

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

«До захисту допущено»

Директор інституту (декан факультету)

Завідувач кафедри

_____ Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

_____ Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 2020 р.

«__» _____ 2020 р.

Кваліфікаційна робота

на здобуття освітнього ступеня бакалавра

зі спеціальності _____ 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(шифр та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми _____ «Біотехнологія»

на тему: Культивування *Gibberella fujikuroi* для одержання гіберелінів

Виконав: здобувач IV курсу, групи 1

_____ Лазюка Юлія Володимирівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _____ Скроцька Оксана Ігорівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____ Клименко О.М.
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (прізвище та ініціали) (підпис)
Рецензент _____ Калібабчук В.О.
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Лазюка Юлії Володимирівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Gibberella fujikuroi* для одержання гіберелінів

керівник роботи Скροцька О.І., к.б.н., доцент,

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року №227-кв

2. Строк подання здобувачем проекту (роботи) 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Gibberella fujikuroi*, цільовий продукт: гібереліни

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання. РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва гіберелінів. РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема виробництва гіберелінів – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва гіберелінів – 2 аркуші формату А1. Схема автоматизації ділянки сушіння кристалів гіберелінів 1 аркуш формату А3

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
	Клименко Олег Миколайович доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	15.05.2020	16.05.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика цільового продукту	20.03.20-22.03.20	
2.	Характеристика біологічного агента	23.03.20-26.03.20	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	27.03.20-30.03.20	
4.	Біосинтез цільового продукту	01.04.20-03.04.20	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми	05.04.20-27.04.20	
6.	Матеріальний баланс і розрахунок обладнання	01.05.20-05.05.20	
7.	Специфікація обладнання	10.05.20-11.05.20	
8.	Опис технологічної схеми	13.05.20-15.05.20	
9.	Контроль виробництва гіберелінів	16.05.20-18.05.20	
10.	Автоматизація ділянки виробництва	15.05.20-16.05.20	
11.	Оформлення пояснювальної записки	09.05.20-21.05.20	
12.	Виконання графічної частини проекту	10.04.20-18.05.20	

Здобувач _____
(підпис)

Лазюка Ю.В
(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____
(підпис)

Скроцька О.І
(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений виробництву препарату гіберелінів за допомогою штаму *Fusarium moniliforme* NCIM 1100 (нестатева форма *Gibberella fujikuroi*), який синтезує на середовищі з сахарозою 15 г/л цільового продукту. Гібереліни є фітогормонами, які використовуються для підвищення врожайності плодкових-ягідних культур рослин. Розрахована потужність його виробництва становить 1,8 м³ культуральної рідини або 16,5 кг кристалів за місяць.

Технологічна схема отримання препарату гіберелінів включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, підготовка і стерилізація поживних середовищ, титрувальних агентів, підготовка реагентів для переведення гіберелінів у водний розчин) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, біосинтез гібереліну за допомогою гриба *F. moniliforme* NCIM 1100, відділення біомаси, розведення культуральної рідини, екстракція гіберелінів, переведення гіберелінів у водний розчин, адсорбція активованим вугіллям, десорбція етилацетатом, концентрування і кристалізація гіберелінів, відфільтровування кристалів гіберелінів, висушування кристалів гіберелінів), пакування, маркування та відвантаження, знешкодження відходів.

Апаратурна схема отримання препарату гіберелінів включає ділянки підготовки миючих та дезинфікувальних розчинів, підготовки повітря, збірники для приготування композицій поживного середовища, інокулятор, посівний апарат та виробничий ферментер для вирощування культури, ділянки відділення культуральної рідини від біомаси, виділення гіберелінів, очищення, висушування кристалів гіберелінів, фасування готового препарату гіберелінів.

Дипломний проект викладений на 143 сторінках друкованого тексту, містить 33 таблиць, 24 рисунки і складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (80 джерел) та графічної частини (3 креслень формату А1 та 1 креслення формату А3).

Ключові слова: гібереліни, фактор росту рослин, гриби *Gibberella fujikuroi*, штам *Fusarium moniliforme* NCIM 1100, фільтрування міцелію, екстракт, етилацетат, сушарка з «киплячим шаром».

ЗМІСТ

ВСТУП

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	9
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	13
2.2 Розрахунок складу поживного середовища.....	17
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	20
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	22
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	24
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	25
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	26
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів...	26
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	27
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту.....	31
4.1. Шляхи катаболізму сахарози ростового субстрату.....	31
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	33
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	35
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	35
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	47
5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення.....	67
РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок технологічного обладнання	68
6.1. Розрахунок партій продукту (виробничих циклів).....	69
6.2. Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу.....	69

6.3. Розрахунок напівпродуктів та баластних речовин в культуральній рідині після виробничого біосинтезу.....	78
6.4. Стадія ТП. Виділення, очищення та фасування готової продукції	79
6.5. Розрахунок матеріального балансу.....	83
6.6. Розрахунок технологічного обладнання.....	88
РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання.....	94
РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми.....	98
РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва гіберелінів.....	115
9.1. Карта постадійного контролю.....	115
9.2. Мікробіологічний контроль.....	121
9.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	123
9.4. Контроль готового продукту.....	127
РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва.....	129
10.1. Опис апаратурно-технологічної схеми виробничої ділянки.....	129
10.2. Технологічні вимоги до системи автоматизації.....	132
10.3. Обґрунтування та вибір системи засобів автоматизації.....	132
10.4. Опис схеми автоматизації.....	133
10.5. Специфікація на засоби автоматизації.....	133

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

ДОДАТКИ

ВСТУП

В останні роки зростає тенденція заміни хімічних препаратів стимуляторів росту рослин, які можуть містити шкідливі для навколишнього середовища речовини (ПЕГ, хлорвмісні сполуки), на речовини біологічного походження (гібереліни, ауксини, цитокініни), які є природними регуляторами росту рослин та не є шкідливими для навколишнього середовища. З усіх природних фітогормонів найбільше виробляють гіберелінів – 60 т у рік [9].

Використання регуляторів росту рослин у сільському господарстві надає можливість оптимізувати метаболізм рослинної клітини, прискорити цвітіння і досягання та підвищити урожай сільськогосподарських культур.

Метою даного проекту є проектування ділянки виробництва (апаратурна і технологічна схеми) препарату гіберелінів кристалічних штамом *Fusarium moniliforme* NCIM 1100, які є безстатевою формою гриба *Gibberella fujikuroi* у вигляді сухих кристалів для подальшого їх пакування в поліетиленові пакети.

Актуальність. Серед природних стимуляторів росту рослин гібереліни вирізняються тим, що активують синтез нуклеїнових кислот та білків, підсилюють розтягування і ділення рослинних клітин, збільшують частоту мітозів. Це прискорює появу листя, наростання стебла, збільшення листової пластинки та розмірів плодів[1]. Використання таких регуляторів росту рослин, як гібереліни дає можливість прискорити дозрівання плодів на 10-15 днів та підвищити врожайність у 2 рази. Також гібереліни є безпечними для людини, не впливають на смак і колір плодів оброблюваних рослин, не забруднюють навколишнє середовище [1,6]. Гібереліни застосовують шляхом обприскування рослин в різні періоди зростання в залежності від бажаного результату. Тому гібереліни становлять інтерес для підвищення врожайності таких сільськогосподарських культур, як виноград, яблука, груша, вишня, слива, суниця, алича, персик, абрикос та ін[5].

Новизною даного проекту є використання штаму гриба *Fusarium moniliforme* NCIM 1100, який синтезує цільовий продукт (гібереліни) у концентрації 15 г/л [11], що є у 3 рази вищою, порівняно зі штамом-продуцентом

Gibberella fujikuroi ATCC12616 [12] для потреб садівництва України. Отримання кристалічного препарату гіберелінів шляхом очищення за допомогою сорбції та кристалізації після виділення цільового продукту за допомогою екстракції етилацетатом та переведенням гіберелінів у водний розчин використовуючи гідроксид натрію дозволяє очистити продукт до 95%. [29].

РОЗДІЛ 1.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Гібереліни відкрив японський фітопатолог Куросава у 1926 р. При дослідженні захворювання рису він виділив з рослин збудника захворювання – гриб *Fusarium heterosporum* – і висловив припущення, що цей гриб продукує речовини, які викликають витягування стебла рослин. Лише у 1935 р доктор Ябута зміг виділити дані речовини у кристалічному вигляді з гриба *Gibberella*. Ці речовини назвали гіберелінами. Пізніше біологічно активні речовини з властивостями гіберелінів одержали з недозрілого насіння бобових рослин. Отже, було встановлено, що гібереліни є нормальними продуктами життєдіяльності не тільки фітопатогенних мікроміцетів, а й вищих рослин [1].

Гібереліни – гормони росту рослин, які відносяться до класу дитерпенів. Вони є вторинними метаболітами ряду грибів, зокрема гриба *Gibberella fujikuroi*, недосконалою стадією якого є *Fusarium moniliforme*. Відомо більше 130 гіберелінів, що відрізняються за будовою. Найбільш розповсюдженим і вивченим є гіберелін А₃, чи гіберелова кислота (GA₃). Однак серед інших гіберелінів найбільший практичний інтерес можуть становити GA₄ і GA₇ [1, 2].

Фізіологічні функції гіберелінів. Виявлено, що гібереліни активують синтез нуклеїнових кислот, білків, контролюють синтез фосфоліпідів, збільшують частоту мітозів та скорочують тривалість утворення пластохінонів у конусі росту рослин. Гібереліни стимулюють поділ і розтягання клітин апікальних і інтеркалярних меристем. Гібереліни впливають на елонгацію стебла, листя, квітки, суцвіття стають крупнішими. Гібереліни відіграють важливу роль у процесах переходу рослин до цвітіння та статевого дозрівання[1,2].

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	Лім.	Арк.	Акрушіє
Розроб.		Лазюка Ю.В					9	4
Консульт.						Кафедра БТМ⁹		
Керівник		Скροцька О.І						
Н. Контр.								
Зав.каф.		Пирог Т.П						

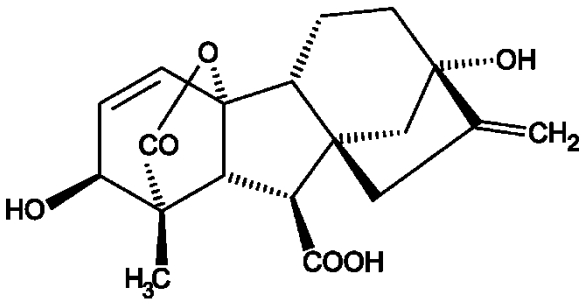
Обробка насіння і бульб гіберелінами викликає їх проростання, у ході якого контролюють ріст зародка, розм'якшення ендосперму і мобілізацію запасних поживних речовин для його живлення. Ця властивість набула практичного застосування в пивоварній промисловості для пришвидшення проростання ячменю й отримання солоду. Обробка рослин гіберелінами підвищує інтенсивність фотосинтезу, незважаючи на зменшення вмісту хлорофілу, підсилює дихання, при нормальному водопостачанні підвищується інтенсивність транспірації. Поглинання рослинами азоту, фосфору і калію також зазвичай зростає. Нестача активних гіберелінів викликає припинення росту плодів[2, 3].

Гібереліни – сильнодіючі гормони, тому повинні використовуватись у досить малих концентраціях, інакше спостерігається пришвидшений перехід рослини до старіння [4].

Фізико-хімічні властивості гібереліну A_3 наведено у таблиці 1.1.

