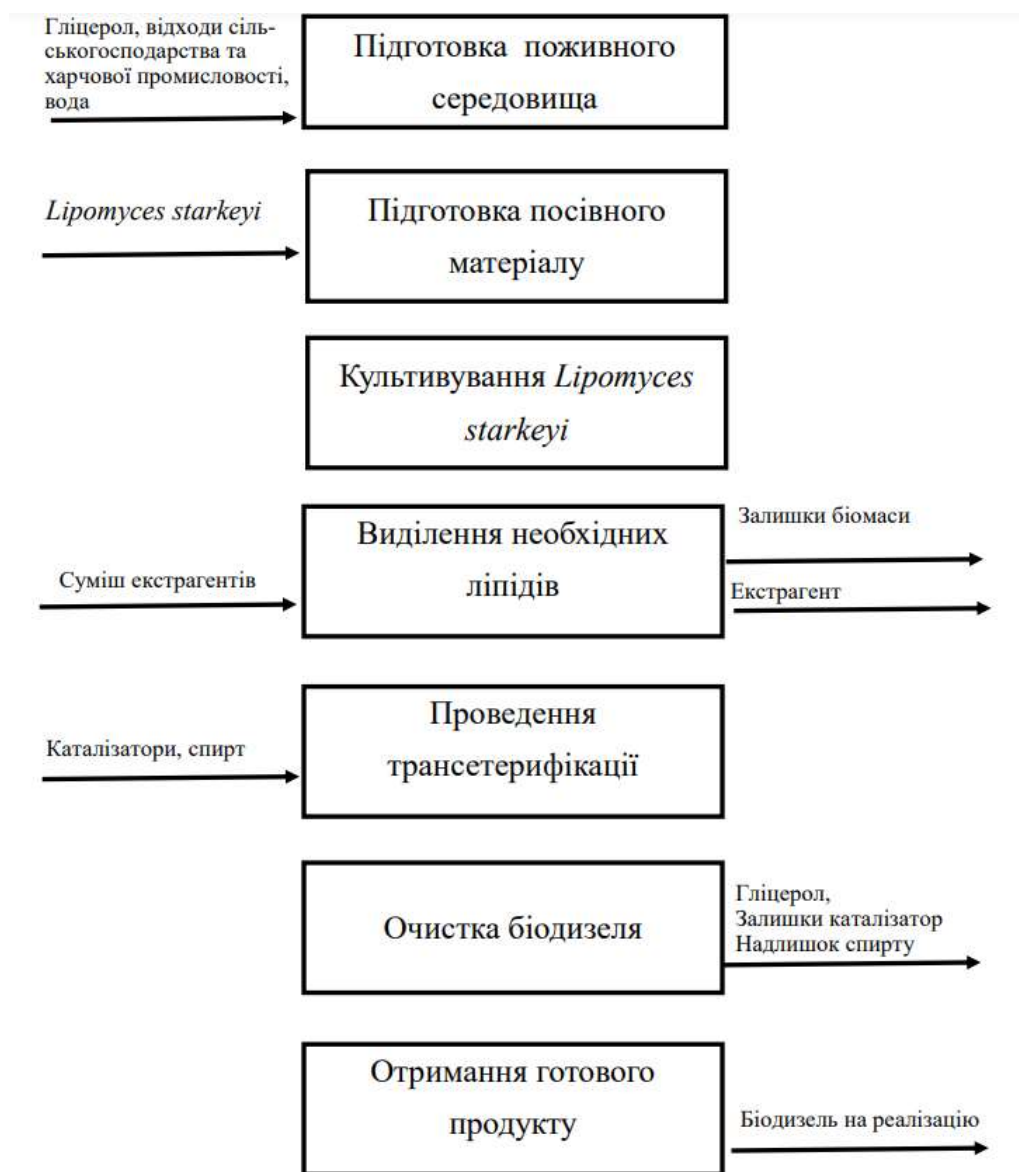


Рисунок 1.3 – Блок-схема виробництва біодизеля з ліпідів дріжджів *Lipomyces starkeyi*

Важливим та ключовим етапом технології виробництва ліпідів для біодизеля є культивування дріжджів, адже від вибору середовища, оптимальних умов та необхідного обладнання залежить вихід продукту. Окрім цього, вибір якісного екстрагента для вивільнення ліпідів з біомаси

та каталізатора для проведення трансетерифікації є не менш важливими, адже прямо впливають на якість біодизеля.

1.2.2 Обґрунтування складу поживного середовища для культивування *Lipomyces starkeyi*

Як і більшість дріжджів, *Lipomyces starkeyi* надає перевагу глюкозі, як основному джерелу вуглецю. Проте, дослідження довели, що даний вид також добре засвоює ксилозу, при цьому накопичуючи велику кількість ліпідів. Окрім того групою вчених також вивчалося питання одночасного використання декількох джерел живлення. Зокрема високі показники нарощення біомаси спостерігалися при використанні глюкози з ксилозою, суміші ксилози, целобіози та глюкози або при поєднанні глюкози з манозою. Можливість накопичувати жирні кислоти була продемонстрована навіть за використання у ролі джерела карбону таких речовин як гліцерол, етанол, різних органічних кислот тощо. Цікавою властивістю є те, що даний вид дріжджів здатен нарощувати ліпідну масу навіть споживаючи гідрофобні субстрати, серед яких жирні кислоти, олії, парафіни та ін. У табл.1.3 зібрано дані щодо штамів та виходу ліпідів при споживанні різного роду субстрату ними [14].

Важливим фактором для виробництва біодизеля є те, що отримані результати дослідів демонструють можливість використання різних субстратів: суміші цукрів, отриманих з їстівних або лігноцелюлозних біомас, відходів харчових виробництв, стічні води певних фабрик або вуглеводневих відходів. Адже вартість сировини можна значно знизити, якщо не використовувати чисту глюкозу з ксилозою, натомість надаючи перевагу гідролізатам деревини чи цукровмісним відходам різних виробництв, якщо штам дріжджів буде здатен добре метаболізувати такі субстрати та накопичувати при цьому ліпіди.

Таблиця 1.3 – Порівняльна характеристика виходу ліпідів при використанні різних джерел вуглецю штамами *Lipomyces starkeyi* [14].

Штам	Субстрат	Тип культивування	Суша клітинна біомаса, г/дм ³	Вміст ліпідів, (% w/w)	Продуктивність синтезу ліпідів, г/дм ³ /добу
AS 2.1560	Глюкоза	Біореактор	30	46	3,45
-	Етанол	Періодичне з підживленням	153	54	-
-	Стічні води оливкового заводу	Колби качалки	10,4	22,4	0,23
AS 2.1560	Глюкоза + ксилоза	Колби качалки	20,5	61,5	2,52
DSM 70296	Глюкоза + ксилоза	Періодичне з підживленням	76	43,85	-
DSM 70296	Глюкоза + ксилоза	Біореактор	85,4	48,9	
DSM 70296	Ксилоза	Періодичне з підживленням	94,6	37,4	-
AS 2.1560	Целобіоза, ксилоза і глюкоза	Колби качалки	25,5	52	2,95
ATCC 12659	Гідролізат пшеничної соломи	Колби качалки	14,7	31,2	0,76
AS 2.1560	Глюкоза + маноза	Колби качалки	22	58,3	2,64
BCRC 23408	Гідролізат рисових висівок	Колби качалки	23,1	56,11	2,6
AS 2.1560	Пальмітинова кислота	Колби качалки	19,3	62,3	4
AS 2.1560	Стеаринова кислота	Колби качалки	19,5	58,9	3,83
ATCC 56304	Двофазне: спершу глюкоза, тоді ксилоза	Періодичне з підживленням	296,6	60,1	3,36
DSM 70296	Гліцерол	Колби качалки	34,4	35,9	-
NRRLY-11557	Гліцерол	Колби качалки	5,74	50,49	0,58
DSM 70296	Гідролізат макухи соняшника	Колби качалки	16,5	30,3	-

* «-» - дані не повідомляються.

Аналізуючи дані, подані в табл. 1.3 бачимо, що окрім цукрів, *Lipomyces starkeyi* має відносно високі показники приросту біомаси та ліпідів і при використанні інших джерел вуглецю. Зокрема, даний вид може використовувати етанол в якості субстрату [14]. Проте даний спирт має дещо токсичний вплив на клітини та водночас є недешевим субстратом для культивування в великих масштабах. До того ж етанол може слугувати речовиною для проведення процесу трансетерифікації при виготовленні біодизеля, що також робить його використання у якості субстрату нерациональним.

Численні дослідження демонструють можливість росту *Lipomyces starkeyi* на жирних кислотах або стічних водах підприємств, що пов'язані з олійними продуктами [14]. Проте кількість поживних речовин в таких водах є невеликою, що унеможливорює масштабування виробництва використовуючи їх як основний субстрат. До того ж, приріст біомаси клітин на такому субстраті є невеликим.

Оскільки використання глюкози та ксилози тільки збільшить вартість технології, то цікавими залишаються гліцерол та гідролізати відходів лігноцелюлозних мас.

Гліцерин є побічним продуктом, що утворюється в процесі виробництва біодизеля у великій кількості. Дослідження вказують на те, що *Lipomyces starkeyi* може засвоювати карбон з даного джерела та накопичувати при цьому ліпіди, проте як бачимо швидкість росту та продуктивність не є високими у порівнянні з гідролізатами геміцелюлозних мас. Результати з вмістом ліпідів 30–50% з використанням неочищеного гліцерину як середовища й різниця у прирості біомаси, ймовірно, були викликані різницею в складі використовуваної вихідної сировини або це пов'язано зі здатністю різних штамів по-різному споживати певний субстрат [14]. Окрім того такі показники могли бути зумовлені тим, що внаслідок зниження проліферації клітин, що пов'язана з виснаженням джерела азоту, кількість метаболітів у клітинах зменшувалася, а

накопичення ліпідів зростало. Натомість після виснаження джерела вуглецю кількість метаболітів знову зростала, адже запускався процес протеолізу [16].

Дослідження [17] демонструє, що висока клітинна маса з концентрацією 85 г/дм³ і ліпідів 40 г/дм³ досягнута за допомогою періодичного культивування з підживленням при використанні середовищ глюкоза:ксилоза (30:70) та гідролізату геміцелюлози, отриманого шляхом гідролізу жому цукрової тростини концентрованою сірчаною кислотою при 120°C протягом 20 хв. Склад отриманого гідролізату становив 13,1 г/дм³ ксилози, 2,9 г/ дм³ глюкози, 2,6 г/ дм³ оцтової кислоти, 2,1 г/дм³ арабінози, 0,04 г/дм³ фурфуролу та 0,02 г/дм³ гідроксиметилфурфуролу.

Після культивування вчені проводили дослідження отриманої ліпідної фракції, зокрема проведена реакція трансестерифікація метанолом. Хроматографічний аналіз естерифікованих ліпідів показав, що основними складовими цього комплексу є пальмітинова, стеаринова, олеїнова та лінолева кислоти з розрахунковим цетановим числом (приблизно 61), подібним до пальмового біодизеля [17].

Дані результати вказують на можливість перетворення лігноцелюлозних матеріалів у біодизель.

Для території України не притаманне вирощування цукрової тростини, натомість є багато плантацій з вирощуванням цукрового буряка для подальшого отримання з нього цукру. Основними відходами при цьому є жом, бадилля та меляса. Як відомо, при виробництві цукру відходи жому становлять близько 80% до маси переробленого буряка. Їх часто використовують для виробництва кормів для тварин, проте не завжди встигають переробляти.

Відходи цукрового буряка не єдині, які можна задіяти у виробництві ліпідів для переробки їх в біодизель. Адже велика кількість відходів, що багаті геміцелюлозою утворюється і при переробці пшениці, ячменю, соняшника тощо.

Головним недоліком використання гідролізатів рослинних мас є складний етап обробки та його отримання. Адже для ефективного гідролізу необхідно додатково застосовувати кислоти чи луги, термічну обробку, що в свою чергу не є економічно вигідно. Також необхідним буде етап очистки гідролізату від заважаючих культивуванню речовин.

Тому в ролі найбільш перспективного джерела вуглецю, що є дешевим, доступним та який сприяє вищому приросту біомаси та збільшенню накопичення ліпідів у клітинах дріжджів *Lipomyces starkeyi* у процесі культивування обрано гліцерол, що є відходом, який утворюється в процесі виробництва біодизеля і підготовка якого не є складною.

Серед лімітуючих факторів, що впливають на синтез та накопичення олійними дріжджами ліпідів, є: співвідношення C/N, аерація, pH, вміст фосфору та інших макро і мікроелементів тощо. Проте чи не основним чинником, що провокує утворення ліпідів є азотне голодування, яке проводять на ранніх стадіях культивування.

Оптимальний склад поживного середовища для культивування *Lipomyces starkeyi* з ціллю отримати ліпіди відображений нище у табл. 1.4.

Таблиця 1.4 – Склад поживного середовища для культивування *Lipomyces starkeyi* [17]

Компонент поживного середовища для <i>Lipomyces starkeyi</i>	Вміст, г/дм ³
Дріжджовий екстракт	1,92
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,36
Na ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	1
Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	0,4
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,04
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,08
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,001
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,001
(NH ₄) ₂ MoO ₇	0,005

1.2.3 Вплив режиму та умов культивування на ріст дріжджів *Lipomyces starkeyi* та вихід цільового продукту

Режим культивування. Вибір режиму культивування є одним з найважливіших етапів, адже спосіб вирощування дріжджів напряду пов'язаний з економічною стороною виробництва. Серед типових режимів культивування вирізняють періодичне, періодичне з підживленням та безперервне, а технологія вирощування *Lipomyces starkeyi* для отримання ліпідів може бути одно- або двостадійною. Відомо, що в процесі культивування дріжджів спершу відбувається процес збільшення клітинної маси, що потім переходить в етап накопичення ліпідів. Різниця у одно- та двоступінчастій технології полягає у тому, що в останній спеціально створюються умови спершу для підвищення росту і розмноження клітин, а пізніше відповідно для синтезу жирів. У разі одностадійної ферментації ці процеси супроводжують один одного.

У роботі [18] доведено перевагу двостадійної ферментації, оскільки завдяки цій технології спостерігається накопичення більших внутрішніх крапель ліпідів у дріжджових клітинах. У порівнянні з одностадійним процесом ферментації вміст ліпідів підвищувався на 18,5–27,1 %, а титр ліпідів – на 13,6–77,8 %. У мікробних ліпідах, отриманих як одностадійною, так і двостадійною ферментацією, переважали дві жирні кислоти, а саме пальмітинова кислота (C16:0, 33,36–38,43%) і олеїнова кислота (C18:1, 46,6–48,12%), і показали, що компоненти жирних кислот, подібні до рослинної олії. Проте, щоб реалізувати індустріалізацію мікробних ліпідів з дріжджів *Lipomyces starkeyi* ще необхідне широкомасштабне тестування двостадійної ферментації та вивчення всіх аспектів цього способу, зокрема і економічного.

Періодичний тип культивування – це режим, при якому мікроорганізм культивують у фіксованому об’ємі ферментаційного середовища за специфічних умов (тип субстрату, температура, перемішування, рН тощо) [14]. Тобто суть даного способу полягає в тому, що весь об’єм поживного середовища завантажують в апарат одразу, додаючи інокулят, і ведуть процес до накопичення необхідної кількості метаболіту. Після цього речовину забирають, завершуючи цикл й повторюючи його заново. Даний спосіб зручно використовувати в дослідницьких цілях, наприклад для визначення оптимальних умов для накопичення ліпідів. Серед переваг даного режиму є простота реалізації, економічність, знижений ризик контамінації та поширений досвід використання у промисловості, проте він має значний недолік – низьку ефективність та продуктивність [19].

У періодичному культивуванні співвідношення C/N відіграє важливу роль для продуктивності біопроцесу. Таким чином, початкове співвідношення C/N має бути оптимізоване з метою максимізувати виробництво ліпідів. В основному, збалансований вміст поживних речовин (низьке C/N співвідношення) сприяє росту клітин, незбалансованість поживних речовин (високе співвідношення C/N) викликає накопичення ліпідів. Однак надзвичайно високе співвідношення C/N може призвести до виробництва інших метаболітів, таких як органічні кислоти та може спричинити зниження життєздатності клітин [14].

Періодичний з підживленням тип культивування – це режим, за якого завантаження і розвантаження ферментера здійснюються одноразово, проте в процесі зростання культури до неї доливається свіже поживне середовище [19]. Перевагою даного режиму перед попереднім є можливість збільшення ефективності та продуктивності виробництва.

Безперервний тип культивування – це режим, за якого свіже поживне середовище безперервно надходить у ферментер та добре перемішується з уже наявним і водночас з ємності відводиться культуральна рідина. Проте

даний спосіб все одно передбачає першу ферментацію в періодичному режимі (необхідне постійне співвідношення C/N при заданій швидкості розведення для накопичення першої біомаси) протягом певного часу, щоб кондиціонувати систему, перш ніж вона запуститься в безперервному режимі [14,19].

В умовах безперервного культивування накопичення ліпідів сильно залежить від швидкості розведення і молярного співвідношення C/N живильного середовища. Низька швидкість розведення і велике значення C/N індукує використання субстрату та вироблення ліпідів у *L. starkeyi*, тому щоб максимізувати виробництво обидва параметри повинні бути належним чином відрегульовані. У роботі [14] продемонстровано, що для оптимального перетворення цукрів у ліпіди дріжджами *L. starkeyi* швидкість розведення не повинна перевищувати значення 0,06/год. Зокрема, дослідження [17] вказало на найвищі показники накопичення ліпідів при безперервному культивуванні в умовах з швидкістю розведення 0,03/год.

Зараз безперервний спосіб культивування набуває все більшої популярності. Проте водночас він має недоліки, серед яких високий ризик контамінації, у певних випадках зниження титру продукту, складність та вартість реалізації.

pH-середовища. Рівень pH середовища також є важливим параметром для асиміляції джерела вуглецю дріжджами та накопичення ліпідів. Крім того, pH впливає на поверхню клітинної мембрани, від роботи якої напряду залежить процес поглинання вуглецю. Більшість досліджень доводить, що злегка підкислене середовище може сприяти накопиченню ліпідів у деяких дріжджових клітинах (pH від 5,0 до 6,5) [20].

Температура. Найкраща температура для вирощування більшості олійних дріжджів становить близько 30 °C, оскільки більшість із них мезофільні [20]. Проте оптимальною температурою росту для виробничих потреб слід обирати ближчу до кімнатної, оскільки це зменшить витрати як на підігрів, так і на охолодження.

Вміст кисню в середовищі. Вміст в середовищі кисню є одним з визначальних факторів при культивуванні дріжджів, адже впливає на ріст та метаболізм мікроорганізмів. Аерація не тільки сприяє нарощенню біомаси, але й виконує функцію перемішування. Водночас, для накопичення ліпідів дріжджами *L. starkeyi* необхідно обмежений доступ кисню, оскільки саме за таких умов блокується окислення глюкози та індукується етап накопичення ліпідів [14]. Для *L. starkeyi* не було проведено робіт з визначення оптимального значення аерації для накопичення ліпідів, проте праця [21] демонструє високий вихід ліпідів у іншого виду дріжджів при вмісті розчиненого кисню в середовищі 25%.

Співвідношення C/N. Як згадувалося раніше, низьке значення C/N сприяє росту біомаси дріжджів, а після виснаження джерела азоту і збільшення співвідношення C/N напрям метаболізму *L. starkeyi* змінюється на накопичення жирних кислот та триацилгліцеридів. Експерименти вчених показали, що при більш високому співвідношенні C/N (вище 100) здатність дріжджів синтезувати ліпіди теж може пригнічуватися, ймовірно, через високі концентрації глюкози й запуск процесів плазмолізу, який в свою чергу інгібує розвиток клітин. Максимальне співвідношення C/N, яке можуть переносити дріжджі, може змінюватися залежно від штаму, адже відомі випадки, коли концентрація накопичених ліпідів була високою і при C/N=120 [20]. Зважаючи на наукові доробки [14,17,18,20] оптимальним C/N для *L. starkeyi* є значення близько 50-70.

Інші фізичні параметри. Швидкість перемішування, час бродіння або навіть вік і кількість інокулята також можуть впливати на продуктивність виробництва ліпідів [20].

Наприклад, згідно проведених досліджень [22], оптимальне перемішування для росту олійних дріжджів, таких як *L. starkeyi*, лежить між 150 і 400 об/хв.

У роботі [23] дослідники вивчали вплив віку інокулята на виробництво ліпідів *L. starkeyi*, вирощуючи його протягом 36, 40 та 48

годин у рідкому поживному середовищі, після чого інокулят використовували для ферментації в цукровій суміші протягом 36 год. Результати цього експерименту з точки зору виробництва ліпідів були високими та дуже схожими. Однак була різниця в кількості отриманої біомаси (г/дм³), причому інокулят, вирощений протягом 36 годин, давав найменший приріст клітин, а 48-годинний інокулят – найвищий.

Відповідно до наведеної вище інформації та маючи на меті спрощення апаратурного оформлення, для виробництва дріжджових ліпідів обрано одноступеневий періодичний процес культивування з підживленням гідролізатом геміцелюлози та тривалістю одного виробничого циклу 7 діб у виробничому ферментері з підтриманням рівня рН=5,5±0,3, рівня кисню 25% та температури 28±2°C.

1.3 Виділення дріжджових ліпідів

Наступний після культивування дріжджів процес виробництва мікробної олії включає збір їх біомаси, зневоднення (за потреби), лізис клітинних стінок, екстракцію ліпідів і їх очищення. Ці етапи є вкрай важливими для отримання якісного біодизеля. Кожного кроку можна досягти за допомогою різних методів, кожен з яких має свої переваги та недоліки.

Оскільки ліпіди є внутрішньоклітинним продуктами, то процес виділення вимагає попередньої обробки з метою руйнування клітинної стінки перед екстракцією.

Добре відомо, що дріжджова клітинна стінка складається з мікрофібрил хітину, і що ці мікрофібрили відповідають за жорсткість стінки. Таким чином, щоб вивільнити різні фракції дріжджової біомаси, необхідно ефективно зруйнувати клітинну стінку до того, як проводити будь-яку екстракцію [24].

Загалом способи можна поділити на фізичні (серед яких механічні та теплові методи руйнування), хімічні (використання кислоти, лугу, катіонних детергентів) та біологічні (застосування ферментів).

Деякі методи дезінтеграції клітинної стінки дріжджів наведені у таблиці 1.5.

Таблиця 1.5 – Приклади методів руйнування дріжджових клітин [24,25].

	Метод	Принцип	Переваги	Недоліки
Фізичні	Струшування зі скляними кульками	Абразивна дія кульок на клітини	- Висока ефективність відключення - М'які умови - Швидкий час роботи - Легкість масштабування - Мінімізація розпаду ліпідів	- Висока потреба в енергії - Висока вартість - Потребує зневоднення
	Дія ультразвуку	Енергія, що виділяється в результаті кавітації, впливає на клітинну мембрану, яка неоправно пошкоджується.	- Короткий час роботи - Висока ефективність - Потенціал масштабування - Мінімізація розпаду ліпідів	- Висока потреба в енергії - Висока вартість
	Гомогенізатор високого тиску	Суспензію клітин пропускають через вузький отвір під високим тиском	- Можна обробляти великі о'єми рідкого зразка - Підходить для екстракції нейтральних ліпідів	- Висока потреба в енергії - Високі витрати на технічне обслуговування - Непридатний для високомолекулярних білків

Фізичні	Мікрохвильові печі	Мікрохвилі викликають вібрацію води та інших полярних молекул у вологій біомасі, що підвищить температуру всередині клітини. Внаслідок випаровування води, з'явиться тиск на клітинні стінки, що призведе до руйнування клітини.	- Висока ефективність - Відносно низька вартість - Короткий час роботи	•
	Обробка кислотами	Руйнування клітинної стінки внаслідок дії кислоти: порушення ліпід-білкової мембрани внаслідок зміни рН	- Низька потреба в енергії - Можна використовувати вологу біомасу	•
	Обробка лугами	Гідроліз полісахаридів та білків, що утворюють клітинну стінку	- Низька потреба в енергії - Можна використовувати вологу біомасу	•
Біологічні	Обробка ферментами	Гідроліз структури полісахаридів клітинної стінки	- Простота - Умови дії не високих температур - Низьке споживання енергії	•

Механічні методи сприяють повному руйнуванню клітин, що призводить до вивільнення загального внутрішнього вмісту у вигляді невеликих фрагментів, що ускладнює очищення цільового продукту. Немеханічна обробка (хімічні та біологічні) є більш м'якою та вибірковою,

але менш ефективна з точки зору відновлення внутрішньоклітинного продукту [24]. Найбільш широко використовуються механічні та хімічні методи обробки. Зокрема кислоти, такі як соляна чи сірчана або суміш хлороформу та метанолу, яка також використовується і для екстракції ліпідів, що вивільняються з біомаси [25]. Біологічні методи є доволі дороговартісними та незручними для масштабування, тому більше підходить для лабораторних експериментів або невеликих пілотних проектів. Хоч і хімічне вилучення є економічно ефективним і підходить для великомасштабного виробництва, проте воно має ряд недоліків через неекологічність та здатність провокувати корозію. Натомість механічні методи, хоч і є дороговартісними, мають високий вихід ліпідів і краще впливають на навколишнє середовище.

Механічна обробка в поєднанні з хімічними речовинами зараз набуває популярності. Наприклад, застосування ультразвуку при екстракції сумішшю хлороформу та метанолу (2:1) [25].

У будь-якому випадку при виборі методу руйнування клітин необхідно звернути увагу на переваги та недоліки, а також зважати на вимоги до характеристики готового продукту та технічну реалізацію.

Першою фракцією, яка виділяється з біомаси олійних дріжджів, зазвичай є ліпіди. Відомо декілька методів екстракції для вилучення внутрішньоклітинних ліпідів із дріжджових клітин. Слід підкреслити, що не існує процедур, які можна застосувати до всіх видів дріжджів. Тому процедура екстракції ліпідів повинна бути оптимізована для кожного конкретного штаму [25].

Методи Фолча або Блая та Дайера вважаються стандартними методами екстракції ліпідів з біологічних тканин та мікроорганізмів[26].

Фолч з своєю командою одними з перших розробили фазову систему хлороформ/метанол/вода (так званий метод «Фолча»), яка, за різними модифікаціями, продовжує вважатися класичним і найнадійнішим засобом кількісного вилучення ліпідів. В інтересах економії були розроблені менш

ресурсоемні методи. На сьогоднішній день найвідомішим є метод Блая і Дайера, який став одним із найбільш рекомендованих методів визначення загального ліпиду в біологічних тканинах, а також для інших типів проб. Основною перевагою методу Блая та Даєра є зменшення співвідношення хлороформ/метанол. Незважаючи на зменшення вмісту розчинника, вважається, що метод Блая і Дайера забезпечує відновлення $\geq 95\%$ загальних ліпідів [27]. Іншою перевагою даного методу є робота при низьких температурах, звідки впливає відсутність потреб у додатковій енергії. Проте серед недоліків обох методів є велика працемісткість та токсичність розчинників.

У наш час використання небезпечних речовин, таких як хлороформ і метанол, у хімічному секторі (лабораторії та промисловість) вважається великою проблемою, що сильно впливає на здоров'я та безпеку працівників і створює екологічні проблеми [26]. Саме тому вчені всього світу продовжують шукати альтернативні методи або менш агресивні розчинники.

Метод Сокслета. Безперервна екстракція у даному методі відбувається шляхом кип'ятіння розчинника зі зворотним холодильником. Після заповнення екстракційної камери екстракт переносять у киплячу колбу. Цей процес повторюють до тих пір, поки не очікується повне вилучення. Типовий час екстракції коливається від 12 до 24 годин, що робить дану техніку доволі трудомісткою. Час екстракції дозволила скоротити модифікація, запропонована Рендаллом [27].

Проте, даний спосіб все одно не підходить для зразків, що містять воду, є менш ефективний у екстракції полярних ліпідів та тривалим. Головним недоліком є можлива деградація термолабільних сполук, ризик окиснення ліпідів та токсичність розчинника.

Надкритична екстракція CO₂ ліпідів передбачає відділення ліпідів від біомаси з використанням надкритичного CO₂ (зеленого розчинника) як екстрагента. Ефективність в даному методі збільшують шляхом додавання

співрозчинника (етанолу) [27]. Зріджений CO_2 проникає в дріжджову біомасу та сприяє дифузії ліпідів до фази вуглекислого газу. Перевагами методу є нетоксичний загальноновизнаний безпечний розчинник, ефективна екстракція нейтральних ліпідів. Окрім того є можливість посилити екстракцію полярних ліпідів додаванням полярного розчинника. Серед недоліків вирізняють вартість обладнання, роботу під високим тиском, потребу спеціальних установок [24,25].

Прискорена екстракція розчинником також один з методів, що сприяє швидкому та ефективному вилученню ліпідів. Суть методу полягає у використанні підвищеної температури та тиску, що утримують рідкий розчинник вище температури кипіння, покращуючи екстракцію ліпідів [24, 27]. Даний метод дозволяє значно скоротити час екстракції та підвищити її ефективність. Проте серед недоліків методу є високі потреби в енергії та можливе розкладання термолабільних сполук.