Таблиця 1.1

Фізико-хімічна характеристика гібереліну A_3

Показник	GA_3
Хімічний клас сполук	дитерпени
Емпірична формула	$C_{19}H_{22}O_6$
Структурна формула	
Відносна молекулярна маса	346,4
Температура плавлення, °C	233–235 (з розкладом)
Температура розкладу, °C	> 215
Тиск пари, Па	1×10^{-5} (при 25 °C)
Розчинність у воді	При 20 °C (чистота технічного продукту 99 %): у чистій воді 4,28 г/л; буферний розчин: рН 4 – 11,7 г/л; рН 7 – > 250 г/л
Розчинність в органічних розчинниках	При 20 °C (чистота технічного продукту 98 %), г/л: н-гексан, толуол – < 0,01; ксилол – 0,078; дихлорметан – 0,032; метанол – 273; ацетон – 30,8; етилацетат – 3,1

Стійкість (ДТ ₅₀) у: - ґрунті (дні)	1,46–2,96 (аеробні умови)
- воді (дні)	2,3–4,4
- повітрі (год)	0,98

Мутагенна активність та онкогенність відсутні. Тератогенна дія спостерігається при концентрації GA₃ у організмі матері 1000 мг/кг.

Гібереліни є безпечними для здоров'я людини та навколишнього середовища при дотриманні рекомендацій з застосування. На основі високої селективності відносно рослин, низької токсичності та в зв'язку з природним походженням і малими нормами витрат гіберелінів є обґрунтованим недоцільність контролю за об'єктами навколишнього середовища в разі застосування препаратів на їхній основі[3].

Токсикологічна характеристика гібереліну A₃

LD ₅₀ (нашкірно), мг/кг	2000 (кролі)
Подразнююча дія	Помірна
Сенсибілізуюча дія	Відсутня

Одним з препаратів, що містить гібереліни є "Новагіб".



Рис 1.1. Зовнішній вигляд препарату "Новагіб"

РРР "Новагіб" – це розчинний концентрат суміші гіберелінів GA₄ (90 %) і GA₇ (10 %) у загальній кількості 10 г/л виробництва "Файн Агрокемікалс ЛТД"

(Великобританія) дозволений до використання в країні-виробнику та країнах ЄС (Бельгія, Угорщина, Польща, Словенія, Франція, Греція, Італія, Іспанія) [3].

Фізико-хімічна характеристика препарату "Новагіб"

Зовнішній вигляд	Чиста рідина без кольору зі спиртовим запахом
Водневий показник (рН)	4,3 (1,0 % розчин)
Питома вага, г/см ³	1,040
Тиск пари, Па	10,7 (при 20 °С)
Розчинність у воді	Розчинний
Кінематична в'язкість, мм ² /с	57,8
Температура займання, °С	86 (у закритому тиглі)

Гібереліни використовуються для обробки таких рослин, як виноград, яблуна, груша, вишня, слива, суниця, алича, персик, абрикос з метою стимулювання плодоутворення, прискорення росту та дозрівання плодів. Гібереліни застосовують шляхом обприскування рослин в різні періоди зростання в залежності від бажаного результату [5].

Препарати гіберелінів зберігаються 2-3 роки при плюсовій температурі. Розведений у воді порошок, готовий до застосування, зберігається не більше трьох діб у темному прохолодному місці[6].

РОЗДІЛ 2.

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування. Близько 40 видів грибів здатні до синтезу різних гіберелінів, особливо *Fusarium moniliforme*, який синтезує GA₁, GA₃, GA₄, GA₇, GA₉, GA₁₃, GA₁₄, GA₂₄, GA₃₆, GA₃₇, GA₄₀, GA₄₇, GA₅₄. Завдяки такій різноманітності й активному синтезу цей гриб використовується у промислових масштабах [7].

Але здатність до біосинтезу гіберелінів виявлена серед представників усіх груп мікроорганізмів. Багато бактерій здатні до синтезу гіберелінів: *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*. Мікроміцети, що належать до видів *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium corylophilum*, *P. cyclopium*, *P. funiculosum*, *Verticillum sp.*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizobium phaseoli*, *Shizophilum commune* також утворюють гібереліни. Активні продуценти гіберелінів трапляються серед фітопатогенних грибів: *Ustilago maydis*, *Sphaceloma manihoticola*, *Cercospora rosicola*, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium semitectum*, *F. acuminatum*, *F. anguioides*, *F. avenaceum*, *F. chlamydosporum*, *F. equiseti*, *F. osyrisporum*, *F. moniliforme*, *F. culmorum*. Різні гіберелові кислоти (GA₁, GA₃, GA₄, GA₇, GA₁₃) виявлені у конідіях *F. graminearum* [1, 8, 9].

У таблиці 2.1 наведена порівняльна характеристика штамів-надпродуцентів гіберелінів – *Fusarium moniliforme*, недосконала форма *Gibberella fujikuroi*.

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Акрушіє
Розроб.		Лазюка Ю.В					13	11
Консульт.						Кафедра БТМ ¹³		
Керівник		Скряцька О.І						
Н. Контр.								
Зав.каф.		Пирог Т.П						

Особливості одержання гіберелінів за допомогою

F. moniliforme ATCC 10052, *G. fujikuroi* ATCC 12616, *F. moniliforme* NCIM 1100

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація гібереліну GA ₃ , г/л	Тривалість культивування, год	Особливості процесу біосинтезу	Використана література, рік
<i>F. moniliforme</i> ATCC 10052	Альbedo апельсину – 30 NaNO ₃ – 3 K ₂ HPO ₄ – 1 CuSO ₄ ×5H ₂ O – 0,8 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5 KCl – 0,5 FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,01	15,97	168	гетерофазне культивування, 30 °C, pH= 5,0	<i>Patricia F Omojasola, Damola O. Adejoro.</i> Submerged fermentation of orange albedo to produce gibberellic acid using <i>Fusarium moniliforme</i> and <i>Aspergillus niger</i> // Jordan Journal of Biological Sciences. – 2018. – Vol. 11, № 2. – P. 187-194[10].
<i>G. fujikuroi</i> ATCC 12616	Пшеничні висівки – 800 Крохмаль – 200 Сечовина (0,25%) – 130 мл Ляна олія – 50 мл HCl – 0,005 ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,00004 CuSO ₄ ×5H ₂ O – 0,00004 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,00004	4,75 г/кг	144	поверхнєве культивування, 30 °C, pH= 5,5	<i>Corona A., Sa'ez D., Agosin E.</i> Effect of water activity on gibberellic acid production by <i>Gibberella fujikuroi</i> under solid-state fermentation conditions // Process Biochemistry. – 2005. – Vol. 1, № 40. – P. 2655-2658[11].
<i>F. moniliforme</i> NCIM 1100	Сахароза – 30 NaNO ₃ – 3 K ₂ HPO ₄ – 1 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5 KCl – 0,5 FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,01	15	192	глибинне культивування, 30°C, pH= 7	<i>Rangaswamy V.</i> Improved production of gibberellic acid by <i>Fusarium moniliforme</i> // J. of Microbiol. Res. – 2012. – Vol. 2, № 3. – P. 51-56[12].

За даними таблиці 2.1 можна зробити висновок, що найвищий показник синтезу цільового продукту (гіберелінів) досягається при культивуванні гриба *F. moniliforme* ATCC 10052. Порівняно зі штамом *F. moniliforme* ATCC 10052, синтетична здатність штаму *F. moniliforme* NCIM 1100 нижча майже на 1 г і час культивування у 1,14 разів довший. Найнижча концентрація гіберелінів спостерігається у штаму *G. fujikuroi* ATCC 12616, який продукує у 3,3 разів менше цільового продукту ніж штам *F. moniliforme* ATCC 10052.

Проте така порівняльна характеристика технологічного процесу є недостатньою. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента порівнювали вартість поживних середовищ, використовуваних для культивування продуцентів (таблиця 2.2).

Таблиця 2.2

**Вартість компонентів поживного середовища
для культивування *F. moniliforme* ATCC 10052, *G. fujikuroi* ATCC 12616,
F. moniliforme NCIM 1100**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1, 2)*
<i>F. moniliforme</i> ATCC 10052	Альбедо апельсину – 30	27	0,81	1
	NaNO ₃ – 3	17	0,051	1
	K ₂ HPO ₄ – 1	120	0,12	1
	CuSO ₄ ×5H ₂ O – 0,8	130	0,104	1
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5	10	0,005	1
	KCl – 0,5	28	0,014	1
	FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,01	4,40	0,00044	1
Вартість 1 л середовища – 1,1 грн				
<i>G. fujikuroi</i> ATCC 12616	Пшеничні висівки – 800	3,7	2,96	2
	Крохмаль – 200	33	6,6	2
	Сечовина (0,25%) – 130 мл	11,1	0,143	2
	Ляна олія – 50 мл	7,46	0,37	2
	HCl – 0,005	8	0,00004	2
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,00004	60	0,0000027	1
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,00004	10	0,0000004	1
	CuSO ₄ ×5H ₂ O – 0,00004	130	0,000005	1
Вартість 1 л середовища – 10 грн				

Закінчення табл. 2.2

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1, 2)*
<i>F. moniliforme</i> NCIM 1100	Сахароза – 30	12,20	0,366	1
	NaNO ₃ – 3	17	0,051	1
	K ₂ HPO ₄ – 1	120	0,12	1
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5	10	0,005	1
	KCl – 0,5	28	0,014	1
	FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,01	4,40	0,00044	1
	Вартість 1 л поживного середовища – 0,55			

Примітка.* – Ціни наведено станом на квітень 2019 р. 1. <https://prom.ua/>, 2. <https://kiev.flagma.ua>.

Дані, наведені у таблиці 2.2, засвідчують, що середовище для культивування *F. moniliforme* NCIM 1100 є у 18 рази дешевшим, ніж середовище для культивування *G. fujikuroi* ATCC 12616 та майже у 2 рази дешевшим, ніж середовище для культивування *F. moniliforme* ATCC 10052.

Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент розраховували умовну вартість 1 г цільового продукту – гіберелінів (таблиця 2.3).

Таблиця 2.3

**Умовна вартість цільового продукту (гіберелінів)
при культивуванні *F. moniliforme* ATCC 10052, *G. fujikuroi* ATCC 12616 та
F. moniliforme NCIM 1100**

Продуцент	Вартість 1л середовища, грн	Концентрація гіберелінів, г/л	Умовна вартість 1г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного гібереліну за годину, г/год
<i>F. moniliforme</i> ATCC 10052	1,1	15,97	0,068	168	0,095
<i>G. fujikuroi</i> ATCC 12616	10	4,75 г/кг	2,1	144	0,033
<i>F. moniliforme</i> NCIM 1100	0,55	15	0,036	192	0,078

Узагальнивши всі дані, можна зробити наступні висновки, що штам *G. fujikuroi* ATCC 12616 є комерційно не вигідним для промислового одержання гіберелінів тому, що середовище для його культивування і відповідно вартість 1 г продукту є набагато дорожчим за середовища для культивування і вартості продукту інших продуцентів, хоча тривалість його культивування є найкоротшою. Також реалізація поверхневого способу культивування є складнішою за реалізацію глибинного способу культивування.

Використання штаму *F. moniliforme* NCIM 1100 є більш доцільним для промислового виробництва гіберелінів ніж штам *F. moniliforme* ATCC 10052 тому, що вартість 1 г цільового продукту при культивуванні *F. moniliforme* NCIM 1100 є дешевшим у 1,7 рази, а середовище для культивування є у 2 рази дешевшим незважаючи на те, що біосинтетична здатність є майже однаковою.

Таким чином, на підставі проведеного аналізу штамів-продуцентів гіберелінів можна зробити висновок, що штам *F. moniliforme* NCIM 1100 є найоптимальнішим для введення у виробництво гібереліну.