Використання високого тиску та температури сприятиме окисненню ліпідів, що негативно позначиться на якості біодизеля. Тому важливо провести екстракцію безпечним розчинником за низьких температур. Відомі метанол, хлороформ та н-гексан забруднюють повітря, є токсичними та шкідливими. Натомість етанол, етилацетат, ізопропанол і н-пропанол є хорошими альтернативами оскільки вони класифікуються як розчинники класу 3, які мають менший ризик для здоров'я людини та не мають негативної генотоксичності та тривалої канцерогенності [27]. Крім того, етанол є одним із найчистіших серед цих розчинників, враховуючи відновлюваність і доступність.

Лін та його колеги [28] помітили, що етилацетат і етанол у співвідношенні 2:1 або 1:1 (об. / об.) забезпечують подібний вихід ліпідів порівняно з методом Фолча (хлороформом/метанолом, 2:1, об. / об.). Досліди проводилися для екстракції ліпідів зі жовтками і тваринними тканинами. Ліпідний профіль і склад жирних кислот були подібними до отриманих за допомогою реактиву Фолча.

Дослідження [29] продемонструвало, що етилацетат є доволі ефективний для вилучення ліпідів з олеогенних дріжджів виду *Rhodospiridium toruloides*, що робить можливим застосовувати його і для інших мікроорганізмів. Етилацетат біологічно розкладається, менш токсичний і більш екологічно чистий, ніж хлороформ і гексан.

Пробст з своєю командою [30] продемонстрували, що циклопентилметиловий ефір (далі ЦПМЕ) є альтернативним розчинником хлороформу та може ефективно витягувати триацилгліцерини з дріжджів *Lipomyces starkeyi*. Проте ЦПМЕ в 10 разів дорожчий за хлороформ, а його ефективність та селективність не є кращими, ніж у методі Блая та Дайера. Саме тому використання альтернативних «зелених розчинників» можливе тільки в лабораторних умовах для проведення експериментів та вивчення нових властивостей речовин.

Пробст у своїх дослідках [30] перевіряли не тільки ЦПМЕ як альтернативний розчинник, а також порівнювали систему хлороформ/метанол/вода з гексаном та чистим хлороформом (табл. 1.6). Профіль жирних кислот був постійний для всіх перевірених систем розчинників, зокрема жирні кислоти, екстраговані з *L. starkeyi* містили в основному олеїнову кислоту (C18:1) і пальмітинову кислоту (C16:0) з невеликою кількістю стеаринової кислоти (C18:0), пальмітолеїнова кислота (C16:1), лінолева кислота (C18:2) і ліноленова кислота (C18:3).

Таблиця 1.6 – Порівняння ефективності екстракції ліпідів *L. starkeyi* різними розчинниками [30].

Розчинник	Загальна маса екстрагованих ліпідів (мг) за допомогою 7,5 мл розчинника	Триацилгліцериди (мг)
Хлороформ:метанол:вода (1:2:0,8)	21,0±0,3	15,8±1,7
ЦПМЕ:вода (1:0,7)	21,02±1,1	10,0±0,5
ЦПМЕ	22,3±0,7	10,9±1,1
Гексан	18,8±0,3	12,8±0,8
Хлороформ	23,1±0,1	13,7±1,3

Вартість н-гексану та етилацетата на ринку не значно відрізняється від ціни хлороформа, в порівнянні з ЦПМЕ, а також дані розчинники є не такими токсичними як трихлорметан.

Отже, зважаючи на всі переваги та недоліки вищезазначених методів лізису клітинної стінки та екстракції ліпідів, у якості основного шляху руйнування клітинної стінки дріжджів для подальшої екстракції ліпідів з біомаси було обрано гомогенізацію за високого тиску через його простоту реалізації для масштабного виробництва, відсутність потреби в додатковому сушінні культуральної рідини та використання токсичних розчинників, екологічність, відносно невеликі затрати енергії, що робить його більш прийнятним у порівнянні з мікрохвильовим опроміненням чи ультразвуком. Серед головних переваг методу гомогенізації за високого тиску є відносно високий вихід ліпідів, у порівнянні з бісерним фрезеруванням чи іншими механічними методами.

У якості екстрагента для виділення ліпідів обрано етилацетат. З метою отримання біодизеля високої якості було обрано метод екстракції з попередньо висушеної на розпилювальній сушарці сировини.

1.4 Характеристика процесу трансестерифікації

Піроліз, мікроемульгування та трансестерифікація є основними можливими методами синтезу біодизеля. Перші два методи є дорогими та дають низькоякісне паливо, тоді як останній, переестерифікація, є найпоширенішим методом перетворення різного роду олій в біодизель [31].

Реакція трансестерифікації — це спосіб синтезу біодизеля, за якого триацилгліцерид реагує зі спиртом (метанолом або етанолом) у присутності каталізатора (рис. 1.3). На реакцію трансестерифікації впливають температура, концентрація каталізатора, частка використаного метанолу, вміст води в ліпідній фракції та час реакції [25].

Трансестерифікація є обов'язковим процесом для виробництва біодизеля, оскільки вона дозволяє зменшити в'язкість вихідної олії до рівня, ближчого до звичайного викопного палива [32].

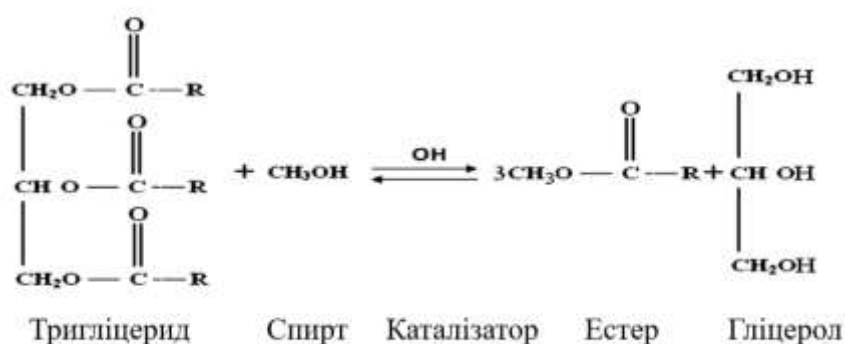


Рисунок 1.3 – Реакція каталізованої трансестерифікації [32]

Хімічно біодизель може бути синтезований за допомогою трансестерифікації з кислотним або лужним каталізом. Також останнім часом вивчається можливість проведення трансестерифікації ферментативним способом або за використання гетерогенних каталізаторів. Порівняння даних методів наведено у таблиці 1.7.

Таблиця 1.7 – Характеристика різних способів трансестерифікації

[25,32,33]

Показник	Хімічний метод			Ферментативний метод
	Лужний	Кислотний	Гетерогенний	
Приклади речовин	КОН, NaOH	HCl H ₂ SO ₄	Hb-цеоліт, TiO ₂ /ZrO ₂ , Al ₂ O ₃ /ZrO ₂ , цеоліти, лужноземельні оксиди тощо	Ліпази
Вихід біодизеля	>96%	>90%	>97%	>96%
Присутність води у субстраті	Впливає на хід реакції	Впливає на хід реакції	Не впливає на хід реакції	Не впливає на хід реакції
Швидкість реакції	Висока	Середня	Середня	Низька
Час реакції	6 хв. – 24 год.	6 хв. – 24 год.	6-10 год.	48 год.
Температура реакції	60-80°C	>100°C	49-150°C	20-50°C
Відновлення каталізатора	Складне	Складне	Просте	Просте
Можливість повторного використання	Немає	Немає	Є (до 6 разів)	Є
Вартість каталізатора	Низька	Низька	Висока	Висока
Забруднення стічних вод	Значне	Значне	Незначне	Незначне

Трансестерифікація з використанням кислот є тривалою, проте ефективною за високої концентрації вільних вищих жирних кислот [33].

Серед переваг використання лужних каталізаторів є швидкість, ефективність, менша здатність викликати корозію та менша вартість. Єдиним недоліком, пов'язаним з трансестерифікацією, що каталізується основами, є додаткові вимоги до очищення біодизеля та гліцерину для видалення основного каталізатора [32].

Щоб уникнути цього недоліку, дослідники також досліджували гетерогенні каталізатори на здатність каталізувати процес трансестерифікації. Проста фільтрація може відокремити гетерогенні каталізатори від кінцевих продуктів і таким чином їх можна повторно використовувати [32]. Гетерогенні каталізатори, хоч і не настільки економічні, мають перевагу в тому, що вони легко відновлюються в процесі, досягаючи конверсії до 90% після шестикратного повторного використання [25].

Ферментативні каталізатори більш екологічні, але час їх реакції може бути довшим і вони дорожчі. Але вони здатні вирішити такі питання, як проблема очищення гліцеролу, ферменти не чутливі до присутності вологи та вищих жирних кислот. Окрім того ліпази не потребують додаткових затрат енергії на проведення реакції та є селективними [33].

Зважаючи на всі «за» та «проти» для виробництва біодизеля з ліпідів *Lipomyces starkeyi* обрано хімічний метод трансестерифікації метанолом за присутності лужного каталізатора КОН через високу ефективність процесу, дешеву і перевірену технологію.

Таким чином для здійснення технологічного процесу отримання дріжджових ліпідів з подальшою їх переробкою в біодизель продуцентом обрано *Lipomyces starkeyi*, як вуглецевмісний компонент ПС пропонується гліцерол, для отримання ліпідів обрано одностадійну технологію культивування, виділення ліпідів з біомаси дріжджів методом екстракції етилацетатом з попереднім руйнування клітинних стінок шляхом гомогенізації під високим тиском та сушінням на розпилювальній сушарці, для переробки ліпідів в біодизель обрано спосіб трансестерифікації метанолом в присутності лужного каталізатора КОН.

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ПРОЦЕСИ ВИРОБНИЦТВА ЛІПІДІВ ДРІЖДЖАМИ

2.1 Метаболізм ліпідів у дріжджів *Lipomyces starkeyi*

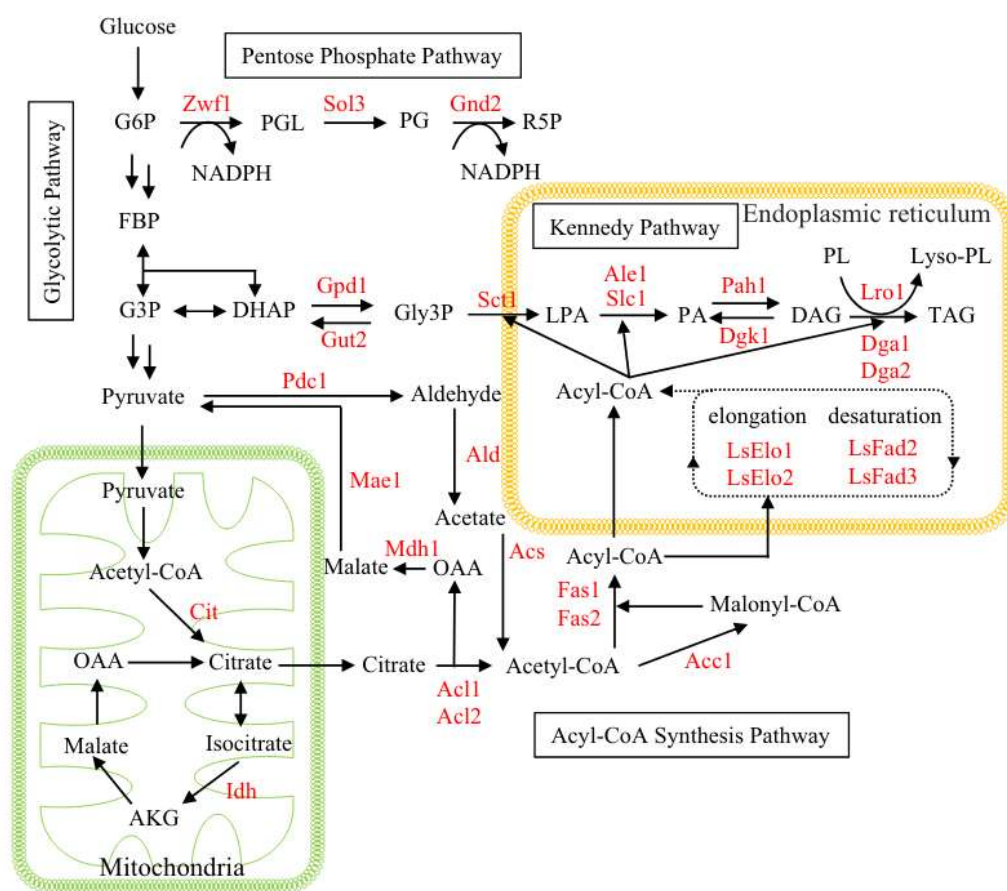
Lipomyces starkeyi є перспективним організмом для виробництва ліпідів з використанням різноманітних недорогих субстратів, таких як лігноцелюозна біомаса, крохмальні матеріали, гліцерин, меляса та інші. Цей вид відзначається високою толерантністю до інгібіторів бродіння і має підходящий жирнокислотний склад ліпідів для виробництва високоякісного біодизеля. Крім того, *L. starkeyi* практично не споживає клітинні ліпіди, що сприяє його ефективному використанню для виробництва ліпідів [34].

Внаслідок росту на середовищі з обмеженим вмістом азоту разом із надлишковими джерелами вуглецю, дріжджові клітини синтезують та накопичують ліпіди у вигляді триацилгліцеридів (ТАГ). В такий спосіб клітини реагують на стрес та накопичують енергію задля виживання. Виділяють два шляхи важливі для синтезу ТАГ: шлях синтезу ацил-КоА та шлях Кеннеді від гліцерин-3-фосфату до ТАГ (рис. 2.1) [35].

Першим етапом синтезу ТАГ є перетворення гліцерин-3-фосфату в лізофосфатидову кислоту (ЛФК) з ацилтрансферазою як каталізатором. Згодом відбувається ацилювання ЛФК з утворенням фосфатидної кислоти (ФК). Під дією фосфатази фосфатної кислоти остання дефосфорилується з утворенням діацилгліцерину (ДАГ). Потім ТАГ утворюється після ацилювання ДАГ у положенні шляхом ацил-КоА-незалежної або ацил-КоА-залежної реакції. В ацил-КоА-незалежній реакції, гліцерофосфоліпід є донором ацильної групи, а фосфоліпід ДАГ ацил-трансфераза каталізує процес. Натомість в ацил-КоА-залежній реакції, ацил-КоА діє як кінцевий донор ацильної групи, а ацилтрансферази ДАГ відповідають за каталіз [36].