2.2 Розрахунок складу поживного середовища. Для культивування продуцента гіберелінів *F. moniliforme* NCIM 1100 може бути використане середовище наступного складу, г/л:

Сахароза – 30

NaNO₃ – 3

K₂HPO₄ – 1

MgSO₄×7H₂O – 0.5

KCl – 0.5

FeSO₄×7H₂O – 0.01

Тривалість культивування 192 год, концентрація гібереліну в культуральній рідині становить 15 г/л. У відповідному літературному джерелі не вказана концентрація біомаси, тому концентрацію біомаси приймаємо таку, як у патенті "Способ получения гиббереллина" – 18 г/л [13].

2.2.1. Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення. Як джерело вуглецю використовується сахароза. Вміст Карбону у сахарозі становитиме:

$$K = \frac{30 \times 144}{342,3} = 12,62\text{г}$$

342,3 г/моль – молекулярна маса сахарози;

144 г/моль – молекулярна маса вуглецю у сахарозі;

30г – кількість вуглецю у середовищі.

Молекулярна маса гібереліну A_3 становить 346,4. Отже, у 346,4 г гібереліну міститься 228 г вуглецю, а в 15 г гібереліну міститься вуглецю:

$$C = \frac{15 \times 228}{346,4} = 10\text{г}$$

Отже, для біосинтезу 15 г гіберелінів потрібно 10 г вуглецю.

У біомасі міститься 50 % вуглецю, отже вміст вуглецю у 18 г біомаси становить 9 г. Враховуючи, що 50 % субстрату втрачається на "холосте окислення", то на синтез біомаси потрібно 18 г вуглецю.

Таким чином, для синтезу 18 г біомаси і 15 г гібереліну потрібно, щоб у поживному середовищі було вуглецю:

$$18 + 10 = 28\text{г}$$

Вміст джерела вуглецю в середовищі становить 12 г. Отже, можна зробити висновок, що вуглецю у середовищі міститься недостатньо.

2.2.2. Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення. Припустимо, що у біомасі міститься 10 % азоту. Таким чином, у 18 г біомаси вміст азоту становить 1,8 г.

Молекулярна маса NaNO_3 становить 85. Отже, у 85 г нітрату амонію міститься 14 г азоту, тоді 1,8 г азоту буде міститись у:

$$X = \frac{85 \times 1,8}{14} = 11\text{г солі}$$

У склад гібереліну азот не входить, тому вміст NaNO_3 у середовищі має становити 11 г.

Вміст джерела азоту в середовищі становить 3 г. Можна зробити висновок, що азоту у середовищі міститься недостатньо.

Отже, враховуючи кількість джерела азоту у поживному середовищі, робимо перерахунок концентрації біомаси. Вміст азоту становитиме, г:

$$X_1 = \frac{3 \times 14}{85} = 0,5$$

Враховуючи, що у біомасі міститься 10 % азоту, 0,5 г азоту буде міститись у 5 г біомаси.

2.2.3. Перерахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення. Як джерело вуглецю використовується сахароза. Вміст Карбону у сахарозі становитиме:

$$K_1 = \frac{30 \times 144}{342,3} = 12,62\text{г}$$

342,3 г/моль – молекулярна маса сахарози;

144 г/моль – молекулярна маса вуглецю у сахарозі;

30г – кількість вуглецю у середовищі.

Молекулярна маса гібереліну A_3 становить 346,4. Отже, у 346,4 г гібереліну міститься 228 г вуглецю, а в 15 г гібереліну міститься вуглецю:

$$C_1 = \frac{15 \times 228}{346,4} = 10\text{г}$$

Отже, для біосинтезу 15 г гіберелінів потрібно 10 г вуглецю.

У біомасі міститься 50 % вуглецю, отже вміст вуглецю у 5 г біомаси становить 2,5 г. Враховуючи, що 50 % субстрату втрачається на "холосте окислення", то на синтез біомаси потрібно 5 г вуглецю.

Таким чином, для синтезу 5 г біомаси і 15 г гібереліну потрібно, щоб у поживному середовищі було вуглецю:

$$5 + 10 = 15\text{г}$$

Вміст вуглецю в середовищі становить 12,62 г. Отже, можна зробити висновок, що вуглецю у середовищі міститься недостатньо. Рекомендовано збільшити кількість сахарози у середовищі на 5 г.

2.2.4. Розрахунок вмісту в середовищі джерела фосфору. У біомасі міститься близько 3 % фосфору. Отже, для синтезу 5 г/л біомаси вміст фосфору у середовищі повинен становити:

$$Y = 5 \times 0,03 = 0,15 \text{ г/л}$$

Вміст джерела фосфору в середовищі становить 1 г. Отже, фосфору у середовищі міститься майже у 6 рази більше, ніж потрібно.

За результатами розрахунків можна зробити висновок, що кількість розрахованого джерела вуглецю недостатньо, рекомендовано збільшити теоретичне значення на 5 г, кількість розрахованого джерела азоту співпадає з теоретичним значенням, а кількість розрахованого джерела фосфору перевищує теоретичне значення у 6 разів.

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

2.3.1. Морфолого-культуральні ознаки. Повітряний міцелій *G. fujikuroi* добре розвинений, септований, плівчасто-павутинистий, спочатку рожевуватий, з віком інтенсивно рожевий. Строма винно-рожевого кольору.

На сусло-агарі культура швидкозростаюча. Гриб утворює субстратний і повітряний міцелій. Повітряний міцелій білий, пухнастий. Колонії щільні, білі.

На картопляно-глюкозному агарі повітряний міцелій розвинений від слабкого до помірного, щільний, притиснутий до субстрату, білий. Субстрат не забарвлений.

При глибинному способі культивування на середовищі гриб росте рівномірно, кашоподібно. Культуральна рідина брудно-сірого кольору[14].



Рис.2.1. Характер росту *G. fujikuroi* на твердому поживному середовищі

За безстатевого розмноження утворюють макроконідії та мікроконідії. Макроконідії шилоподібні, злегка серповидні, слабо звужуються до обох кінців, з чітко вираженою ніжкою біля основи, з 3-5 перегородками розміром від 20-27×4,0-4,7 мкм до 45-50×5,0-5,6 мкм. Мікроконідії ланцетоподібні, овальні, яйцеподібні, звужені біля основи, одноклітинні або з однією перетинкою розміром 7-8×2-4 мкм.

За статевого способу розмноження гриб утворює аскоспори, які вміщені всередині мішка відомого як аск. Аски містяться в плодовому тілі, яке називається аскокарпом типу перитецію. Перитецій має сферичну або овальну форму розміром 250-330×220-280 мкм, забарвлена у синій колір. Аски мають циліндричну форму і розмір 90-102×7-9 мкм. Можуть містити 4, 6, рідко 8 спор[15].

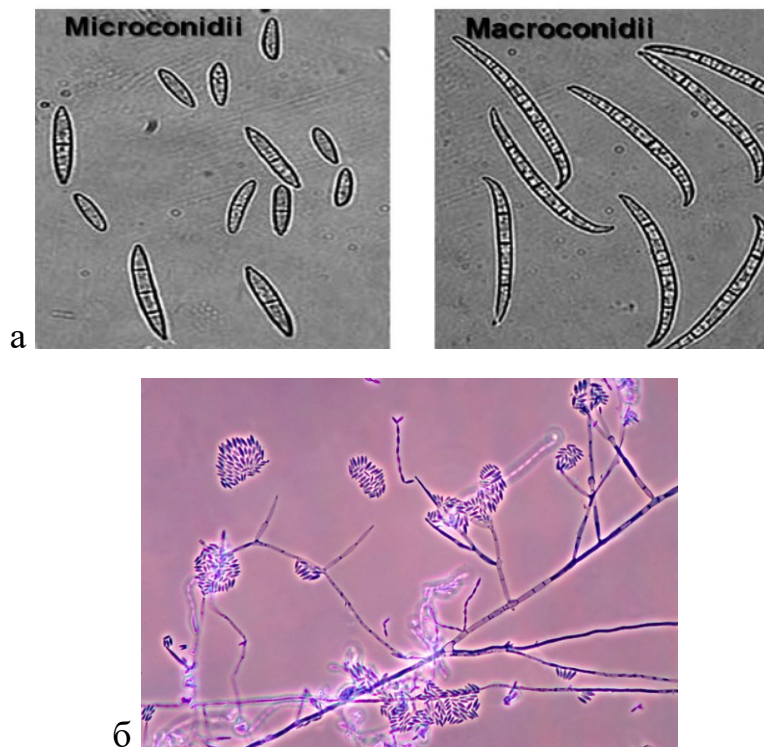


Рис.2.2. а – мікро-, макроконідії *G. fujikuroi* (*F.moniliforme*), б – конідієносці з конідіями *G. fujikuroi* (*F.moniliforme*)

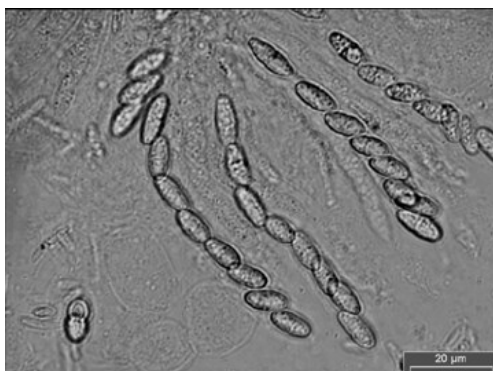


Рис.2.3. Аскоспори *G. fujikuroi*

2.3.2. Фізіолого-біохімічні ознаки. Строгий аероб. Продукент може рости у діапазоні рН від 1 до 10 та температурі від 23°C до 37°C. Максимальний ріст спостерігається при 28 °С, максимальний синтез гіберелінів спостерігається при 30°C. При підвищенні температури до 37 °С синтез гібереліну майже припиняється. При зменшенні температури до 23 °С кількість гібереліну у культуральній рідині зменшується у 3 рази у порівнянні із максимальним значенням. [12].

За типом живлення, як і всі еукаріоти, є хемоорганогетеротрофом. Утилізує такі джерела вуглецю: глюкоза, сахароза, розчинний крохмаль, рослинні олії. Як джерело азоту може використовувати: сульфат амонію, нітрат амонію, сечовину.

Як і всі гриби *G. fujikuroi* є чутливим до таких антибіотиків, як гризеофульвін, який пригнічує синтез клітинної стінки, та ністадин, який зв'язує стероли цитоплазматичної мембрани та клітинної стінки [16].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента.

Статус *G. fujikuroi* згідно філогенетичної систематики

Домен:	<i>Eukarya</i>
Царство:	<i>Fungi</i>
Відділ:	<i>Ascomycota</i>
Підвідділ:	<i>Pezizomycotina</i>
Клас:	<i>Sordariomycetes</i>
Підклас:	<i>Hypocreomycetidae</i>
Порядок:	<i>Hypocreales</i>
Родина:	<i>Nectriaceae</i>
Рід:	<i>Gibberella</i>
Вид:	<i>fujikuroi</i> [17]

Згідно систематики грибів 78- го року за Cl. Moreau *G. fujikuroi* має такий таксономічний статус:

Статус *G. fujikuroi* за Cl. Moreau

Царство:	<i>Fungi</i>
Відділ:	<i>Eumycota</i>
Клас:	<i>Deyteromycetes</i>
Порядок:	<i>Hyphales</i>
Родина:	<i>Phialosporae</i>
Рід:	<i>Fusarium</i> [16]

Як видно з наведених даних, таксономічне положення *G. fujikuroi* згідно філогенетичної систематики сильно змінилось, порівнюючи з фенотиповою систематикою. Треба зазначити, що у сучасній класифікації виключено клас *Deyteromycetes*. На сьогодні *G. fujikuroi* розміщена у відділ *Ascomycota*, так як для цього виду був відкритий статевий процес, який відбувається подібно до аскоміцетів, тобто з утворенням аскоспор.

РОЗДІЛ 3.

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті. Загальні площі під плодовими та ягідними культурами у плодоносному віці сягають близько 200 тис. га. Більшість площ багаторічних насаджень знаходиться під зернятковими культурами, які у 2017 році займали площу у 105 тис. га. Кісточкові культури приносили урожай на 61 тис. га, ягоди вирощувались на 22 тис. га [18].

Препарати на основі гіберелінів застосовують шляхом обприскування рослин в різні періоди зростання в залежності від бажаного результату. Для обприскування рослин використовують дуже слабкі водні розчини препарату. Підвищення концентрації понад рекомендованої норми, знижує його позитивний ефект.

Кількість обробок за 1 сезон – 2[6]. Витрата гіберелінів – 0,1 г/л для обробки 1 га [19].

За даними річного галузевого звіту з садівництва та ягідництва за 2017 р плодово-ягідні культури займають наступні площі (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Вихідні данні для розрахунку річної потреби у препараті гіберелінів для вирощування плодових та ягідних культур

Культури рослин	Площі насаджень, тис. га	Кількість гіберелінів для однієї обробки, г/га	Кількість обробок за сезон, шт.	Сумарна кількість препарату, г/га	Необхідна кількість препарату для сезонної обробки, г
Зерняткові	105	0,1	2	0,2	21000
Кісточкові	61				12200
Ягоди	22				4400
Всього препарату 37600 г					

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Лазюка Ю.В			РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушіє
Консульт.							24	7
Керівник		Скряцька О.І						24
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П						

3.2. Розрахунок потужності виробництва. На ринку України представлені препарати гіберелінів таких видів (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Препарати гіберелінів, представлені на ринку України

Назва препарату	Товарна форма	Фасовка	Вміст діючої речовини, г	Виробник (країна)
Гібберелін кристаличний	Порошок	0,3г	0,234	Зелена аптека садова (Росія)
Gibberellic acid	Таблетка	5г	1	Mitsui Agro (Японія)
Gibb plus	Розчин	1л	11,4	GlobachemNV (Польща)
Novagib	Розчин	1л	10	Файн Агрокемікалс Лтд (Великобританія)
Kristalyos Gibberelin	Порошок	50г	45	Алантис (Угорщина)

Ціна коливається від 3грн до 50грн за 1г(мл).

Зважаючи на наявні на ринку України препарати гіберелінів, які забезпечують 46% потреби ринку, кількість препарату гіберелінів, яку потрібно випустити на рік, щоб забезпечити цим фактором росту 44% ринку буде становити:

$$G = \frac{37600 \times 44}{100} = 16544\text{г} \approx 16,5\text{кг гіберелінів}$$

Враховуючи, що *F. moniliforme* NCIM 1100 синтезує 15 г на 1 літр GA₃ культуральної рідини [7], кількість культуральної рідини, необхідної для отримання 16,5 кг GA₃ становить:

$$\begin{aligned} 15\text{г} &- 1\text{л} \\ 16500\text{г} &- X\text{л} \\ X &= 1100\text{л} \end{aligned}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (40%), необхідно отримувати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = \frac{1100}{1 - (0,3 + 0,1)} = 1833\text{л}$$

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

Для забезпечення 44% ринку препаратом гібереліну, потрібно одержати 1833 л культуральної рідини ($V_{гп}$).

Зважаючи на те, що обробка гіберелінами є сезонною (квітень-травень), приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 30 (виробництво буде тривати з лютого по березень), тоді кількість продукту на добу ($V_{д}$) становитиме:

$$V_{д} = \frac{V_{гп}}{Трд} = \frac{1833}{30} = 61 \text{ л}$$

Кількість продукту за цикл ($V_{кр}$) буде становити:

$$V_{кр} = \frac{K_1 \times V_{д} \times T_{цф}}{24} = \frac{1,1 \times 61 \times 200}{24} = 560 \text{ л/цикл,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (192 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1=1,1-1,5$).

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

560 л культуральної рідини ($V_{цк}$) можна отримати у ферментері такого геометричного об'єму:

$$V_{г} = \frac{V_{цк}}{K_{зап}} = \frac{560}{0,6} = 933 \text{ л,}$$

де $K_{зап} = 0,6$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Найближчий ферментер за геометричним об'ємом $V_{ф} = 1000$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зф} = \frac{V_{цк}}{V_{ф}} = \frac{560}{1000} = 0,56$$

що не перевищує заданого значення.

На основі вище наведеного обґрунтування схема визначення необхідності кількості культуральної рідини, яку необхідно отримати, матиме наступний вигляд:

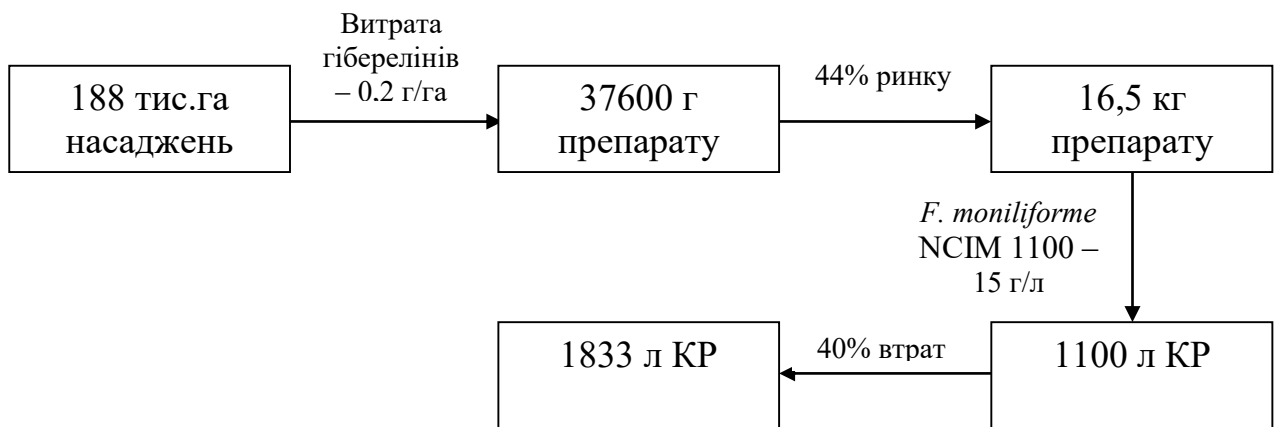


Рис.3.1. Схема визначення необхідної кількості культуральної рідини

Оскільки виробництво гіберелінів триватиме 30 днів, то пропонується використовувати потужності виробництва також для виготовлення інших факторів росту рослин таких, як ауксини та цитокініни.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу. За один виробничий цикл отримують $V_{кр} = 560$ л культуральної рідини.

При отриманні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати через краплевинос, який здійснюється колектор відпрацьованого повітря і становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{ф}} = \frac{560}{1 - 0,15} = 660 \text{ л,}$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментаційному обладнанні з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 3,53 \text{ м}^3$.

При коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,6$ розраховують геометричний об'єм ферментера ($V_{ф}$), що становить:

$$V_{ф} = \frac{V_{роб.1}}{K_{зап}} = \frac{660}{0,6} = 1100 \text{ л}$$

Приймаємо стандартний ферментер найближчий за об'ємом $V_{сф} = 1000$ л, та уточнюємо прийнятий коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап1} = \frac{V_{роб.1}}{V_{сф}} = \frac{660}{1000} = 0,66$$

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері становитиме:

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб.1}}{1 + X_{ф}} = \frac{660}{1 + 0,1} = 600 \text{ л,}$$

де $X_{ф} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментатора.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 660 - 600 = 60 \text{ л}$$

Для одержання 60 л інокуляту в посівному апараті врахуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, що становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.2} = \frac{V_{пм1}}{1 - E_{па}} = \frac{60}{1 - 0,15} = 70,5 \text{ л}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс2} = \frac{V_{роб.2}}{1 + X_{па}} = \frac{70,5}{1 + 0,1} = 64 \text{ л}$$

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

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 70,5 - 64 = 6,5 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 70,5$ л можна одержати під час культивування грибів у посівному апараті з геометричним об'ємом:

$$V_{па2} = \frac{V_{роб.2}}{K_{зап}} = \frac{70,5}{0,6} = 117 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 100$ л, уточнюємо прийнятний коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап1} = \frac{V_{роб.2}}{V_{сф}} = \frac{70,5}{100} = 0,7$$

Для одержання 6,5 л інокуляту в інокуляторі врахуємо втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість посівного матеріалу та поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.3} = \frac{V_{пм2}}{1 - E_{ін}} = \frac{6,5}{1 - 0,15} = 7,6 \text{ л}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{пс3} = \frac{V_{роб.3}}{1 + X_{ін}} = \frac{6,5}{1 + 0,1} = 6 \text{ л}$$

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

Кількість посівного матеріалу для інокулятору становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 7,6 - 6 = 0,4 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.3} = 6,5$ л можна одержати під час культивування грибів у інокуляторі геометричним об'ємом:

$$V_{ін3} = \frac{V_{роб.3}}{K_{зап}} = \frac{6,5}{0,6} = 10,8 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 10$ л, уточнюємо прийнятний коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап1} = \frac{V_{роб.3}}{V_{сф}} = \frac{6,5}{10} = 0,65$$

Кількість інокуляту для засіву інокулятора $V_{пм3} = 0,4$ л можна одержати культивуванням грибів у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення 0,2.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пмЗ}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{400}{750 \times 0,2} = 2,6$$

Таким чином, для одержання інокуляту необхідно 3 качалочні колби.

Отже, процес отримання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу гіберелінів у ферментері об'ємом 1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи: 1 – вирощування у лабораторії (на скошеному агаризованому середовищі в пробірках і на рідкому поживному середовищі в колбах на качалці); 2-3 – вирощування в інокуляторі та посівному апараті об'ємом: 2 – 0,01 м³; 3 – 0,1 м³; 4 – виробничий біосинтез 1 м³.

Таким чином, за результатами розрахунків для біосинтезу гіберелінів за допомогою *F. moniliforme* NCIM 1100 приймаємо для встановлення один ферментер об'ємом 1 м³, один посівний апарат об'ємом 0,1 м³ і один інокулятор об'ємом 0,01 м³.

РОЗДІЛ 4.

БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму сахарози ростового субстрату. Джерелом енергії та вуглецю (ростовим субстратом) у поживному середовищі для біосинтезу гіберелінів є сахароза.

Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes Genomes сахароза попередньо розщеплюється у клітині на фруктозу і глюкозу за допомогою β -фруктофуранозидази (КФ. 3.2.1.26). Глюкоза залучається до гліколізу, перетворюючись на глюкозо-6-фосфат під дією ферменту гексокінази (КФ. 2.7.1.1). Фруктоза залучається до гліколізу, перетворюючись на глюкозо-6-фосфат за допомогою ферменту глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ. 5.3.1.9). Також цей фермент каталізує взаємне перетворення α -D-глюкозо-6-фосфату, β -D-фруктозо-6-фосфату та β -D-глюкозо-6-фосфату[20].

Катаболізм глюкозо-6-фосфату відбувається за шляхом Ембдена-Мейєгофа-Парнаса (гліколіз), про що свідчить наявність відповідного ключового ферменту 6-фосфофруктокінази (КФ. 2.7.1.11).

Гліколізу у *Fusarium moniliforme* NCIM 1100 притаманні певні особливості, пов'язані з ферментами, що функціонують у даному метаболічному шляху.

β -D-Глюкозо-6-фосфат під дією 6-фосфофруктокінази (КФ. 2.7.1.11) перетворюється на β -D-фруктозо-1,6-дифосфат, частина якого за допомогою фруктозо-1,6-дифосфатази (КФ. 3.1.2.11) зворотно перетворюється на попередню сполуку.