					КББЕ.БМ01.ПЗ									
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	БІОХІМІЧНІ ПРОЦЕСИ ВИРОБНИЦТВА ЛІПІДІВ ДРІЖДЖАМИ					Лім.		Арк.	Аркушів	
Розроб.		Гоман Є.К.												
Перевір.		Зубченко Л.С.											39	85
Реценз.										КПІ ім. І.Сікорського ФБТ				
Н. Контр.														
Затверд														

Синтез жирних кислот (ЖК) в мікробних клітинах потребує ацетил-КоА, який діє як попередник ЖК, і достатнього запасу НАДФН для забезпечення відновлюваності синтезу.



Acc1, ацетил-КоА-карбоксилаза; Acl1/Acl2, АТФ-цитрат ліаза; Acs, ацетил-КоА-синтетаза; АKG, α -кетоглутарат; Ale1, ацилтрансфераза для лізофосфатидилетаноламіну; Ald, альдегіддегідрогеназа; Цит, цитратсинтаза; DAG, діацилгліцерин; Dga1/Dga2, діацилгліцерол-ацилтрансфераза; Dgk1, діацилгліцеролкіназа; DHAP, дигідроксіацетонфосфат; Fas1/Fas2, субодиниця синтази жирних кислот; FBP, фруктоза-1,6-біфосфатаза; G3P, гліцеральдегід 3-фосфат; G6P, глюкоза-6-фосфат; Gly3P, гліцерин-3-фосфат; Gnd2, 6-фосфоглюконат дегідрогеназа; Gpd1, Gly3P дегідрогеназа; Gut2, Gly3P дегідрогеназа; Idh, ізоцитратдегідрогеназа; LPA, лізофосфатидна кислота; Lro1, фосфоліпід: діацилгліцерол ацилтрансфераза; LsElo1/LsElo2, жирна кислота елонгаза; LsFad2/LsFad3, десатураза жирних кислот; Mae1, яблучний фермент; OAA, оксалоацетат; PA, фосфатидна кислота; Pah1, фосфатидатфосфатаза; PG, 6-фосфоглюконат; PGL, 6-фосфоглюконолактон; PL, фосфоліпід; R5P, рибулозо-5-фосфат; Sct1, гліцерин-3-фосфат ацилтрансфераза; Slc1, ацилтрансфераза лізофосфатної кислоти; Sol3, 6-фосфоглюконолактоназа; TAG, триацилгліцерин; Zwfl, G6P 1- дегідрогеназа

Рисунок 2.1 – Схема ліпогенезу в олійних дріжджах *Lipomyces starkeyi*[35].

Синтез ЖК в клітині відбувається за рахунок подовження ацетил-КоА, дегідратацію та повторне відновлення. Основний етап передбачає конденсацію молекул ацетил-КоА та малоніл-КоА за участю ферменту

ацетил-СоА-карбоксилази, що призводить до утворення моноіл-СоА. Після цього ацетил-СоА поєднується з ацетил-АСР, утворюючи ацетил-АСР, а потім проходить послідовні реакції дегідратації та повторного відновлення, що призводять до подовження ланцюга на два вуглецеві атоми. Ці реакції каталізуються ферментом жирної кислоти-синтазою, при цьому для кожного етапу подовження необхідні дві молекули НАДФН як кофактори відновлення. Коли ланцюг досягає потрібної довжини, деякі жирні кислоти можуть піддаватися десатурації, що призводить до утворення ненасичених зв'язків [36].

Шляхи, які перешкоджають накопиченню ліпідів у мікробних клітинах, включають процеси, такі як β -окислення жирних кислот, синтез фосфоліпідів та перетворення фосфоенолпіровиноградної кислоти в щавлевооцтову кислоту [36]. Це вказує на складність контролю механізмів, що відповідають за обмін ліпідів в клітинах мікроорганізмів. Проте перекриття чи можливість керування вищезгаданими шляхами дозволить збільшити вихід ліпідів та інших речовин, необхідних для виробництва палива.

Результати роботи вчених [34] демонструють, що комбіноване використання різних джерел вуглецю та вивчення шляху зворотного β -окислення має високий потенціал для покращення теоретичного виходу ліпідів в олеогенних дріжджах.

Цзячжан Лян і Хуймін Чжао повідомили, що зворотне β -окислення представляє ефективну та універсальну стратегію для синтезу широкого спектру видів палива та хімікатів. Першу успішну зміну циклу β -окислення вдалося здійснити в *Saccharomyces cerevisiae*. Після обширного клонування генів і аналізів ферментативної активності в цитозолі дріжджів було функціонально сконструйовано зворотний шлях β -окислення, що призвело до синтезу n-бутанолу, середньоланцюгових жирних кислот і етилових ефірів [37].

Отже, успіхи в змінах шляху β -окислення жирних кислот в *Saccharomyces cerevisiae* говорить про можливість модифікувати метаболізм і *Lipomyces starkeyi* також. У майбутньому ці стратегії збільшення кількості синтезованих ліпідів слід експериментально перевірити, а також детальніше вивчити метаболічну модель *L. starkeyi* для більш точного та повного прогнозування можливих змін.

2.2 Характеристика біодизеля, отриманого з ліпідів дріжджів *Lipomyces starkeyi*

Біодизель – вид біопалива, що є сумішшю алкілових ефірів жирних кислот. Використовується як замітник або як складова дизельного палива. Це екологічно чисте альтернативне паливо для дизельних двигунів, що має ряд переваг:

- часто походить з олій рослин чи мікроорганізмів і, як таке, його згоряння не збільшує поточного чистого атмосферного рівня CO₂;
- може бути вироблене на внутрішньому ринку, що зменшить імпорт нафти;
- піддається біодеградації та у порівнянні зі звичайним дизельним паливом, викиди при його згорянні мають зменшений рівень оксидів вуглецю та азоту [38].

Серед основних недоліків біодизеля є вища вартість, нижча калорійність, проблема окиснення при зберіганні, що пов'язана з наявністю кратних зв'язків, важкість транспортування, негативний вплив на двигун тощо. Важливо покращувати дані параметри та наближати до показників викопного палива.

Для використання в немодифікованих дизельних двигунах біодизель має відповідати вимогам державного стандарту або європейського EN 14214 для автомобільного палива. Серед головних показників, які які забезпечують якість біодизеля, оцінюють густину, кінематичну в'язкість,

температуру спалаху, температуру замерзання, цетанове число, окисну стабільність, йодне число, кислотне число, вміст домішок, частку ненасичених кислот тощо[14].

Біодизель, отриманий при використанні запропонованої технології, являє собою чисту, жовтувату, нерозчинну у воді в'язку рідину з легким мильним запахом та з вмістом метилових естерів C16-C20 жирних кислот у продукті не менше 96,5-97%. Детальна характеристика біодизеля подана в таблиці 2.1.

					КББЕ.БМ01.ПЗ	Арк.
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		43

Таблиця 2.1 – Технічна характеристика біодизеля, виготовленого з використанням ліпідів дріжджів *Lipomyces starkeyi* [39,40,41,4243].

Властивість	Біодизель	Показники згідно з ДСТУ 6081:2009 та EN 14214
Густина при температурі 15 °С, кг/м ³	870	860-900
Кінематична в'язкість при температурі 40 °С, мм ² /с	4,5	3.5-5.0
Температура спалаху, °С	>101	<120
Температура замерзання, °С: -літо -зима	0 -20	0 -20
Вміст Сульфуру, мг/кг	<10	<10
Зольність, % (м/м)	0,02-0,025	<0,02
Вміст води, мг/кг	<500	<500
Вміст механічних домішок, мг/кг	<24	<24
Кислотне число, мг КОН/г	0,45	<0,5
Йодне число, г йоду/100 г	45	<120
Цетанове число	65	>51
Окисна стабільність при 110°С, год	26	>6
Розчинність у воді	Не розчинний	Не розчинний
Вміст лінолевої кислоти, %	<12%	<12% (для B100)

Згідно з запропонованою технологією та схемою виробництва біодизель отримують шляхом трансестерифікації дріжджових ліпідів метанолом за присутності лужного каталізатора. Отриманий готовий продукт відповідає вимогам ДСТУ 6081:2009 «Паливо моторне. Ефіри метилові жирних кислот олій і жирів для дизельних двигунів. Технічні вимоги».

РОЗДІЛ 3. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

3.1. Сировина і матеріали

Таблиця 3.1. – Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Назва	НТД для перевірки матеріалу	Показники, що нормуються	Примітки
Основна сировина та матеріали			
Солі (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	Згідно НТД України	Вміст домішок, вологість та інші показники згідно НТД	Приготування поживного середовища
Гліцерин	ДСТУ ISO 1614:2003 Гліцерин технічний. Відбір проб і методи випробування. Загальні вимоги (ISO 1614:1976, IDT); ГОСТ 6824-96 Гліцерин дистильований. Технічні умови.	Колір, прозорість, густина, масова частка чистого гліцерина та інше згідно НТД.	Приготування поживного середовища

					КББЕ.БМ01.ПЗ									
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ					Літ.	Арк.	Аркушів		
Розроб.	Гоман Є.К.											45	85	
Перевір.	Зубченко Л.С.									КПІ ім.І. Сікорського ФБТ				
Реценз.														
Н. Контр.														
Затверд														

Продовження Таблиці 3.1

Вода питна	ДСТУ 7525:2014 Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості; ДСанПіН 2.2.4-171-10 Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною	Кольоровість, каламутність, запах, рівень рН, жорсткість, вміст солей та мікроорганізмів і ін. параметри згідно НТД	Приготування поживного середовища, дезінфікуючих розчинів та реагентів
Допоміжна сировина			
Етилацетат	НТД України	Колір, прозорість, домішки тощо.	Приготування розчину для екстракції ліпідів
Гідроксид калію	ТУ 20.13.25-025-5227004-2015 ГОСТ 24363-80 ГОСТ 9285-78	Усі показники якості відповідно до НТД та виду сировини	Приготування розчину метоксиду для проведення трансестерифікації
Гідроксид натрію	ДСТУ ISO 3196-2001 Натрію гідроксид технічний.	Усі показники якості відповідно до НТД та виду сировини	Приготування розчину для миття обладнання
Соляна кислота	ДСТУ 2904-94 (ГОСТ 857-95) Кислота соляна синтетична технічна. Технічні умови.	Усі показники якості відповідно до НТД та виду сировини	Приготування розчину для промивання біодизеля, приготування розчину для миття обладнання
Метанол	ДСТУ 3057-95 (ГОСТ 2222-95) Метанол технічний. Технічні умови	Усі показники якості відповідно до НТД та виду сировини	Приготування розчину метоксиду для проведення трансестерифікації

Напівпродукти			
Поживне середовище	НТД, виробничий регламент	Показники відповідно до технології виробництва	Основа для культивування
Інокулят	НТД, виробничий регламент	Показники відповідно до технології виробництва	Культивування
Музейна культура дріжджів	НТД, виробничий регламент	Відповідність штаму	Штам дріжджів для виробництва інокулята
Культуральна рідина	НТД, виробничий регламент	Показники відповідно до технології виробництва	Перед виділенням цільового продукту

3.2 Опис технологічного процесу виробництва дріжджових ліпідів з подальшим отриманням біодизеля

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка приміщень. Робочим персоналом виробництва проводиться попередній огляд обладнання та комунікацій відповідно до вимог регламенту з експлуатації. Перевірка на герметичність обладнання та трубопроводів проводиться перед кожним запуском виробничої лінії повітрям або водою під надлишковим тиском.

ДР 1.2. Підготовка дезінфікуючих розчинів. Мийні та дезінфікуючі розчини лугу 10% NaOH та кислоти 10% HCl готуються у реакторах-змішувачах Р-1 та Р-5. Для приготування використовується питна вода з трубопроводу, а також концентрований розчин кислоти та каустична сода, які подаються через дозатори Д-2 і Д-6 відповідно.

ДР 1.3. Миття та дезінфекція обладнання. Через усе технологічне обладнання пропускають миючі та дезінфікуючі засоби. Миття ферментера

й іншого обладнання здійснюється через миючу головку. Миття розчином луку здійснюється при температурі 80°C, миття кислотою при температурі 20°C. Відпрацьована вода й розчини направляються до ЗВ14.

ДР 1.4. Підготовка води. Вода в системах водопостачання не відповідає показникам, які необхідно досягнути для використання води в технології, тож водопровідна питна вода потребує додаткової очистки крізь систему фільтрів та установки зворотнього осмосу задля корегування рН, твердості, вмісту неорганічних речовин тощо. Очищена вода подається до ДР 1.5, ДР3.1, ДР3.2, ДР 5.2.

ДР 1.5. Підготовка водяної пари.

Водяна пара виробляється в котельні. Отриману пару направляють до ДР1.6 та ТП 3.3., ТП9.3.

ДР 1.6 Стерилізація основного обладнання та комунікацій. Стерилізацію проводять шляхом подання гострої пари при температурі 131°C, тиску 0,2 МПа, протягом 30 хв. Після стерилізації утворений конденсат подається до ПВ 13.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР2.1. Забір повітря з атмосфери. При визначенні місця забору атмосферного повітря необхідно враховувати фактори можливих забруднень, зокрема промислові викиди, автотранспорт тощо. Тому процес забору повітря проводять за допомогою повітрязабірника ПЗ-9 з точкою забору 5 м вище рівня землі при температурі 20 °C.

ДР 2.2. Компресування повітря. На даному етапі застосовується компресор В-10. з продуктивністю до 190 м³/хв зі стисненням повітрям до 2,5 кПа.

ДР 2.3. Очистка повітря на фільтрах грубої очистки. Для забезпечення чистоти повітря від пилу та інших механічних часток використовується механічний сітчастий фільтр грубої очистки Ф-11 з ефективністю затримання часток 95%.

ДР 2.4. Очистка повітря на індивідуальних фільтрах. Очистка повітря на індивідуальних фільтрах дозволяє ретельніше доочистити повітря та позбавитися небажаних мікроорганізмів. В даній роботі пропонується використання фільтра Ф-12 типу НЕРА [44] для створення антибактеріального середовища, адже даний індивідуальний фільтр дозволяє очистити повітря з ефективністю 99,97% від часточок менше 10 мкм. Очищене повітря подається для аерації середовища під час вирощування посівного матеріалу ДР4.2, та виробничого культивування на ТП6.

ДР 3. Приготування поживного середовища

Для культивування дріжджів та отримання посівного матеріалу необхідно приготувати поживне середовище, що забезпечить високі показники росту та накопичення біомаси.

ДР 3.1. Змішування компонентів поживного середовища.

У Р-13 проводиться змішування компонентів поживного середовища, що задаються через дозатор Д-15. Окремо у ємність через Д-14 подають очищений гліцерол – основне джерело вуглецю, що отримують на етапі трансестерифікації під час виробництва біодизеля. Потужність мішалки – 1 кВт, частота обертів – 200 об/хв.