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Лазюка Ю.В			РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушіє
Консульт.							31	4
Керівник		Скороцька О.І				31		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П						

Фермент фруктозодифосфатальдолаза (КФ. 4.1.2.13) здійснює перетворення β -D-фруктозо-1,6-дифосфат на дві сполуки: гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат.

Ізомеризація 3-фосфогліцерату відбувається під дією ферменту 2,3-дифосфогліцератзалежної фосфогліцератмутази (КФ. 5.4.2.12).

Заключною реакцією гліколізу є перетворення фосфоенолпірувату на піруват, що каталізується ферментом піруваткіназою (КФ. 2.7.1.40). Далі піруват залучається до метаболізму за участю специфічної піруватдегідрогенази E1 (КФ. 1.2.4.1) та піруватдегідрогенази E2 (КФ. 2.3.1.12)[21].

Схему катаболізму сахарози за шляхом Ембдена-Мейєогофа-Парнаса наведено на рис.4.1.

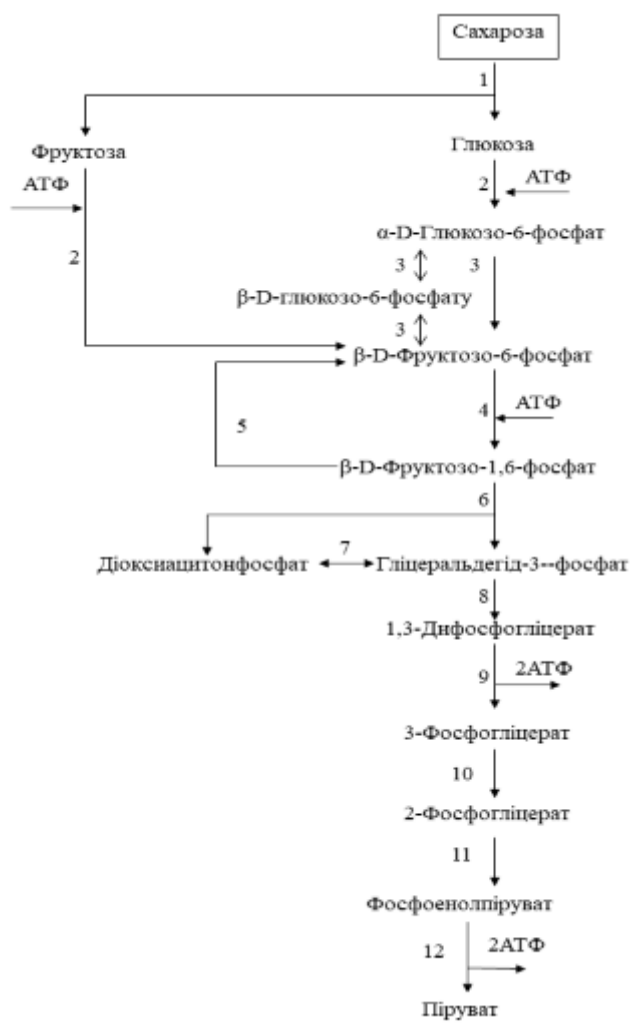


Рис.4.1. Катаболізм сахарози у *F. moniliforme* NCIM 1100 за шляхом Ембдена-Мейєогофа-Парнаса

Ферменти: 1 – β -фруктофуранозидаза (КФ. 3.2.1.26); 2 – гексокіназа (КФ. 2.7.1.1); 3 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ. 5.3.1.9); 4 – 6-фосфофруктокіназа (КФ. 2.7.1.11); 5 – фруктозо-1,6-дифосфатаза (КФ. 3.1.2.11); 6 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ. 4.1.2.13); 7 – тріозофосфатізомераза (КФ. 5.3.1.1); 8 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ. 1.2.1.12); 9 – фосфогліцераткіназа (КФ. 2.7.2.3); 10 – 2,3-дифосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ. 5.4.2.12); 11 – енолаза (КФ. 4.2.1.11); 12 – піруваткіназа (КФ. 2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.

Попередником біосинтезу гіберелінів є ацетил-КоА, який утворюється з пірувату за допомогою ферментів піруватдекарбоксилази (КФ. 4.1.1.1), піруватдегідрогенази E1 (КФ. 1.2.4.1) та E2 (КФ. 2.3.1.12) відповідно.

Ацетил-КоА бере участь у перших трьох реакціях синтезу гіберелінів. Продуктом цих реакцій є 3-окси-3-метилглутарил-КоА, який за допомогою ферменту гідроксиметилглутарил-КоА редуктази (КФ. 1.1.1.34) перетворюється на мевалонову кислоту, яка у свою чергу піддається трьохступеневому фосфорилуванню, на першому етапі якого утворюється 5-фосфомевалонна кислота, далі – 5-пірофосфомевалонна кислота, останньою реакцією є утворення ізопентенілпірофосфату, що ізомерується з утворенням диметилалілпірофосфату. Під дією ферменту геранілдифосфатсинтази (КФ. 2.5.1.1) ізопентенілпірофосфат і диметилалілпірофосфат перетворюється у геранілпірофосфат. Подальші перетворення проходять у утворенням фернезілпірофосфату (C15-сполуки) під дією фарнезілдифосфатсинтази (КФ. 2.5.1.10) та геранілгеранілпірофосфату (C20-сполуки) під дією геранілгеранілдифосфатсинтази (КФ. 2.5.1.29)[22].

Подальша циклізація геранілгеранілпірофосфату за участі ферменту енткопалілдифосфатсинтази (КФ. 5.5.1.13) приводить до утворення копалілпірофосфату, який є трициклічною структурою. Замкнення четвертого циклу відбувається під дією ферменту ент-кауренсинтази (КФ. 4.2.1.19) з утворенням тетрациклічної сполуки – каурену. Далі каурен окиснюється за

допомогою ент-кауренооксидази (КФ. 1.14.14.86) з утворенням спочатку кауренолу, далі – кауреналя та кауренової кислоти. Перетворення кауренової кислоти на 7-оксикауренову кислоту відбувається за участі ферменту ент-кауренатмонооксигенази (КФ. 1.14.14.107).

Під дією цього ж ферменту з 7-оксикауренової кислоти утворюється альдегід першого гібереліну – A_{12} , який у свою чергу перетворюється на альдегід гібереліну A_{14} за участю монооксигенази 1 цитохрому P450 (P450-1). Також P450-1 каталізує окиснення альдегіду GA_{14} до гібереліну A_{14} . Подальше перетворення GA_{14} спочатку на GA_{37} , а далі – на GA_{36} та GA_4 відбувається під дією монооксигенази 2 цитохрому P450 (P450-2). Трансформація гібереліну A_4 у гіберелін A_7 проходить за допомогою ферменту GA_4 -десатурази (ДЕС).

Заключною реакцією, в результаті якої утворюється найактивніший гіберелін – A_3 , є перетворення гібереліну A_7 під дією монооксигенази 3 цитохрому P450 (P450-3)[23].

Для поповнення у *F. moniliforme* NCIM 1100 запасів оксалоацетату як проміжного продукту біосинтезу і попередника у синтезі амінокислот функціонує анаплеротична реакція – карбоксилювання фосфоенолпірувату за участі ферменту фосфоенолпіруваткарбоксилази (КФ. 4.11.49).

Схему перетворення ростового субстрату (сахароза) на суміш кінцевих продуктів наведено у додатку 2.

РОЗДІЛ 5.

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.

Оскільки оптимальною температурою для вирощування штаму *F. moniliforme* NCIM 1100 з метою отримання максимальної кількості гіберелінів (15 г/л) є 30°C, а оптимальним значенням рН є 7, то можливий ризик контамінації сторонніми мезофільними і нейтрофільними мікроорганізмами. Це зумовлює обов'язковість забезпечення асептичних умов під час культивування шляхом стерилізації обладнання і комунікацій, аераційного повітря та поживного середовища. Для запобігання контамінації в ферментаторі також створюватиметься надлишковий тиск.

Гібереліни – це метаболіти, які виділяються з клітини у культуральну рідину (екзометаболіти).

У зв'язку з викладеним матеріалом, культивування *F. moniliforme* NCIM 1100 для отримання гіберелінів здійснюватиметься глибинним способом тому, що забезпечення асептичних умов культивування та виділення з твердого поживного середовища екзометаболітів є ускладненим.

Гібереліни є вторинними метаболітами, активний синтез яких відбувається в стаціонарній фазі росту продуцента. Проте, є дані про синтез цих сполук паралельно з ростом продуцента, але максимальна концентрація гіберелінів досягається після припинення росту. Отже, біосинтез гіберелінів буде здійснюватися періодичним способом.

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Лазюка Ю.В			РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушіє
Консульт.							35	32
Керівник		Скроцька О.І				35		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П						

Оскільки продуцент є облигатним аеробом та біосинтез гіберелінів включає багато окислювальних етапів, то висока аерація (0,8 г O₂/л×год) є необхідною умовою для досягнення їх максимальної концентрації [24].

Оскільки *F. moniliforme* NCIM 1100 утворює міцелій у процесі культивування, надлишкові зрізові зусилля, які присутні у біореакторах з турбінною мішалкою, будуть негативно впливати на фізіологічні властивості продуцента. Отже, ферментер з лопатевою мішалкою, яка є менш швидкісною ніж турбінна (120 об/хв), та барботажним типом аерації буде більш доцільним для культивування *F. moniliforme* NCIM 1100.

У результаті проведеного аналізу, можна порекомендувати ферментер BIORUS 1000L для виробничого біосинтезу гіберелінів на основі культивування гриба *F. moniliforme* NCIM 1100. Ферментер обладнаний шестилопатевою мішалкою, трьома відбійниками, барботером, клапаном для відбору проб, датчиками контролю швидкості мішалки, температури, рН, аерації, рівня піни, фільтрами, лінією газопостачання та конденсатором [25].



Рис 5.1. Вигляд ферментера BIORUS 1000L

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря. Для синтезу гіберелінів необхідний високий рівень аерації, адже продуцент є облигатним аеробом та біосинтез гіберелінів включає багато окислювальних етапів. Тому підготовка стерильного аераційного повітря при культивування штаму *F.*

moniliforme NCIM 1100 є однією з важливих завдань на біотехнологічному підприємстві.

Для стерилізації повітря в лабораторіях, де працюють з посівним матеріалом, використовують УФ-лампи.

Підготовка аераційного повітря складається з таких стадій:

- забір атмосферного повітря здійснюються з використанням вертикальної труби з повітрязабірником, який знаходиться на 2 м вище від рівня даху будівлі, де розташовується обладнання для стиснення та очищення повітря;

- очищення повітря від пилу ($\delta > 50 \mu\text{м}$) на фільтрах грубого очищення;

- стиснення повітря в компресорах (нагрів повітря до 120-170°C);

- охолодження повітря до температури "точки роси", за якої волога повітря зконденсовується;

- видалення вологи, що конденсувалась, та парів мастила, що потрапили з компресора у ресивер, що можуть негативно впливати на роботу фільтрів для очищення повітря;

- стабілізація показників, таких як тиск та температура, шляхом підігрівання до температури 45-50°C парою у відповідних теплообмінниках;

- очищення у головних фільтрах до ступеня очищення 98%. Головні фільтри встановлюють на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря в цеху ферментації;

- очищення на індивідуальних фільтрах. Повітря від головних фільтрів подається до індивідуальних фільтрів через трубопроводи, встановлених безпосередньо перед кожним біореактором. При цьому повітря очищається до ступеня очищення 99,9999%.

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів. Габаритні розміри основного обладнання наведено у табл.5.1.