ДР 3.2. Приготування розчину для регулювання рН. Для регулювання та підтримки рівня рН у середовищі під час культивування використовується розчин КОН. Приготування розчину відбувається у реакторі-змішувачі Р-17, куди подається попередньо очищена вода та розчин КОН через об'ємно-ваговий дозатор Д-18. Після приготування розчин стерилізується.

ДР 3.3. Стерилізація поживного середовища.

Стерилізація поживного середовища є вкрай необхідним етапом. Адже дозволяє запобігти контамінації. Стерилізують поживне середовище гарячою парою під тиском протягом 30 хвилин, тиск – 0,2 МПа, при температурі – 131°C в автоклаві А-20.

ДР 3.4. Охолодження поживного середовища.

Перед подачею інокулята та початку процесу культивування поживне середовище необхідно охолодити до температури, за якої відбуватиметься культивування (28-30 °С). Для цього поживне середовище подається в кожухотрубний теплообмінник Т-22, звідки потім направлятиметься до ТП6.

ДР 4. Приготування посівного матеріалу

Оскільки об'єм ферментера доволі великий, то посівного матеріалу потрібна також велика кількість. У зв'язку з цим приготування інокулята заплановано в два етапи.

ДР 4.1. Культивування в колбах качалках.

Флакони з музейною культурою *Lipomyces starkeyi*, що зберігалися при температурі -80°C, розморожують протягом 15 хвилин при кімнатній температурі вносять матеріал у попередньо підготовлені колби з поживним середовищем. Культивують в колбах-качалках протягом 18-24 год при 30°C, 300 об/хв, рН = 5,5. Потім вміст колб направляють в І-24.

ДР 4.2. Культивування в інокуляторі.

Інокулят готують в інокуляторі І-24 шляхом перенесення туди розчину з колб-качалок через дозатор Д-25 та подачею за допомогою Д- 27 поживного середовища. Розчин КОН подається через Д-26. Для культивування обрано інокулятор для вирощування посівного матеріалу з лопатевою мішалкою та кільцевим барботером. Культура вирощується протягом 18-24 год при 30°C, 300 об/хв, рН = 5,5. Зі стадії ДР-2.4 у інокулятор подається очищене повітря через барботер. Після нарощення посівний матеріал подається в Р- на етап виробничого культивування.

ДР 5. Приготування розчинів для одержання біодизеля

ДР 5.1. Приготування розчину метоксиду.

Розчин метоксиду необхідний на етапі трансетерифікації. Для підвищення виходу етерів метанол беруть у надлишку, а каталізатор становить 10% від маси спирту.

					КББЕ.БМ01.ПЗ	Арк.
Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		50

Приготування розчину відбувається за нагрівання до 70°C. Метанол подають через дозатор Д-30 , а КОН твердий через Д-31 відповідно. Змішування речовин відбувається до досягнення гомогенного розчину. Розчин метоксиду відправляється на ТП10.1.

ДР 5.2. Приготування розчину соляної кислоти.

Оскільки суміш метилових ефірів міститиме залишки каталізатора, гліцеролу, мила та інших домішок, то вона потребуватиме очищення. Для того, щоб позбутись домішок готують 10% розчин соляної кислоти. Розчин готують шляхом розведення концентрованої кислоти у реакторі-змішувачі Р-33. Через дозатор Д-34 подають кислоту до очищеної води, що надходить від ДР1.4. Перемішують розчин 10 хв за допомогою мішалки з інтенсивністю 100 об/хв.

ТП 6. Виробниче культивування

Культивування відбувається у ферментері Р-36 барботажного типу з механічним перемішуючим пристроєм, в ролі якого – дволопатева мішалка. У ферментер подають через дозатор Д-38 поживне середовище з Т-22 та інокулят через Д-39 з І-24. Тип культивування – періодичне (одноступеневе) з підживленням.

Масообмін в ферментері здійснюється не тільки за рахунок роботи мішалки ($n=0,67 \text{ c}^{-1}$), але й використання барботера. Барботажне повітря надходить з швидкістю 60 $\text{дм}^3/\text{год}$. Рівень аерації складає 25%. Культивування триває 5-7 діб при температурі близько 28°C при рН 5,4. Для підтримки рівня рН через дозатор Д-37 подається підготовлений розчин КОН. Додаткове підживлення гліцеролом здійснюється через Д-40. Концентрація гліцеролу підтримується на рівні 60 $\text{г}/\text{дм}^3$. Температурний режим підтримується за рахунок надходження у сорочку ферментера теплоносія. Вид теплоносія регулюється за допомогою датчика температури.

ТП 7. Гомогенізація під високим тиском

За допомогою насосу Н-41 культуральна рідина подається у гомогенізатор Г-42. Тиск становить 15 МПа. Гомогенізація забезпечує руйнування клітинних стінок та пришвидшує вихід ліпідів. Далі суспензія надходить на етап сушіння до ТП8.

ТП 8. Сушіння на розпилювальній сушарці

Для покращення ефективності екстракції біомасу попередньо висушують. Для сушіння обрана розпилювальна сушарка, адже для її роботи не потрібно додатково фільтрувати суспензію, бо на сушіння подається рідина. Температура сушіння становить 105°C. Завдяки відносно низькій температурі, та малій тривалості контакту культуральної рідини з теплоносієм вдається не допустити окиснення ліпідів. Тиск підтримується на рівні 15 МПа. У якості теплоагента використовується попередньо нагріте гаряче повітря. Внаслідок сушіння утворюється забруднений конденсат, який направляють на ПВ11. Суху біомасу дріжджів відвантажують до Р-47 на етап екстракції.

ТП 9. Екстракція ліпідів

ТП 9.1. Екстракція ліпідів.

Екстракцію проводять за допомогою етилацетату, який подають через дозатор Д-49 в екстрактор Р-47. Співвідношення екстрагент:тверда речовина становить 10:1.

ТП 9.2. Розділення суміші ліпідів і біомаси шляхом центрифугування.

Щоб відокремити суміш екстрагованих ліпідів від залишків біомаси використовують центрифугу Ц-51. Біомасу подають на ПВ11, а суміш екстрагента та ліпідів перекачується за допомогою насосу в випарний апарат В-53 на наступний етап розділення.

ТП 9.3. Розділення суміші ліпідів і екстрагента шляхом випарювання.

Розділення екстрагента та ліпідів проводять шляхом випарювання при тиску 0,6 МПа за температури близькій до кипіння етилацетата 75°C. Отриманий конденсат збирають, етилацетат регенерують та направляють до Р-47.

ТП 10. Приготування біодизеля

Приготування біодизеля здійснюється за допомогою трансестерифікації - хімічного шляху з використанням метанолу та гідроксиду калію (розчину метоксиду), що подається з ДР 5.

ТП 10.1. Трансестерифікація.

Суміш ліпідів надходить в Р-58 через дозатор, а метоксид подається через Д-59 до ємності реактора Р-57, оснащеного сорочкою для забезпечення протікання реакції при температурі 60°C.

ТП 10.2. Відстоювання та сепарація.

Після проведення процесу естерифікації, отримана суміш направляється у сепаратор С-61. Після 1,5-2 год відстоювання гліцеринову фракцію, яка є побічним корисним продуктом, відокремлюють та направляють на доочистку до ПВ 12 з метою подальшого використання як джерела вуглецю на стадії приготування поживного середовища. Суміш естерів перекачують за допомогою насосу Н-62 в реактор Р-63 для проведення очистки.

ТП 10.3. Очистка та промивка біодизеля. Біодизель, після відділення від гліцеролу, направляють до реактора Р-63. В реактор подають розчин соляної кислоти через Д-64 для очистки біодизеля від домішок та воді у співвідношенні 1:1. Після відстоювання протягом 1 години відпрацьовану воду направляють на етап знешкодження ЗВ14.

ТП 10.4. Осушення біодизеля. Після переливання біодизеля у збірник Р-65, відбувається його відстоювання протягом 2 діб. Протягом цього періоду залишки води, які залишилися після попередньої технологічної операції, осідають на дно ємності, і потім видаляються за допомогою

системи ЗВ14. Після цього осушений біодизель, готовий до реалізації, відправляють на відвантаження споживачам.

ПВ 11. Переробка відходів

На дану стадію поступають:

Відпрацьована вода, конденсат та етилацетат, що піддаються регенерації на направляються у виробничий цикл.

Біомаса дріжджів від ТП піддається термічній десольвентизації та реалізовується для виробництва біометану.

ПВ 12. Очищення гліцерину

Гліцерин, що подається від ТП 10.2, потребує доочищення задля подальшого використання його в ролі основного джерела вуглецю. Гліцерин піддають фільтруванню, нейтралізації та дистиляції для видалення легколетючих домішок і води.

ПВ 13. Регенерація теплоносіїв

Відпрацьовані теплоносії з ТП7, ТП8, ДР9.1, ТП12.1, конденсат від ДР1.3, ДР5 та відпрацьований холодоагент від ТП11.2 подаються на регенерацію де за рахунок рекуперації тепла в теплообміннику відновлюються їх необхідні робочі температури.

ЗВ 14. Знешкодження відходів

На дану стадію поступають:

Фільтрувальні елементи, що піддаються утилізації згідно норм.

Відпрацьована вода та дезрозчини після миття обладнання скидаються в міську каналізаційну мережу, попередньо проходячи передочистку на очисних спорудах виробництва для доведення показників до норм скиду в каналізаційну мережу міста.

3.3. Матеріальний баланс

Таблиця 3.2. – Матеріальний баланс виробництва біодизеля з дріжджових ліпідів.

Стадія	Використано		Отримано	
	Найменування	Маса, кг	Найменування	Маса, кг
Стадія отримання поживного середовища	Вода	913,99	Поживне середовище	980
	Гліцерол (80%)	60		
	KH ₂ PO ₄	1		
	Na ₂ HPO ₄	1		
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4		
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,04		
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,1		
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,08		
	CuSO ₄ ·7H ₂ O	0,02		
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,36		
	Екстракт дріжджів	2		
	(NH ₄)MoO ₇	0,01		
Стадія отримання інокулята	Поживне середовище	80	Інокулят	100
	Музейна культура вирощена в колбі	20,5	Втрати	0,5
Стадія виробничого культивування	Поживне середовище	900	Культуральна рідина	995
	Інокулят	100	Втрати (0,5%)	5
Стадія сушіння біомаси	Культуральна рідина	995	Суха біомаса	300
			Вода	695
Стадія виділення ліпідів з біомаси	Суха біомаса	300	Ліпіди	150
			Залишки біомаси	150
	Етилацетат	200	Регенована суміш розчинника	200

Продовження Таблиці 3.2

Стадія трансетерифікації	Суміш ліпідів	150	Суміш ефірів	160
	Метанол	37,5	Гліцерол	30
	Каталізатор KOH	2,5		
Стадія очистки біодизеля	Кислота HCl 13%	8	Біодизель	158
	Вода	160	Розчин домішок після промивки	170
	Суміш ефірів	160		
Всього:	4093,5		4093,5	

3.4. Контроль виробництва

Таблиця 3.3 – Контроль виробництва

Стадія	Контрольний параметр	Частота контролю	Норма згідно технологічного регламенту	Спосіб контролю, тип приладу
ДР 1.2 Підготовка дезінфікуючих розчинів, Кх	Концентрація NaOH	Після приготування розчину	C (NaOH) = 10%	Аналіз в лабораторії
	Концентрація HCl	Після приготування розчину	C (HCl) = 10%	Аналіз в лабораторії
ДР 1.3 Миття та дезінфекція обладнання, Кх	pH змива	Після миття	pH 7	Аналіз змива в лабораторії, pH-метр
ДР 1.4 Підготовка води, Кх	Показники згідно регламенту	Після установки очистки води 2 рази/місяць	pH 7, E = 98%	Аналіз в лабораторії
ДР 1.5 Підготовка водяної пари, Кт	Тиск	Під час роботи котельні	0,2 МПа	Манометр
	Температура		t = 131°C	Термометр
ДР 1.6 Стерилізація основного обладнання та комунікацій, Кт, Км	Температура	Впродовж стерилізації	t = 131°C	Термометр
	Час		30 хв	Годинник
	Тиск		0,2 МПа	Манометр
ДР 2.2 Компресування повітря, Кт	Температура	Впродовж процесу	t = 20°C	Термометр

Продовження Таблиці 3.3

ДР 2.3 Очистка повітря на фільтрах грубої очистки, Кт, Км	Чистота повітря	Після очистки	Е = 95%	Аналіз на перевірку ступеня очистки
ДР 2.4 Очистка повітря на індивідуальни х фільтрах, Кт, Км	Чистота повітря	Після очистки	Е = 99,97%	Аналіз на перевірку ступеня очистки
ДР 3.1 Змішування компонентів ПС, Кт	Маса/об'єм компонентів поживного середовища	Перед завантаження м до ферментера	Згідно рецептури та технологічног о регламенту	Ваги, дозатор
ДР 3.2 Приготування розчину для регулювання рН, Кт	Концентраці я КОН	Після приготування розчину	С (КОН) = 10%	Аналіз в лаборатор ії
ДР 3.3 Стерилізація ПС, Кт, Км	Температура	Впродовж стерилізації	t = 131°C	Термомет р
	Час		30 хв	Годинник
	Тиск		0,2 МПа	Манометр
ДР 3.4 Охолодження поживного середовища, Кт	Температура	Після охолодження	t = 35-40°C	Термомет р
ДР 4.2 Культивуванн я в інокуляторі, Кт, Кх, Км	Температура	Впродовж культивуванн я	t = 30°C	Термомет р
	рН		5,5	рН-метр
	Час		22-24 год	Годинник

Продовження Таблиці 3.3

ДР 5.1 Приготування розчину метоксиду, Кх, Кт	Температур а	Після приготуванн я розчину	t = 70°C	Термометр
ДР 5.2 Приготування розчину соляної кислоти, Кх, Кт	Концентрац ія НСІ	Після приготуванн я розчину	С (НСІ) =10%	Аналіз в лабораторії
ТП 6 Виробниче культивування, Кх, Кт, Км	Температур а	Впродовж культивуван ня	t =28°C	Термометр
	pH		5,5	pH-метр
	Час		5-7 діб	Годинник
	Концентрац ія гліцеролу		C _{гл} = 60 г/дм ³	Концентратом ір
ТП 7 Гомогенізація під високим тиском, Кт	Тиск	Під час проведення гомогенізації	P = 15 МПа	Манометр
ТП 8 Сушіння на розпилювальній сушарці, Кт	Температур а	Під час сушіння	t =105° С	Термометр
	Тиск		0,6 МПа	Манометр
ТП 9.1 Екстракція ліпідів, Кт	Час	Впродовж екстракції	45 хв	Годинник
ТП 9.3 Розділення суміші ліпідів і екстрагента, Кт	Температур а	Впродовж випарювання	t =75°C	Термометр
ТП 10.1 Трансестерифікаці я, Кт, Кх	Температур а	Впродовж реакції	t =60°C	Термометр
	Час		1,5-2 год	Годинник
ТП 10.4 Осушення біодизеля, Кх, Кт	Якісний аналіз біодизеля	1 раз / добу		ДСТУ 6081:2009

РОЗДІЛ 4. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІПІДІВ

4.1. Обґрунтування вибору виробничого ферментера

Ферментер – основне обладнання для біотехнологічного виробництва, адже культивування мікроорганізмів з метою отримати необхідний цільовий продукт відбувається саме в ньому.