Габаритні розміри обладнання для виробництва гіберелінів

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Виробничий ферментер	1000	1	2
Реактор-змішувач для приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу	600	0,8	1,6
Посівний апарат	100	0,5	1
Реактор-змішувач для приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу	60	0,4	0,8
Реактор-змішувач для приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу	60	0,4	0,8
Інокулятор	10	0,25	0,5

Виробництво гіберелінів здійснюється упродовж 30 днів. Оптимальна площа виробничого приміщення, в якій знаходяться ферментер (об'єм ферментатора становить 1 м³) для виробничого біосинтезу, майданчик обслуговування (1 м×1 м), збірник для приготування розчину сахарози (60 л), реактор-змішувач для приготування розчину солей (600 л), посівний апарат об'ємом 100 л, реактор-змішувач для приготування розчину солей (60 л), інокулятор об'ємом 10 л, СІР-мийка та інше обладнання становить 24 м² (6×4 м). Висота стін становить 3,5 м. Загальна площа стін становить $((6 \times 2,5) + (4 \times 2,5)) \times 2 = 50$ м². Площа підлоги становить 24 м².

Оптимальна площа приміщення лабораторії, в якій знаходяться бокс, автоклав, термостат, холодильник, мийка, вимірювальні прилади становить 15м² (5×3 м). Висота стін становить 2,5 м. Загальна площа стін становить $((3 \times 2,5) + (5 \times 2,5)) \times 2 = 40 \text{ м}^2$. Площа підлоги становить 15 м².

Площі поверхонь, які необхідно мити та/або дезинфікувати наведені у табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Розрахунок площі миття та/або дезинфекції оброблюваних об'єктів за весь період виробництва гіберелінів

Об'єкт миття та/або дезинфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (л)	Кількість процесів миття та/або дезинфекцій за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезинфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)
Обладнання, інвентар, комунікації	1830	3	5490
Підлога	39	30	1170
Стіни, двері, вікна	90	1	90

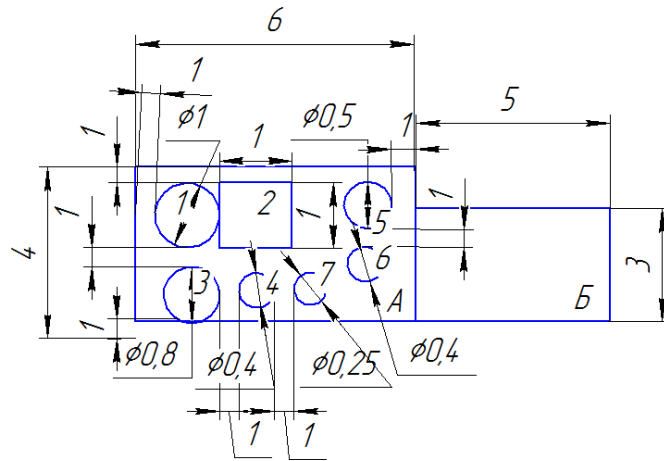


Рис.5.2. Схема розміщення обладнання у виробничому цеху

1 – виробничий ферментер, 2 – обслуговуючий майданчик, 3, 4, 6 – реактори-змішувачі, 5 – посівний апарат, 7 – інокулятор

Щоб обрати миючий та дезинфікувальний засіб, необхідно врахувати витрати на оброблювання потрібної площі приміщення та його вартість. На 1 м² витрачається 100 мл робочого розчину миючого чи дезинфікувального засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).

Вартість концентратів мийних та дезинфікувальних засобів та їх витрати наведено в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва гіберелінів

Назва мийного/дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Кальцинована сода	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	5490	1098	21	461,2
Каустична сода	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	5490	1098	21,9	481
Аллесреїнігер (а-ПАР, н-ПАР, ЕДТА)	Обладнання, інвентар, комунікації	1,0	5490	1098	170	186,6
Біолонг (спирти)	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар, тара	0,5	1260	126	67,6	42,6
Дезефект (четвертинні амонієві солі)	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар, тара	0,2	1260	126	308,4	77,7
Полідез-А (гуанідинові сполуки)	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар, тара	0,2	1260	126	162	40,8

* – ціни наведено, станом на жовтень 2019 р.

Проаналізувавши дані, наведені у табл.2.2, можна зробити такі висновки:

- для миття інвентарю, обладнання, тари, комунікацій, доцільно використовувати мийний засіб "Аллесрейнігер", оскільки цей мийний засіб є ефективним детергентом та дає змогу заощадити кошти [26];

- для миття та дезинфекції підлоги, стін, вікон та дверей доцільно використовувати засіб "Полідез-А", оскільки цей мийний засіб є ефективним, безпечним, стабільним, може мати пролонгований ефект та дає змогу заощадити кошти [27].

Не зважаючи на те, що виробництво триває 30 днів, рекомендовано змінити дезинфікувальний засіб перед виробництвом інших сільськогосподарських продуктів мікробіологічного походження. Отже, для миття та дезинфекції стін, підлоги, вікон та дверей доцільно використовувати засіб "Біолонг", тому що діючою речовиною є спирти, тобто можуть розвинути дезрезистентні форми мікроорганізмів. Також він дає змогу заощадити кошти [28].

Миття ферментера (1 м^3), посівного апарату ($0,1\text{ м}^3$), інокулятора ($0,01\text{ м}^3$) збірників для приготування композицій для вирощування посівного матеріалу та для виробничого культивування (загалом $0,72\text{ м}^3$) відбуватиметься за допомогою СІР-мийки. Об'єм мийного засобу складатиме близько 20% кожного з відповідних об'єктів обладнання. Всього для одного циклу необхідно витратити приблизно 366 л робочого розчину мийного засобу, а для всього періоду виробництва – $1,1\text{ м}^3$.

Підлогу необхідно мити та дезинфікувати кожного дня (всього 30 разів), стіни, двері та вікна – 1 раз на місяць, тобто 1 раз.

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.

Для культивування гриба *F. moniliforme* NCIM 1100 з метою отримання гіберелінів у концентрації 15г/л використовується поживне середовище наступного складу, г/л: сахароза – 35; NaNO_3 – 3; K_2HPO_4 – 1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 [12].

Виробничий біосинтез гіберелінів здійснюється у ферментері об'ємом 1 м³, що містить 660 л середовища. Одержання інокуляту відбувається у три етапи (у колбах на качалці, інокуляторах об'ємом 0,01 м³ та 0,1 м³).

5.1.4.1. Приготування та стерилізація розчинів соляної кислоти та гідроксиду натрію. З метою економії усі солі стерилізуються разом при приготуванні поживного середовища для вирощування посівного матеріалу. Для унеможливлення випадання осаду фосфату магнію стерилізація проводиться при рН 4,0. Отже, потрібно підготувати розчин 6% соляної кислоти для встановлення рН 4,0 при стерилізації солей, і розчин 6% гідроксиду натрію для встановлення рН 7,0 для культивування. Для становлення рН 4,0 при стерилізації солей та рН 7,0 для культивування потрібно використати на 1 л середовища 2 мл гідроксиду натрію та 2 мл соляної кислоти на 1л композиції солей.

Для вирощування посівного матеріалу у посівному апараті об'ємом 100 л необхідно приготувати 104 мл розчину соляної кислоти та 980 мл розчину гідроксиду натрію у колбах об'ємом 200 мл та 2 л відповідно.

Для виробничого культивування у ферментері об'ємом 1 м³ необхідно приготувати 128 мл розчину соляної кислоти та 1,2 л розчину гідроксиду натрію у колбах об'ємом 200 мл і 3 л відповідно.

5.1.4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища. Для першої стадії підготовки посівного матеріалу потрібно приготувати 0,4 л поживного середовища. Залежно від режиму стерилізації та взаємодії компонентів середовища можна поділити на такі композиції:

Композиція А: сахароза (режим стерилізації 112 °С, 20 хв).

Композиція Б: NaNO₃, MgSO₄×7H₂O, KCl, FeSO₄×7H₂O (режим стерилізації 131 °С, 40хв).

Композиція В: K₂HPO₄ (режим стерилізації 131 °С, 40 хв).

Сахарозу виділяють у окрему композицію тому, що умови стерилізації для сахарози повинні бути менш жорсткими ніж для солей для уникнення карамелізації, що у свою чергу може зменшити доступність компоненту середовища для мікроорганізму.

K_2HPO_4 виділяють у окрему композицію тому, що під час стерилізації K_2HPO_4 буде взаємодіяти з $MgSO_4 \times 7H_2O$ з утворенням нерозчинного осаду. Тобто доступність компонентів поживного середовища для мікроорганізму зменшиться.

Такий об'єм середовища можна стерилізувати у автоклаві.

Посівний матеріал буде вирощуватись у трьох колбах об'ємом 750 мл.

На другій стадії підготовки посівного матеріалу потрібно приготувати 6 л поживного середовища. Залежно від режиму стерилізації та взаємодії компонентів середовища можна поділити на такі композиції:

Композиція А: сахароза (режим стерилізації 112 °С, 20 хв).

Композиція Б: $NaNO_3$, $MgSO_4 \times 7H_2O$, KCl , $FeSO_4 \times 7H_2O$ (режим стерилізації 131 °С, 40хв).

Композиція В: K_2HPO_4 (режим стерилізації 131 °С, 40 хв).

K_2HPO_4 виділяють у окрему композицію тому, що під час стерилізації K_2HPO_4 буде взаємодіяти з $MgSO_4 \times 7H_2O$ з утворенням нерозчинного осаду.

Такий об'єм середовища можна стерилізувати у автоклаві.

Посівний матеріал буде вирощуватись у інокуляторі об'ємом 10 л.

На третій стадії підготовки посівного матеріалу потрібно приготувати 64 л поживного середовища. Залежно від режиму стерилізації та взаємодії компонентів середовища можна поділити на такі композиції:

Композиція А: сахароза (режим стерилізації 112 °С, 20 хв). Стерилізується у збірнику.

Композиція Б: $NaNO_3$, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \times 7H_2O$, KCl , $FeSO_4 \times 7H_2O$ (режим стерилізації 131 °С, 40хв). Стерилізується у ферментері.

З метою економії усі солі стерилізуються разом. Для унеможливлення випадання осаду фосфату магнію стерилізація проводиться при рН 4,0.

Посівний матеріал буде вирощуватись у посівному апараті об'ємом 100 л.

Для підготовки посівного матеріалу для виробничого культивування потрібно 600 л поживного середовища. Залежно від режиму стерилізації та взаємодії компонентів середовища можна поділити на такі композиції:

Композиція А: сахароза (режим стерилізації 112 °С, 20 хв). Стерилізується у збірнику.

Композиція Б: NaNO_3 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації 131 °С, 40хв). Стерилізується у ферментері.

З метою економії усі солі стерилізуються разом. Для унеможливлення випадання осаду фосфату магнію стерилізація проводиться при рН 4,0.

Виробнича культура буде вирощуватись у виробничому ферментері об'ємом 1м³. Узагальнена інформація про особливості приготування композицій поживного середовища наведена у таблиці 5.4.

Таблиця 5.4

Розрахунок вмісту та особливості приготування компонентів поживного середовища

Об'єм поживного середовища, л	Сахароза			Композиція солей NaNO ₃ , MgSO ₄ ×7H ₂ O, KCl, FeSO ₄ ×7H ₂ O		Композиція солі K ₂ HPO ₄		HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Вміст, г	Об'єм 40% р-ну, мл	Особливість приготування	Вміст, г	Особливість приготування	Вміст, г	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,4	14	35	У колбі 100 мл	1,6	У колбі 1 л	0,4	У колбі 50 мл	–	–	–	–
6	210	525	У колбі 1 л	29,6	У колбі 10 л	7,4	У колбі 1000мл	–	–	–	–
64	2240	5600	У колба 10 л	352	У апараті 60 л		104	У колбі 200 мл	128	У колбі 200 мл	
600	19800	52500	У апараті 60 л	3320	У апараті 600л		980	У колбі 2 л	1200	У колбі 3 л	

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.