В залежності від виду ферментації (аеробній чи анаеробній; періодичній, періодичній з підживленням чи безперервній; твердофазній чи рідкофазній) змінюються конструктивні особливості апарата. На вибір ферментера також впливають особливості біологічного агента та його потреби [45].

Зважаючи на обрану технологію вирощування дріжджів *Lipomyces starkeyi*, а саме – періодичний режим культивування з підживленням), ферментер має відповідати наступним вимогам:

1. Бути економічно та енергетично ефективним;
2. Наявність системи аерації для забезпечення доступу до кисню та додаткового перемішування рідини;
3. Наявність механічного перемішуючого пристрою для рівномірного розподілу речовин та для забезпечення інтенсифікації процесу масо- та енергообміну;
4. Забезпечувати необхідні температуру та тиск для проведення культивування;
5. Мати системи для подачі необхідних поживних речовин;
6. Мати достатній робочий об'єм для вирощування великої кількості дріжджів, що використовуються для виробництва ліпідів для біодизеля;

					КББЕ.БМ01.ПЗ						
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІПІДІВ	Літ.		Арк.	Аркушів		
Розроб.		Гоман Є.К.						60	85		
Перевір.		Зубченко Л.С.									
Реценз.						КПІ Ім. І. Сікорського ФБТ					
Н. Контр.											
Затверд											

7. Можливість контролю та керування критичними параметрами процесу: температура, тиск тощо;

8. Мати просту конструкцію та забезпечувати герметичність задля попередження контамінацій.

Типовим ферментером, що здатен задовольнити вищезгадані вимоги, є ферментер з комбінованим введенням енергії: апарат циліндричної форми з сферичною кришкою та днищем, виготовлений з нержавіючої сталі та оснащений механічним перемішуючим пристроєм та барботером. Даний ферментер є оптимальним для культивування аеробних біологічних агентів, адже може бути налаштований на будь-який оптимальний гідродинамічний режим (рис.4.1) [46].

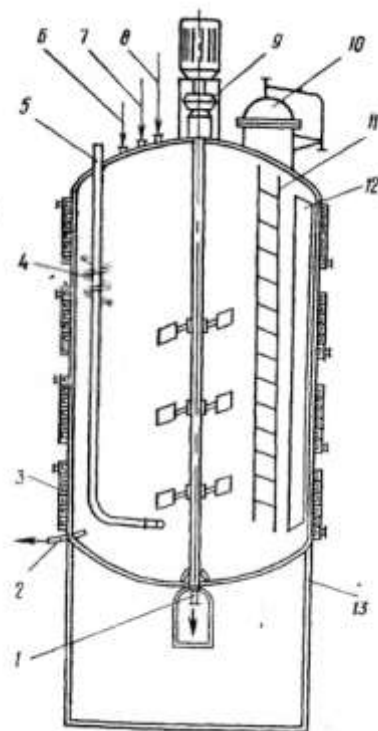


Рисунок 4.1 – Схема ферментера барботажного типу з механічним перемішуючим пристроєм:

1 – штуцер для зливу, 2 – штуцер для відбору проб, 3 – сорочка, 4 – змійовик, 5 – барботер, 6 – лінія подачі титруючого розчину, 7 – лінія подачі піногасника, 8 – лінія загрузки, 9 – мішалка з приводом, 10 – люк-лаз, 11 – драбина, 12 – відбійник, 13 – опора [46].

Співвідношення висоти та діаметра в таких ферментерах зазвичай коливається від 2 до 2,5. Дані апарати оснащені електроприводом перемішуючого пристрою, що складаються з електродвигуна, редуктора, муфти, підшипника та торцевого ущільнення. Поряд з приводом розміщуються штуцери, що поєднують апарат з лініями подачі посівного матеріалу, поживного середовища, піногасника, стерильного повітря тощо. У верхній частині також розташовується люк-лаз (оглядове вікно) та СІП-головка, до якої під'єднується лінія подачі засобів для миття та дезінфекції апарата. Натомість в нижній частині – розташовані штуцери для вивантаження та пробовідбірники[47,48].

Ферментер обладнаний теплообмінною сорочкою та за потреби змішувачем, що дозволяють регулювати та підтримувати необхідну температуру культивування. Окрім перемішуючого пристрою, який може бути різного виду: лопатевий, пропелерний, турбінний чи ін., ферментер оснащений аераційним пристроєм у вигляді барботеру. Саме за допомогою нього вводиться газова фаза у середовище[47,48].

Перед використанням ферментер миють, перевіряють на герметичність, стерилізують разом з основною обв'язкою та головними магістралями. Торцеві ущільнення, які присутні в конструкції апарата, мають за мету мінімізувати витік середовища та уникнути потрапляння повітря у місці виходу наприклад вала перемішуючого пристрою, що в свою чергу дозволяє практично повністю забезпечити стерильність процесу ферментації [47,48].

Отже, відповідно до характеристик та вимог до апарату, було обрано ферментер з механічним перемішувачем пристроєм барботажного типу об'ємом 63 м³. Заповнення ферментера здійснюється на 70%. У якості перемішуючого пристрою – лопатева мішалка, оскільки даний вид пристрою є не дороговартісним, ефективним для середовища з низькою в'язкістю та простим у конструкції.

4.2 Розрахунок виробничого ферментера.

4.2.1 Конструктивний розрахунок ферментера

Вихідні дані:

Номінальний об'єм апарата: $V_n = 63 \text{ м}^3$

Коефіцієнт заповнення: $\varphi_{\text{зап}} = 0,7$

Робочий об'єм ферментера розраховуємо за формулою:

$$V_p = V_n \cdot \varphi_{\text{зап}} = 63 \cdot 0,7 = 44,1 \text{ м}^3 \quad (4.1)$$

Відповідно до ГОСТ 20680-2002 «Аппараты с механическими перемешивающими устройствами, Общие технические условия»[49] обрано цільнозварний апарат з еліптичним днищем та еліптичною кришкою (тип 1). Згідно з стандартами для апарата з номінальним об'ємом 63 м^3 приймаємо розмір внутрішнього діаметра ферментеру: $D_{\text{вн}}=3600 \text{ мм}$.

Розрахунок днища апарату:

Висоту еліптичної частини днища розраховуємо згідно [49] за формулою:

$$h_{\text{ел}} = D_{\text{вн}} \cdot 0,25 = 3600 \cdot 0,25 = 900 \text{ мм} = 0,9 \text{ м} \quad (4.2)$$

Відповідно до ГОСТ 6533-78 «Днища эллиптические отбортованные стальные для сосудов, аппаратов и котлов, Основные размеры» знаходимо конструктивні розміри днища з висотою 900 мм (рис. 4.2):

- об'єм еліптичного днища: $V_{\text{дн}} = 7304,3 \text{ дм}^3 = 7,3043 \text{ м}^3$;
- товщина стінки еліптичного днища: $S_{\text{дн}} = 80 \text{ мм} = 0,08 \text{ м}$;
- висота основи еліптичного днища: $h_1 = 120 \text{ мм} = 0,12 \text{ м}$;
- внутрішня поверхня еліптичного днища $F_{\text{вн}} = 15,4 \text{ м}^2$.

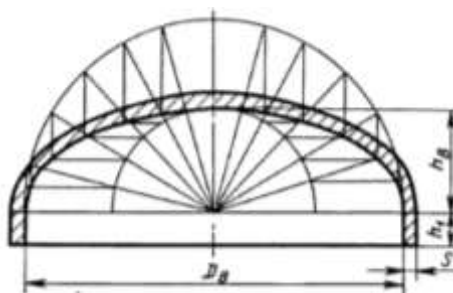


Рисунок 4.2 – Креслення еліптичної частини апарата [50]

Повна висота днища апарату :

$$h_{\text{дн}} = h_1 + h_{\text{ел}} = 0,12 + 0,9 = 1,02 \text{ м} = 1020 \text{ мм} \quad (4.3)$$

Розрахунок висоти рівня рідини в апараті:

Об'єм циліндричної частини апарату:

$$V_{\text{ц}} = V_{\text{н}} - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 63 - 2 \cdot 7,3043 = 48,3914 \text{ м}^3 \quad (4.4)$$

Висота циліндричної частини апарату:

$$H_{\text{ц}} = \frac{4 \cdot V_{\text{ц}}}{\pi \cdot D_{\text{дн}}^2} = \frac{4 \cdot 48,3914}{3,14 \cdot 3,6^2} = 4,76 \text{ м} \quad (4.5)$$

Висота апарату без штуцерів:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + 2 \cdot h_{\text{дн}} = 4,76 + 2 \cdot 1,02 = 6,8 \text{ м} \quad (4.6)$$

Висоту рівня рідини в апараті знаходять за формулою:

$$H_{\text{р}} = (H_{\text{ц}} + h_{\text{дн}}) \cdot 0,7 = (4,76 + 1,02) \cdot 0,7 = 4,05 \text{ м} \quad (4.7)$$

Отже, основні геометричні параметри ферментера є наступними:

загальна висота апарата $H_{\text{заг}} = 6,8 \text{ м}$, висота циліндричної частини $H_{\text{ц}} = 4,76 \text{ м}$, висота еліптичної частини $H_{\text{дн}} = 1,02 \text{ м}$, висота рівня рідини у ферментері $H = 5,78 \text{ м}$, робочий об'єм ферментера $V = 44,1 \text{ м}^3$.

Розрахунок перемішуючого пристрою:

Задля покращення ефективності проходження процесів масообміну в реакторі передбачений механічний перемішуючий пристрій – лопатева мішалка (рис.4.3).

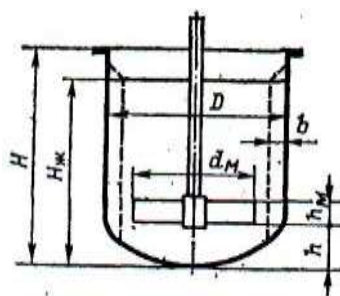


Рисунок 4.3 – Креслення лопатевої мішалки [49]

Кількість мішалок приймаємо із розрахунку 1 на повні 20 м^3 . Оскільки робочий об'єм ферментера становить $44,1 \text{ м}^3$, то обираємо кількість мішалок на одному валу $z_{\text{м}} = 2$ (кожна дволопатева).

Визначаємо діаметр перемішуючого пристрою:

Оскільки співвідношення для лопатевої мішалки $\frac{D}{d_m} = 1,4 \div 1,7, \frac{h_m}{d_m} = 0,1; \frac{h}{d_m} = 0,4 \div 1,0; \frac{b}{d_m} = 0,1; \xi_M = 0,86$, то приймаємо $\frac{D}{d_m} = 1,4, \frac{h}{d_m} = 0,4$. Тоді маємо:

$$d_m = \frac{D}{1,4} = \frac{3600}{1,4} = 2571,4 \text{ мм} \quad (4.8)$$

Зі стандартного ряду [49] обираємо мішалку діаметром $d_m = 2500 \text{ мм} = 2,5 \text{ м}$.

Висота перемішуючого пристрою:

$$h_m = 0,1 \cdot d_m = 0,1 \cdot 2500 = 250 \text{ мм} = 0,25 \text{ м} \quad (4.9)$$

Довжина лопасті:

$$l_l = 0,25 \cdot d_m = 0,25 \cdot 2500 = 625 \text{ мм} = 0,625 \text{ м} \quad (4.10)$$

Відстань від днища до перемішуючого пристрою:

$$h = 0,4 \cdot d_m = 0,4 \cdot 2500 = 1000 \text{ мм} = 1 \text{ м} \quad (4.11)$$

Діаметр вала мішалки:

$$d_B = 150 \text{ мм} \quad (4.12)$$

Розрахунок глибини воронки

Параметр висоти завантаження γ апарата визначають за формулою:

$$\gamma = 8 \cdot \frac{H_p}{D_{BH}} + 1 = 8 \cdot \frac{5,78}{3,6} + 1 = 13,84 \quad (4.13)$$

Критерій Рейнольдса при перемішуванні становить:

$$Re_B = \frac{\rho_c \cdot n \cdot d_m^2}{\mu_c} = \frac{1013 \cdot 0,67 \cdot 2,5^2}{1,41 \cdot 10^{-6}} = 3 \cdot 10^9 \quad (4.14)$$

Де μ_c – середня кінематична в'язкість середовища, приймаємо $1,41 \times 10^{-6} \text{ Па} \cdot \text{с}$, n – частота обертів мішалки, приймаємо $0,67 \text{ с}^{-1}$, ρ_c – середня густина середовища, що приймається як 1013 кг/м^3 .

Параметр гідравлічного опору мішалки:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_M \cdot z_M \cdot Re_B^2} = \frac{13,84}{0,85 \cdot 2 \cdot (3 \cdot 10^9)^{0,25}} = 0,035 \quad (4.15)$$

Гранична допустима глибина воронки:

$$h_{гр} = H_p - h = 5,78 - 1,12 = 4,66 \text{ (м)}. \quad (4.16)$$

Оскільки швидкість обертання мішалки та частота не є високими, що в свою чергу не спричиняє утворення значно глибокої воронки, то відбиваючі перегородки встановлювати у ферментері не потрібно.

Розрахунок кільцевого барботера:

Відстань між перемішуючим пристроєм та барботером:

$$h_6 = 0,25 \cdot d_m = 0,25 \cdot 2500 = 625 \text{ мм} = 0,625 \text{ м} \quad (4.17)$$

Діаметр отвору барботера приймаємо $d_0 = 4 \text{ мм}$

Діаметр барботера:

$$D_0 = (0,5 \div 0,75) \cdot d_M = 0,75 \cdot 2500 = 1875 \text{ мм} = 1,875 \text{ м} \quad (4.18)$$

Приймаємо об'ємні витрати повітря у ферментері $V_r = 0,2 \frac{\text{м}^3}{\text{с}}$

Визначаємо зовнішній діаметр труби барботера $d_{6.з.}$, для цього приймаємо попередню швидкість газу у трубі барботера $\omega_6 = 25 \text{ м/с}$:

$$d_{6.з.} = \sqrt{\frac{4 \cdot V_r}{\pi \cdot \omega_6}} = \sqrt{\frac{4 \cdot 0,2}{3,14 \cdot 25}} = 0,1 \text{ м}, \quad (4.19)$$

Кількість отворів у барботері становить:

$$z_{отв} = \frac{4 \cdot V_r}{\pi \cdot d_0^2 \cdot \omega_6} = \frac{4 \cdot 0,2}{3,14 \cdot 0,004^2 \cdot 25} = 640 \text{ отворів} \quad (4.20)$$

Кількість отворів в 1 ряді:

$$z_{отв/p} = \frac{\pi \cdot D_0}{t} = \frac{3,14 \cdot 1,879}{0,02} \approx 295 \text{ отворів} \quad (4.21)$$

Де $t = 20 \text{ мм} = 0,02 \text{ м}$ – відстань між отворами/

Кількість рядів:

$$n = \frac{z_{отв}}{z_{отв/p}} = \frac{640}{295} \approx 2 \text{ ряди} \quad (4.22)$$

Сумарна площа поперечного перерізу отворів барботера, м^2 :

$$S_{отв} = \frac{\pi}{4} \cdot d_0^2 \cdot z_{отв} = \frac{3,14}{4} \cdot 0,004^2 \cdot 640 = 8 \cdot 10^{-3} \text{ м}^2, \quad (4.23)$$

Барботування проводиться впродовж всього циклу культивування [51].

4.2.2. Розрахунок виробничої потужності.

Оскільки технологія виробництва біодизеля на основі дріжджових ліпідів є новою та не до кінця випробуваною, то пропонується проект виробництва біопалива об'ємом 100 м³/рік.

Найдовшим етапом виробництва є культивування біологічного агента, що займає в середньому 6-7 діб. Загальна тривалість інших етапів виробництва становить в середньому 1-1,5 доби. Оскільки обладнання потребуватиме в середньому 30 днів для перевірки, ремонтних робіт, миття і т.п., то кількість партій, виготовлених на 1 ферментері становить:

$$N = \frac{365-30}{7} = 48 \quad (4.24)$$

Згідно з дослідницькими даними передбачається, що теоретичний вихід культуральної рідини з ферментера об'ємом 63 м³ становитиме близько $V_3=44,1$ м³. Вміст сухої біомаси дріжджів прогнозується $C_c=20$ кг/м³.

Розраховуємо вихід сухої біомаси з 1 ферментера:

$$m_3 = C_c \cdot V_3 = 44,1 \cdot 20 = 880,2 \text{ кг} \approx 880 \text{ кг} \quad (4.25)$$

Згідно з теоретичними даними вміст ліпідів у біомасі становить 50%, відповідно маса отриманих ліпідів становитиме:

$$m_{\text{л}} = \frac{W \cdot m_3}{100\%} = \frac{50\% \cdot 880}{100\%} \approx 440 \text{ кг} \quad (4.26)$$

Враховуючи середню густину різного роду олій 920 кг/м³, то об'єм мікробної олії становитиме:

$$V_{\text{л}} = \frac{m_{\text{л}}}{\rho} = \frac{440}{920} \approx 0,5 \text{ м}^3 \quad (4.27)$$

Вважаючи, що вихід метилових естерів становить 95%, то теоретично передбачається наступний об'єм готового продукту:

$$V_{\text{гп}} = \frac{\varphi \cdot V_{\text{л}}}{100\%} = \frac{95\% \cdot 0,5}{100\%} \approx 0,475 \text{ м}^3 \quad (4.28)$$

Таким чином 1 ферментер забезпечить виробництво біодизеля об'ємом:

$$V_p = N \cdot V_{\text{гп}} = 48 \cdot 0.475 \approx 22,8 \text{ м}^3/\text{рік} \quad (4.29)$$

Відповідно, щоб наблизити значення об'єму виробництва до планових, необхідно встановити не менше 4 ферментерів.

					КББЕ.БМ01.ПЗ	Арк.
Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		68

РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ТА БЕЗПЕКА ПРАЦІ. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

Охорона праці є невід'ємною складовою ефективного функціонування будь-якого підприємства. Забезпечення охорони праці на виробництві біодизеля є комплексним завданням, яке вимагає систематичного підходу та врахування багатьох аспектів виробничого процесу, яке потребує контролю з шумової безпеки, зниження вібрацій, контролю якості повітря, стічних вод, правильного використання хімічних речовин, пожежної та електробезпеки тощо.

Основоположним документом у сфері охорони праці є Закон України «Про охорону праці». Він визначає основні принципи реалізації конституційного права працівників на захист їхнього життя і здоров'я під час трудової діяльності, забезпечення належних, безпечних і здорових умов праці [52]. Серед інших нормативно-правових актів, що стосуються питання охорони та безпеки праці на виробництві є:

1. Основи законодавства України про охорону здоров'я;
2. Про використання ядерної енергії та радіаційну безпеку;
3. Про забезпечення санітарного та епідеміологічного благополуччя населення;
4. Про загальнообов'язкове державне соціальне страхування;
5. Про об'єкти підвищеної небезпеки;
6. Про колективні договори і угоди;
7. Кодекс законів про працю України (КЗпП);
8. Кодекс цивільного захисту України;
9. Господарський Кодекс України.

					КББЕ.БМ01.ПЗ							
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ОХОРОНА ТА БЕЗПЕКА ПРАЦІ. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ					Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.	Гоман Є.К.											
Перевір.	Зубченко Л.С.										69	85
Реценз.												
Н. Контр.												
Затверд												
					КПІ ім. І.Сікорського ФБТ							

Для забезпечення охорони праці на виробництві біодизельного палива необхідно:

1. Створити спеціальні служби та призначити відповідальних осіб для вирішення питань охорони праці.
2. Затвердити інструкції з обов'язками та правами цих осіб і контролювати їх виконання.
3. Впровадити заходи, як-от встановлення систем вентиляції, використання захисного обладнання, та регулярне навчання працівників безпечному поводженню з хімічними речовинами.
4. Проводити профілактичні огляди і перевірки обладнання для виявлення несправностей.
5. Впроваджувати нові технології та автоматизацію процесів виробництва.
6. Забезпечити належне утримання будівель і обладнання та регулярний моніторинг їх технічного стану, зокрема огляд резервуарів для зберігання біодизелю та контроль їх герметичності.

Щоб чітко охарактеризувати допустимі норми шуму та вібрацій, необхідно звернутись до Державних санітарних правил, норм та гігієнічних нормативів. Відповідно Постанови № 37 від 01.12.99 «Санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку ДСН 3.3.6.037-99» максимальний рівень шуму, що коливається в часі та переривається, не повинен перевищувати 110 дБА. Максимальний рівень для імпульсного шуму не повинен перевищувати 125 дБА [53].

Для оцінки впливу вібрації необхідно вимірювати її прискорення в м/с^2 в визначених напрямках. Згідно з ДСН 3.3.6.039-99 встановлено граничні значення віброприскорення для 8-годинної зміни: для локальної вібрації - 5 м/с^2 , діюча - $2,5 \text{ м/с}^2$; для загальної вібрації - $1,15 \text{ м/с}^2$, діюча - $0,5 \text{ м/с}^2$. Якщо фактичні значення не відповідають нормам, використовуються нижчі. Оцінка рівня небезпеки вібрації охоплює всі види діяльності, де працівники можуть піддаватися впливу вібрації, що може призводити до

м'язових болів, нервових і циркуляційних розладів, проблем із травленням, стресу та порушень сну [54].

Важливим чинником для здоров'я людини є якісне повітря. Безпека контролю якості повітря на виробництві вельми важлива, оскільки якість повітря безпосередньо впливає на здоров'я працівників та загальну продуктивність робочого процесу. Важливо проводити регулярні вимірювання якості повітря, контролювати рівні шкідливих речовин, таких як токсичні гази або пил, і виявляти будь-які аномалії.

Згідно з Конвенцією № 170 про безпеку в застосуванні хімічних речовин на виробництві, яка стане чинною з 06.12.2024, важливо враховувати її норми та заходи безпеки, впроваджувати їх, щоб виключити або звести до мінімуму ризик, що загрожує працівникам у зв'язку з використанням хімічних речовин на виробництві [55]. Усі хімічні речовини, які використовуються на виробництві, повинні бути правильно марковані та ідентифіковані. На виробництві необхідно здійснювати облік небезпечних хімічних речовин. Працівники при роботі з небезпечними речовинами повинні дотримуватися правил безпеки, працювати в спецодязі, окулярах, гумових рукавицях та в респіраторах.

Забезпечення пожежної безпеки є необхідною складовою державної діяльності з метою захисту життя та здоров'я людей, національного багатства і довкілля. Наказ МВС України «Про затвердження Правил пожежної безпеки в Україні» визначає загальні правові, економічні та соціальні принципи забезпечення пожежної безпеки на території України.

Необхідно впровадити заходи забезпечення пожежної безпеки, що включає регулярну перевірку електрообладнання та контроль над джерелами запалювання, розробку та впровадження евакуаційних планів в усіх приміщеннях, забезпечення наявністю необхідних пожежних засобів у приміщеннях, організацію навчань персоналу з дій у небезпечних ситуаціях, проведення регулярних навчальних семінарів та тренувань, контроль за дотриманням вимог пожежної безпеки та встановлення відповідальності за

їх порушення, використання захисних пристроїв, що відповідають нормам електробезпеки, та правильне використання електроприладів у вибухонебезпечних і пожежонебезпечних зонах [56].

У сучасному світі питання охорони довкілля та збереження природних ресурсів стає все більш актуальним. Зростання світової популяції, індустріалізація та зростаючий рівень споживання призводять до значного збільшення негативного впливу на довкілля. Особливо важливою стає роль виробництва біодизеля, яке, хоча й є більш екологічно чистим за порівнянням з традиційними видами пального, все ж може мати свої негативні наслідки для природи, якщо не дотримуватися відповідних стандартів та процедур охорони довкілля.

Стратегії зменшення викидів, переробки відходів, енергоефективність та використання екологічно чистих матеріалів є необхідними для зменшення негативного впливу на довкілля. У цьому контексті, важливою є інтеграція принципів збереження довкілля в кожен етап виробництва біодизеля, починаючи від вибору сировини і закінчуючи відповідальним видаленням відходів. Основні процеси та технології захисту довкілля на виробництві біодизеля подані в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1 – Основні процеси та технології захисту довкілля на виробництві біодизеля

Процес/Технологія	Опис
Очищення води та стічних вод	Встановлення систем очищення води перед скидом у каналізацію для видалення забруднень та токсичних речовин.
Управління викидами	Контроль за викидами в атмосферу та встановлення ефективних систем очищення димових газів для зменшення викидів шкідливих речовин.
Енергоефективність та використання відновлювальних джерел енергії	Зменшення споживання енергії та перехід на використання відновлювальних джерел енергії для зменшення впливу на клімат.

Продовження Таблиці 5.1

Використання вторинних матеріалів та переробка відходів	Розробка систем переробки відходів та використання вторинних матеріалів для зменшення кількості відходів та забруднення довкілля.
Моніторинг та звітність	Систематичний моніторинг викидів та стічних вод, а також складання звітів про екологічні показники для забезпечення відповідності стандартам охорони довкілля та виявлення областей для покращень.

Оскільки в процесі виробництва присутні небезпечні для довкілля і людини речовини: метанол, органічні розчинники, луки, кислоти - їх усі потрібно вилучати з твердих та рідких відходів, щоб не забруднювати середовище. Для цього слід забезпечити очистку стічних вод перед скидом у каналізаційну систему міста, запровадити фільтрацію, хімічну нейтралізацію та ввести постійний моніторинг.

Залишки біомаси після культивування також є санітарно-небезпечним типом відходів. Часткове знешкодження біомаси відбувається під час сушіння. З метою зменшення виробничих відходів пропонується подальше використання залишків біомаси для виробництва корму для тварин або біогазу.

Отже, застосування сучасних технологій та процесів, таких як очищення води та стічних вод, управління викидами, використання відновлювальних джерел енергії та переробка відходів, дозволяє зменшити негативний вплив на довкілля та підвищити ступінь екологічної стійкості виробництва.

ВИСНОВКИ

У дипломному проєкті було обрано та обґрунтовано технологію виробництва біодизеля з ліпідів дріжджів виду *Lipomyces starkeyi*.

1. На основі аналізу наукової літератури розглянуто переваги та недоліки існуючих видів дріжджів з точки зору можливості їх використання у якості продуцента ліпідів; у ролі продуцента ліпідів обрано *Lipomyces starkeyi* оскільки вони здатні накопичувати до 60% ліпідів в клітині. Крім того, у складі ліпідної фракції переважають олеїнова, пальмітинова, стеаринова та лінолева кислоти; обґрунтовано склад поживного середовища для вирощування обраного продуцента, зокрема у якості основного джерела вуглецю використано гліцерол, що утворюється в процесі виробництва біодизеля під час реакції трансетерифікації.

2. Обрано та обґрунтовано технологію культивування олійних дріжджів для виробництва ліпідів для одержання біодизеля. Культивування є одноступеневим, відбувається у періодичному режимі з підживленням гліцеролом у виробничому ферментері з підтриманням рівня $pH=5,5\pm0,3$ та температури $28\pm2^{\circ}C$. Для виробництва біодизеля обрано технологію з використанням трансетерифікації.

3. Розроблено технологічну і апаратурну схеми культивування олійних дріжджів для виробництва ліпідів з подальшим отриманням біодизеля. Запропонована технологія включає стадії підготовки виробництва, зокрема підготовку поживного середовища та інокулята для культивування дріжджів, виробничий біосинтез ліпідів дріжджових грибів, виділення ліпідів шляхом екстракції етилацетатом з попереднім сушінням культуральної рідини, безпосередньо виробництво біодизеля за допомогою трансетерифікації метоксидом та його очищення шляхом промивання розчином соляної кислоти.

					КББЕ.БМ01.ПЗ								
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВКИ					Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.	Гоман Є.К.											74	85
Перевір.	Зубченко Л.С.												
Реценз.													
Н. Контр.													
Затверд													
					КПІ ім. І. Сікорського ФБТ								

4. Розраховано матеріальний баланс, технічні показники обраного типу ферментера для культивування дріжджів. Для забезпечення виробництва 100 м³ біодизеля на рік необхідно 4 ферментера барботажного типу з механічним перемішуванням загальним об'ємом 63 м³. Виконано креслення розрахованого ферментера.