5.2.1. Вибір технології виділення та очищення. Впродовж процесу культивування гібереліни виділяються в культуральну рідину. Отже, перед виділенням продукту необхідно відокремити міцелій продуцента. Згідно з джерелом [29] можливий спосіб виділення гіберелінів з культуральної рідини за допомогою адсорбцією активним вугіллям (рис.5.3.).

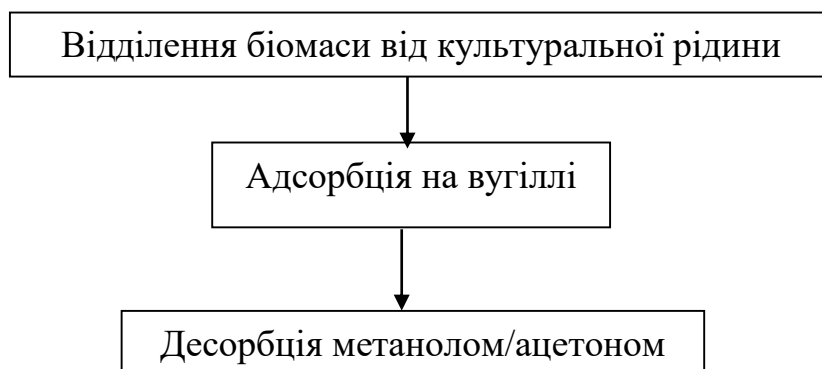


Рис.5.3. Схема виділення гіберелінів за допомогою адсорбції активованим вугіллям

Однак метод є не достатньо селективним, вимагає витрати великої кількості активованого вугілля та розчинника і не дозволяє отримати препарат з високим ступенем очищення.

Згідно з джерелом [81] можливі такі способи виділення гіберелінів з культуральної рідини. На рис. 5.4. наведена схема виділення і очищення гіберелінів за допомогою хемосорбції іонами.



Рис.5.4. Схема виділення гіберелінів за допомогою хемосорбції іонітами

Така схема очищення передбачає встановлення багатьох іонообмінних колонок, що є дорогавартісним. Цей спосіб очищення дозволяє отримати продукт 77% чистоти. Отже, такий метод очищення є економічно недоцільний, через невисокий ступінь очистки і свою вартість.

На рис. 5.5. наведена схема виділення і очищення гіберелінів за допомогою екстракції етилацетатом.

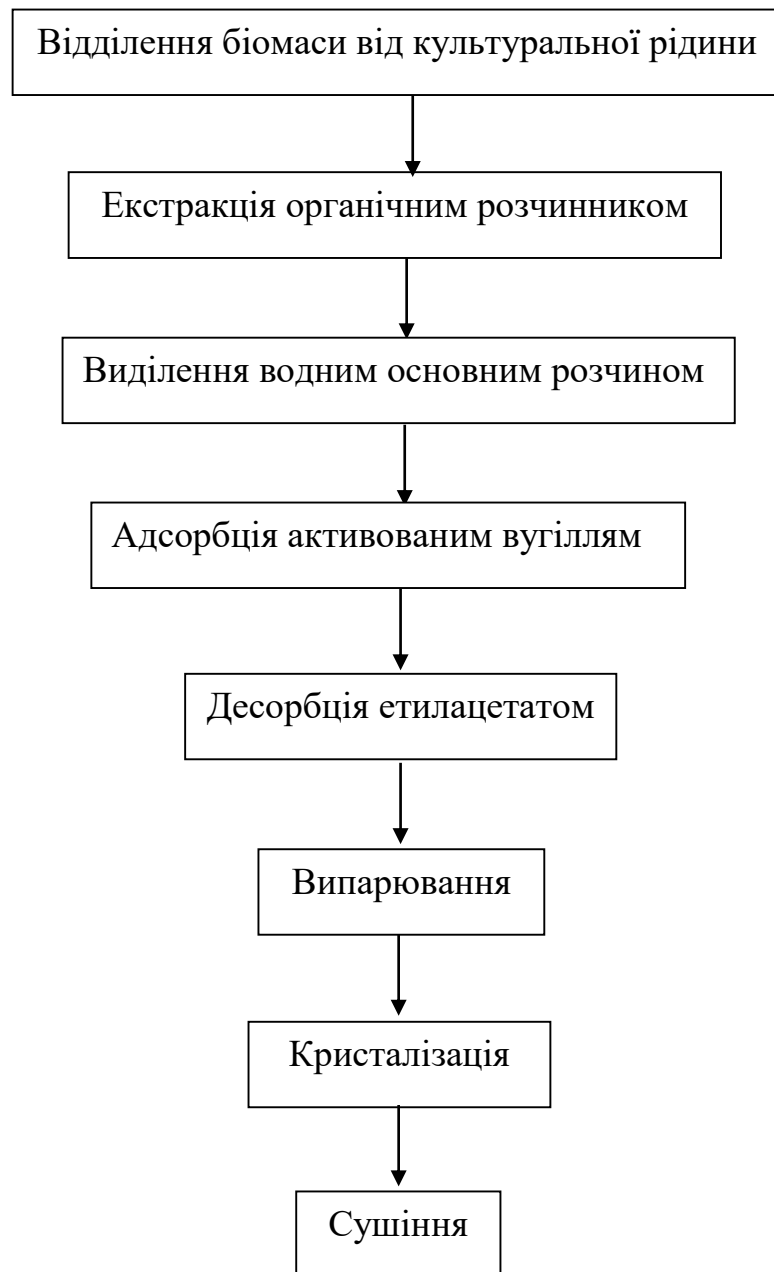


Рис.5.5. Схема виділення гіберелінів за допомогою екстракції органічним розчинником

Екстракція гіберелінів з водного розчину здійснюється такими розчинниками, як етилацетат, бутилацетат, метилетилкетон, метилізобутилкетон. Виділення гіберелінів з екстракту здійснюється за допомогою сорбції твердим гідрокарбонатом натрію або калію або екстрагуванням водним основним розчином.

Подальше очищення продукту можна проводити адсорбцією активним вугіллям і десорбцією його етилацетатом. Після упарювання і кристалізації з наступним промиванням і висушуванням чистота продукту досягає 95%. Така схема очищення є досить простою та ефективною, що робить її оптимальною для отримання препарату гібереліну кристалічного.

5.2.2. Відділення біомаси. Гібереліни є екзометаболітами, в зв'язку з цим, першим етапом є відділення міцелію продуцента з культурального середовища. Це можна реалізувати, використавши наступні способи (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

Порівняльна характеристика способів відділення біомаси

Спосіб*	Переваги	Недоліки
Відстоювання	Простота проведення процесу, невеликі затрати енергії	Велика тривалість процесу, неможливість повністю розділити компоненти середовища
Фільтрування	Повне відділення завислих часток, простота проведення процесу, продуктивність	Значні витрати фільтрувального матеріалу
Центрифугування	Продуктивність та ефективність розділення	Складність конструкції, висока вартість та енергоємність, складність експлуатації
Сепарування	Висока продуктивність, високий рівень концентрування	Складність конструкції, висока вартість та енергоємність

* – дані про переваги та недоліки наведених способів взяті зі [30], [31].

Зважаючи на тривалість проведення процесу відстоювання і незадовільну якість декантату, можна зробити висновок про те, що недоцільно використовувати відстоювання для попередньої обробки культуральної рідини.

Оскільки біомаса не є цільовим продуктом і ступінь складності проведення процесу, можна зробити висновок про те, що сепарування і центрифугування недоцільно використовувати для попередньої обробки культуральної рідини.

Отже, для попередньої обробки культуральної рідини доцільно використовувати фільтрування так, як цей спосіб дозволяє повністю відокремити біомасу та є досить простим та ефективним.

Враховуючи, що необхідно здійснити відділення 2,5 кг біомаси з 500 л культуральної рідини, розглянемо відповідне фільтрувальне обладнання, що наведене у таблиці 5.6.

Таблиця 5.6

Порівняльна характеристика фільтрувального обладнання

Обладнання*	Переваги	Недоліки
Стрічковий фільтр	Простота конструкції, крихкість осаду на стрічці, зручність промивання осаду	Значні габарити, одержання каламутного фільтрату, наявність зон, що не використовуються для фільтрування
Барабанний вакуум-фільтр	Високий ступень механізації, постійність швидкості фільтрування	Громіздкість, низька питома поверхня фільтрування, що віднесена до об'єму фільтра
Камерний автоматичний фільтр-прес (ФПАК)	Велика рушійна сила, велика площа фільтрації, висока продуктивність, низькі енергетичні затрати, відсутність необхідності у допоміжному обладнанні	Швидкість фільтрації з часом знижується, громіздкі

* – дані про переваги та недоліки наведені з [30], [31].

Продуктивність камерного автоматичного фільтр-преса перевищує продуктивність стрічкового фільтра у 3 рази, а барабанного – у 6 разів[31].

Отже, для попередньої обробки культуральної рідини доцільно використовувати камерний автоматичний фільтр-прес. Наприклад, фільтр-прес КМП 2,5 з продуктивністю $1 \text{ м}^3/\text{м}^2 \times \text{год}$, площею фільтрування $2,5 \text{ м}^2$ [32]. Фільтр

такої продуктивності буде працювати 12 хв. Технічні характеристики фільтру наведені у специфікації (див. розділ 7). Після фільтрування супернатант у кількості приблизно 500 л за допомогою насоса продуктивністю 2 м³/год направляється на наступну стадію виділення гіберелінів.

Корпус фільтр-пресу призначений для збору і відводу фільтрату і має днище, бічні стінки і дренажну підставу у вигляді окремих вкладишів. Рамка служить камерою фільтрування, в якій формується і просушується осад. Між корпусом і рамкою розташована гумова діафрагма, призначена для віджиму (пресування) осаду. Механізм затиску стискає комплект плит і герметизує фільтруючі камери. При стислих плитах фільтр-пресу суспензія під тиском надходить у нижню частину кожної плити. Рідка фаза проходить через тканину, дренажну підставу і через колектор відводу виводиться з фільтр-преса. Тверда фаза, затримана фільтрувальною тканиною, попередньо пресується і, якщо це передбачено технологією, промивається. Промивна рідина надходить в камери через колектор подачі, промивний фільтрат виводиться з фільтр-пресу через колектор відводу.

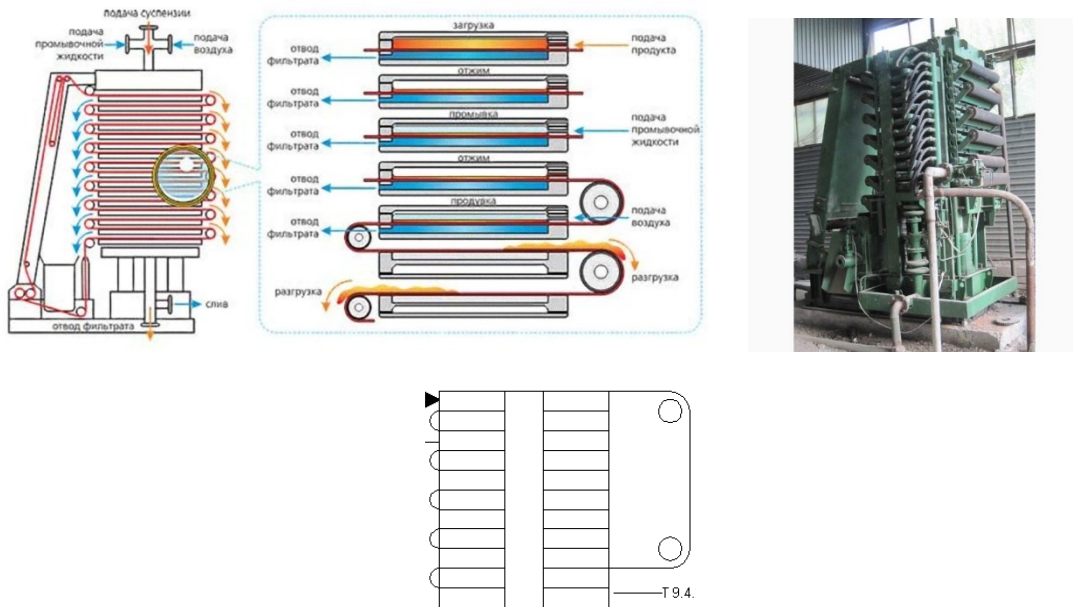


Рис.5.6. Зовнішній вигляд, схематичне зображення роботи і апаратурне позначення фільтр-пресу

5.2.3. Виділення гіберелінів з супернатанту. Оскільки виділити гібереліни за допомогою осадження, наприклад органічними розчинниками чи за допомогою солей, неможливо, а метод хроматографії є непридатним через недостатню очищеність культуральної рідини, єдиним можливим методом виділення гіберелінів є екстракція.