5. Розглянуто питання безпеки праці і охорони навколишнього середовища на виробництві. Запропоновано заходи щодо охорони праці та довкілля.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. An Overview of Potential Oleaginous Microorganisms and Their Role in Biodiesel and Omega-3 Fatty Acid-Based Industries / A. Patel et al. Microorganisms. 2020. Vol. 8, no. 3. P. 434. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030434> (date of access: 10.05.2024).
2. Biorefinery: A Sustainable Approach for the Production of Biomaterials, Biochemicals and Biofuels / ed. by P. D. Pathak, S. A. Mandavgane. Singapore : Springer Nature Singapore, 2023. URL: <https://doi.org/10.1007/978-981-19-7481-6> (Date of access: 14.05.2024).
3. Cho H. U., Park J. M. Biodiesel production by various oleaginous microorganisms from organic wastes. Bioresource Technology. 2018. Vol. 256. P. 502–508. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.010> (Date of access: 14.05.2024).
4. Gouveia L., Oliveira A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2008. Vol. 36, no. 2. P. 269–274. URL: <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0495-6> (Date of access: 14.05.2024).
5. Identification of superior lipid producing Lipomyces and Myxozyma yeasts / B. S Dien et al. AIMS Environmental Science. 2016. Vol. 3, no. 1. P. 1–20. URL: <https://doi.org/10.3934/environsci.2016.1.1> (Date of access: 15.05.2024).
6. Venkata Subhash G., Venkata Mohan S. Biodiesel production from isolated oleaginous fungi Aspergillus sp. using corncob waste liquor as a substrate. Bioresource Technology. 2011. Vol. 102, no. 19. P. 9286–9290. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.084> (Date of access: 15.05.2024).

					КББЕ.БМ01.ПЗ						
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	Літ.		Арк.	Аркушів		
Розроб.	Гоман Є.К.							76	85		
Перевір.	Зубченко Л.С.										
Реценз.											
Н. Контр.											
Затверд											
						КПІ ім. І. Сікорського					

7. A comprehensive review on oleaginous bacteria: an alternative source for biodiesel production / D. Koreti et al. Bioresources and Bioprocessing. 2022. Vol. 9, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00527-1> (Date of access: 16.05.2024).
8. Kurtzman C. P. Yeasts: A Taxonomic Study. Amer Elsevier, 2008.
9. Lipomyces starkeyi: Its current status as a potential oil producer / S. Sutanto et al. Fuel Processing Technology. 2018. Vol. 177. P. 39–55. URL: <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2018.04.012> (Date of access: 17.05.2024).
10. Comparative genomics of biotechnologically important yeasts / R. Riley et al. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016. Vol. 113, no. 35. P. 9882–9887. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.1603941113> (Date of access: 18.05.2024).
11. Identification of superior lipid producing Lipomyces and Myxozyma yeasts / B. S Dien et al. AIMS Environmental Science. 2016. Vol. 3, no. 1. P. 1–20. URL: <https://doi.org/10.3934/environsci.2016.1.1> (Date of access: 20.05.2024).
12. Kurtzman C, Fell JW. The Yeasts – A Taxonomic Study. Elsevier. 1998.
13. Takayama Y. Strains and approaches for genetic crosses in the oleaginous yeast Lipomyces starkeyi. Yeast. 2021. Vol. 38, no. 12. P. 625–633. URL: <https://doi.org/10.1002/yea.3671> (Date of access: 21.05.2024).
14. Lipomyces starkeyi: Its current status as a potential oil producer / S. Sutanto et al. Fuel Processing Technology. 2018. Vol. 177. P. 39–55. URL: <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2018.04.012> (Date of access: 21.05.2024).
15. И.П.Бабьева И.Ю.Чернов. Биология дрожжей. Учебное пособие для университетов. 2005.
16. Characterization of oil-producing yeast Lipomyces starkeyi on glycerol carbon source based on metabolomics and ¹³C-labeling / Y. Maruyama et al. Applied Microbiology and Biotechnology. 2018. Vol. 102, no. 20. P. 8909–

8920. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9261-5> (Date of access: 20.05.2024).

17. Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi* / A. Anschau et al. *Bioresource Technology*. 2014. Vol. 157. P. 214–222. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.104> (Date of access: 20.05.2024).

18. Two-Stage Fermentation of *Lipomyces starkeyi* for Production of Microbial Lipids and Biodiesel / L. Zhang et al. *Microorganisms*. 2021. Vol. 9, no. 8. P. 1724. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081724> (Date of access: 21.05.2024)

19. Блажевич О. В. Б68 Культивирование клеток: Курс лекций / О. В. Блажевич – Мн.: БГУ, 2004. – 78 с. ISBN 985-485-293-8.

20. Factors affecting the optimisation and scale-up of lipid accumulation in oleaginous yeasts for sustainable biofuels production / R. Robles-Iglesias et al. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2023. Vol. 171. P. 113043. URL: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.113043> (Date of access: 21.05.2024).

21. Yen H.-W., Zhang Z. Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2011. Vol. 112, no. 1. P. 71–74. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.03.013> (Date of access: 21.05.2024)

22. Enhancing microbial lipids yield for biodiesel production by oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* fermentation: A review / L. Zhang et al. *Bioresource Technology*. 2022. Vol. 344. P. 126294. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126294> (Date of access: 21.05.2024).

23. Co-fermentation of a sugar mixture for microbial lipid production in a two-stage fermentation mode under non-sterile conditions / W. Liu et al. *Sustainable Energy & Fuels*. 2020. Vol. 4, no. 5. P. 2380–2385. URL: <https://doi.org/10.1039/d0se00003e> (Date of access: 22.05.2024).

24. Oleaginous Yeast Biorefinery: Feedstocks, Processes, Techniques, Bioproducts / T. Lopes da Silva et al. Fermentation. 2023. Vol. 9, no. 12. P. 1013. URL: <https://doi.org/10.3390/fermentation9121013> (Date of access: 21.05.2024).
25. Biodiesel Production Processes with Yeast: A Sustainable Approach / A. Sánchez-Solís et al. Energies. 2024. Vol. 17, no. 2. P. 302. URL: <https://doi.org/10.3390/en17020302> (Date of access: 22.05.2024).
26. “Bligh and Dyer” and Folch Methods for Solid–Liquid–Liquid Extraction of Lipids from Microorganisms. Comprehension of Solvation Mechanisms and towards Substitution with Alternative Solvents / C. Breil et al. International Journal of Molecular Sciences. 2017. Vol. 18, no. 4. P. 708. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms18040708> (Date of access: 21.05.2024).
27. Iverson S. J., Lang S. L. C., Cooper M. H. Comparison of the bligh and dyer and folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. Lipids. 2001. Vol. 36, no. 11. P. 1283–1287. URL: <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0843-0> (Date of access: 21.05.2024).
28. Ethyl Acetate/Ethyl Alcohol Mixtures as an Alternative to Folch Reagent for Extracting Animal Lipids / J.-H. Lin et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004. Vol. 52, no. 16. P. 4984–4986. URL: <https://doi.org/10.1021/jf049360m> (Date of access: 22.05.2024).
29. Enzyme-assisted extraction of lipids directly from the culture of the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides / G. Jin et al. Bioresource Technology. 2012. Vol. 111. P. 378–382. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.152> (Date of access: 24.05.2024).
30. Evaluation of green solvents: Oil extraction from oleaginous yeast Lipomyces starkeyi using cyclopentyl methyl ether (CPME) / K. V. Probst et al. Biotechnology Progress. 2017. Vol. 33, no. 4. P. 1096–1103. URL: <https://doi.org/10.1002/btpr.2473> (Date of access: 26.05.2024).
31. A Review of Enzymatic Transesterification of Microalgal Oil-Based Biodiesel Using Supercritical Technology / H. Taher et al. Enzyme Research.

2011. Vol. 2011. P. 1–25. URL: <https://doi.org/10.4061/2011/468292> (Date of access: 21.05.2024).

32. Biodiesel Production Through Chemical and Biochemical Transesterification / M. W. Mumtaz et al. Clean Energy for Sustainable Development. 2017. P. 465–485. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805423-9.00015-6> (Date of access: 25.05.2024).

33. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview / M. Aarthy et al. Chemical Engineering Research and Design. 2014. Vol. 92, no. 8. P. 1591–1601. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.04.008> (Date of access: 23.05.2024).

34. A metabolic model of *Lipomyces starkeyi* for predicting lipogenesis potential from diverse low-cost substrates / W. Zhou et al. Biotechnology for Biofuels. 2021. Vol. 14, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01997-9> (Date of access: 25.05.2024).

35. Lipid metabolism of the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* / H. Takaku et al. Applied Microbiology and Biotechnology. 2020. Vol. 104, no. 14. P. 6141–6148. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10695-9> (Date of access: 28.05.2024).

36. Production, Biosynthesis, and Commercial Applications of Fatty Acids From Oleaginous Fungi / X.-Y. Zhang et al. Frontiers in Nutrition. 2022. Vol. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.873657> (Date of access: 27.05.2024).

37. Lian J., Zhao H. Reversal of the β -Oxidation Cycle in *Saccharomyces cerevisiae* for Production of Fuels and Chemicals. ACS Synthetic Biology. 2014. T. 4, № 3. C. 332–341. URL: <https://doi.org/10.1021/sb500243c> (дата звернення: 30.05.2024).

38. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production / H. Fukuda et al. Trends in Biotechnology. 2008. Vol. 26, no. 12. P. 668–673. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.08.001> (Date of access: 30.05.2024).

39. ДСТУ 6081:2009. Паливо моторне. Ефіри метилові жирних кислот олій і жирів для дизельних двигунів. Технічні вимоги. Чинний від 2010-03-01. Вид. офіц. Київ, 2009.

40. Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysates of various non-edible lignocellulosic biomasses / A. Patel et al. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2016. Vol. 62. P. 836–855. URL: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.05.014> (Date of access: 30.05.2024).

41. Екобіотехнологія та біоенергетика: Лабораторний практикум: навч. посіб. для студ. спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» та 163 «Біомедична інженерія» / КПІ ім. Ігоря Сікорського ; уклад.: М. Ю. Козар, Л.С.Зубченко – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2021. – 63с.

42. Demirbas A. Biodiesel: A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines. Springer, 2010. 220 p.

43. Підручник: Щурська К.О., Кузьмінський Є.В. «Біоенергетика» підручник для студ. спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / КПІ ім. Ігоря Сікорського. – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2018. – 306 с.

44. НЕРА фільтр – що це? Принцип роботи деталі. URL: <https://hitprodazhkrop.com.ua/ua/a492566-hepa-filtr-hto.html> (Дата звернення: 09.06.2024).

45. Свистунов Александр Иванович Классификация способов ферментации и ферментеров // Вестник НГИЭИ. 2013. №10 (29). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/klassifikatsiya-sposobov-fermentatsii-i-fermenterov> (Дата звернення: 28.05.2024).

46. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов В.Б. Общая технология микробиологических производств. – М.:Легкая и пищевая пром-сть, 1982. – 264 с.

47. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. Для студентов институтов, аспирантов и практических работников. /Елинов. – Санкт-Петербург:"Наука", 1995. – 600 с.

48. Дытнерский Ю. И. Основные процессы и аппараты химической технологии. Пособие по проектированию. изд 2-е, пер. и доп./ Москва: Химия, 1991. – 493с

49. ГОСТ 20680-2002 «Аппараты с механическими перемешивающими устройствами, Общие технические условия»

50. ГОСТ 6533-78 «Днища эллиптические отбортованные стальные для сосудов, аппаратов и котлов, Основные размеры»

51. Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв / Л. І.Ружинська, І. А. Буртна, В. М. Поводзинський, В. Ю. Шибецький,. – Київ: НТУУ «КПІ», 2014. – 131 с.

52. Про охорону праці. Офіційний вебпортал парламенту України. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2694-12#Text> (дата звернення: 02.06.2024).

53. Санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку ДСН 3.3.6.037-99. Офіційний вебпортал парламенту України. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/va037282-99#Text> (дата звернення: 02.06.2024).

54. Державні санітарні норми виробничої загальної та локальної вібрації ДСН 3.3.6.039-99. Офіційний вебпортал парламенту України. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/va039282-99#Text> (дата звернення: 02.06.2024).

55. ІПС ЛІГА:ЗАКОН - система пошуку, аналізу та моніторингу нормативно-правової бази. URL: <https://ips.ligazakon.net/document/MU90301?an=15580> (дата звернення: 02.06.2024).

56. Про затвердження Правил пожежної безпеки в Україні. Офіційний вебпортал парламенту України. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0252-15#Text> (дата звернення: 02.06.2024).

ДОДАТКИ

Додаток А

Специфікація обладнання

Позиція	Назва	Кількість	Маса, кг	Примітка
Н-4, Н-8, Н-16, Н-19, Н-21, Н-23, Н-28, Н-32, Н-35, Н-41, Н-50, Н-52, Н-54, Н-56, Н-60, Н-62, Н-64, Н-66	Насос відцентровий горизонтальний консольний з робочим колесом закритого типу	18		Збірний
ПЗ-9	Повітрозабірник, висота 5 м	1		
В-10	Компресор (Стиснення до 2,5 кПА)	1		
Ф-11	Фільтр грубої очистки	1		Збірний
Ф-12	Індивідуальний фільтр типу НЕРА, вугольний	1		Збірний
Д-2, Д-3, Д-6, Д-7, Д-14, Д-15, Д-18, Д-25, Д-26, Д-27, Д-30, Д-31, Д-34, Д-37, Д-38, Д-39, Д-40 Д-48, Д-49, Д-58, Д-59,	Об'ємно-ваговий дозатор	21		Неірж. сталь 12Х18Н10Т

					КББЕ.БМ01.ПЗ		
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ДОДАТКИ		
Розроб.	Гоман Є.К.						
Перевір.	Зубченко Л.С.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд					КПІ ім. І. Сікорського ФБТ		
					Літ.	Арк.	Аркушів
						83	85

Р-1, Р-5, Р-13, Р-17, Р-29, Р-33, Р-57, Р-63	Реактор змішувач з турбінними мішалками	8		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
А-20	Автоклав	1		
Т-22	Теплообмінник- охолоджувач	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
І-24	Інокулятор з лопатевою мішалкою та барботером	1		Збірний, Неірж. сталь 12Х18Н10Т
Р-36	Ферментер барботажного типу з механічним перемішуючим пристроєм	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
Г-42	Гомогенізатор високого тиску	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
С-44	Розпилювальна сушарка	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
К-42	Калорифер паровий	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
Ц-44	Циклон очищувальний	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
Р-47	Екстрактор	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
Ц-51	Центрифуга	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т

В-53	Випарний апарат	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
К-46, К-55	Конденсатор	2		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
С-61	Сепаратор	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
Р-65	Збірник для біодизеля	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т