Оскільки гібереліни є розчинними у органічних розчинниках, можливим є здійснення екстракції за допомогою реагентів, характеристика яких наведена у таблиці 5.7.

Таблиця 5.7

Порівняльна характеристика органічних екстрагентів

Органічний розчинник	Розчинність гіберелінів у органічному розчиннику, г/л	Ступінь змішування органічного розчинника з водою
Ксилол	0,078	Низький
Ацетон	30,8	Високий
Етилацетат	3,1	Низький

*– дані про розчинність гіберелінів у органічних розчинників наведені з [3].

Незважаючи на хорошу розчинність гіберелінів у ацетоні, цей органічний розчинник не може виступати у якості екстрагенту, адже він добре змішування з водою.

Розчинність гіберелінів у етилацетаті перевищує розчинність у ксилолі у 40 разів. Отже, для виділення гіберелінів з культуральної рідини за допомогою екстракції доречно використовувати етилацетат.

Оскільки для ефективної екстракції концентрація гіберелінів має становити 3 г/л, а після виробничого біосинтезу вона становить 15 г/л, то необхідно здійснити розведення у 5 разів. Отже, загальний об'єм супернатанту після розведення становитиме 2,5 м³. Також для ефективної екстракції необхідно

встановити рН 2,5-3. Для цього використовуватиметься соляна кислота концентрацією 6%. Розрахунок кількості НСІ наведений у підрозділі 5.3.

Для виділення гіберелінів можливо використати методи екстракції, що наведені у таблиці 5.8.

Таблиця 5.8

Порівняльна характеристика методів екстракції

Спосіб*	Переваги	Недоліки
Одноступінчаста періодична екстракція	Простота, вартість, висока ефективність масопереносу, відсутня необхідність у відстійнику	Необхідний високий коефіцієнт розподілу
Одноступінчаста безперервна екстракція	Швидкість, можливість використання невеликих за розміром апаратів	Складність процесу, необхідність відстійнику, необхідний високий коефіцієнт розподілу
Багатоступінчаста екстракція	Ефективність, високий ступінь очищення	Необхідні великі об'ємні співвідношення екстрагенту та вихідного розчину

*– дані про переваги та недоліки способів екстракції наведена зі [33].

Враховуючи вартість і кількість розчинника (2,5 м³ етилацетату на одну екстракцію), доцільніше проводити одноступінчасту екстракцію, що суттєво знизить вартість цільового продукту. Але зважаючи на складність процесу і апаратного оформлення одноступінчастого безперервного способу екстракції, його використання є економічно недоцільним.

Отже, для виділення гіберелінів з культуральної рідини є доцільним використовувати одноступінчасту періодичну екстракцію. Для підвищення ефективності необхідно у екстракційному апараті встановити перемішувачий пристрій. Вихідний розчин і екстрагент перемішують у змішувачі, після чого розділяють на два шари: екстракт і рафінат.

Об'єм екстрактора повинен дорівнювати сумі об'єму фільтрату культуральної рідини, що містить гібереліни, та розчинника з урахуванням запасу (коефіцієнт заповнення 0,8), тобто $(2,5+2,5)/0,8 \approx 6,3 \text{ м}^3$. Технічні характеристики екстрактора наведені у специфікації (див. розділ 7). Після розділення органічний екстракт міститься у верхній частині апарату, а водна фаза – у нижній. Після завершення процесу водна фаза зливається до мітки через нижній спуск, а екстракт гіберелінів у етилацетаті залишається у екстракторі.

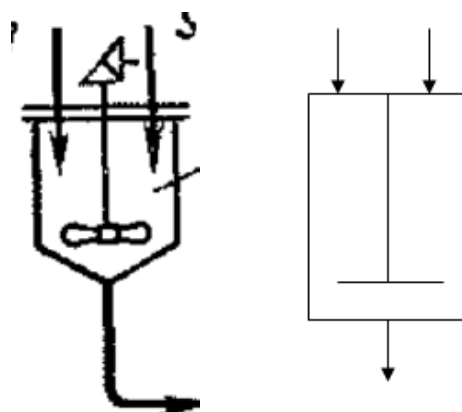


Рис.5.7. Зовнішній вигляд, схема роботи та апаратурне позначення екстрактору

5.2.4. Переведення гіберелінів у водний розчин. Очищення гіберелінів доцільно здійснювати з водного розчину. Для переведення гіберелінів з органічного розчинника у водне середовище пропонується використати один з реагентів наведених нижче.

Характеристика органічних розчинників для екстракції гіберелінів

Реагент	Ціна, грн за кг (л)*
Гідроксид калію	31,50
Гідроксид натрію	16,50
Гідроксид амонію	15

*– ціни наведено станом на березень 2020 року, prom.ua.

Можна зробити висновок, що економічно не вигідно використати гідроксид калію адже він є у 2 рази дорожчим за інші реагенти. Не зважаючи на

те, що гідроксид натрію є дорожчим за гідроксид амонію на 1,5 грн, він є більш активним та більш стабільним, тому його використання є вигіднішим.

Переведення гіберелінів у водну фазу відбувається у екстракторі з етилацетатним екстрактом гіберелінів шляхом додавання 87,5 л гідроксиду натрію. Після розділення органічний розчинник міститься у верхній частині апарату, а водна фаза – у нижній. Після завершення процесу цільова водна фаза у кількості 87 л за допомогою насоса продуктивністю 0,5 м³/год направляється на наступний етап очищення гіберелінів, а етилацетат направляється на регенерацію.

5.2.5. Очищення гіберелінів від супутніх домішок. Для очищення гіберелінів від низькомолекулярних домішок та пігментів, які будуть зафарбовувати та забруднювати кінцевий продукт, можливо застосувати методи, наведені у таблиці 5.9.

Таблиця 5.9

Порівняльна характеристика способів очищення гіберелінів

Спосіб*	Переваги	Недоліки
Хроматографія	Ефективність	Трудомісткість, складність проведення процесу, вартість
Сорбція	Простота, ефективність	Значні об'єми використання сорбенту, часткове вимивання сорбенту
Кристалізація	Ефективність, мала трудомісткість, універсальність	Потреба у попередньому концентруванні рідини

*– дані про переваги та недоліки наведених способів взяті з [30], [31], [34], [35].

Зважаючи на перераховані недоліки хроматографічного методу очищення, можна зробити висновок про економічну недоцільність використання цього методу.

Незважаючи на вказані недоліки процесу сорбційного очищення гіберелінів, цей спосіб є економічно доцільним і забезпечує достатній ступінь очищення препарату. Для етапу сорбції можливо використати сорбенти наведені у таблиці 5.10.

Таблиця 5.10

Порівняльна характеристика сорбентів

Сорбент*	Питома поверхня, м ² /г	Ціна, грн за кг**
Активоване вугілля	600-1500	60
Силікагель	300-750	55
Алюмогель	170-220	70

*– дані про сорбенти наведені зі [36].

**– ціни наведено станом на січень 2020, prom.ua.

Зважаючи на дані наведені у таблиці, можна зробити висновок, що алюмогель недоцільно використовувати у процесі очищення гіберелінів тому, що його питома поверхня є найменшою, а ціна найбільшою. Хоча силікагель є дешевшим за активоване вугілля, але питома поверхня силікагелю є у 2 рази меншою за питому поверхню активованого вугілля. Отже, для очищення гіберелінів сорбцією доцільно використовувати активоване вугілля.

Для процесу десорбції потрібен органічний неполярний розчинник, який найкраще екстрагуватиме гібереліни. Таким екстрагентом є етилацетат.

Для очищення гіберелінів можливо застосовувати адсорбційні апарати наведені у таблиці 5.11.

Порівняльна характеристика адсорбційних апаратів

Апарат	Переваги	Недоліки
Адсорбер з стаціонарним шаром адсорбенту	Простота проведення процесу та конструкції	Мала інтенсивність адсорбції, мала швидкість процесу, великий гідравлічний опір
Адсорбер з "киплячим" шаром адсорбенту	Невеликий гідравлічний опір, швидкість масообміну	Складність конструкції

*– дані про переваги та недоліки наведених апаратів взяті з [37].

Зважаючи на наведені переваги та недоліки адсорбційних апаратів, можна зробити висновок, що для очищення гіберелінів економічно доцільно використовувати адсорбер з "киплячим" шаром адсорбенту, незважаючи на складність конструкції.

Технічні характеристики адсорбера наведені у специфікації (див. розділ 7). Активне вугілля завантажується на розподільні ґрати. Через конічну частину подається розчин гіберелінів зі швидкістю що забезпечує відносне розширення шару у 1,5-1,6 рази. Адсорбент подається у вигляді 5-20% суспензії в центральну трубу туди ж подається частина розчину. Частки активного вугілля зважуються в потоці рідини, їхній надлишок видаляється в згущувач, а очищена рідина видаляється у верхній частині адсорбційної колони. У такий самий спосіб відбувається десорбція[37].

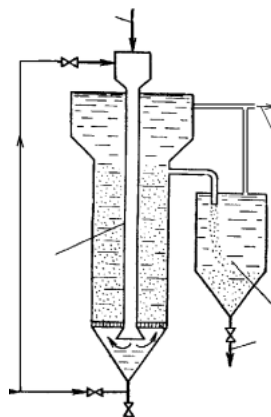


Рис.5.8. Схематичне зображення роботи адсорбера з "киплячим" шаром адсорбенту

Кристалізація, як правило, використовується на кінцевій стадії технологічного процесу очистки речовини. Отже, для підвищення чистоти препарату та отримання препарату гіберелінів кристалічного пропонується також використати метод кристалізації.

Кристалізацію можна здійснювати принципово різними способами:

1) Шляхом видалення із розчину частини розчинника. Найчастіше розчинник видаляють випаровуванням. Після досягнення необхідного ступеня пересичення, як правило, кристалізацію проводять у тих же апаратах.

2) Шляхом охолодження розчинів. Охолодження проводять, як правило, охолоджуючою водою. Процес проводять як в апаратах періодичної та безперервної дії.

3) Шляхом висолювання. При кристалізації висолюванням пересичення розчину досягається шляхом додавання в розчин речовини, яка зменшує розчинність основної речовини в розчиннику. Речовину, яка додається, називають висолювачем.

4) В результаті протікання хімічної реакції. Відбувається за рахунок того, що в результаті протікання хімічної реакції розчин стає пересиченим за відношенням до продукту реакції.

Серед наведених способів найбільш придатним є кристалізація шляхом видалення із розчину частини розчинника випарюванням тому, що відсутня потреба у охолоджуючому агенті та додаткових хімічних реагентів[35].

5.2.6. Концентрування розчину гіберелінів перед кристалізацією.

Оскільки для концентрування розчину гіберелінів неможливо використовувати мембранні процеси так, як гібереліни є низькомолекулярними речовинами і не будуть затримуватись на мембрані, а очищення за допомогою виморожування є трудомістким та супроводжується великими втратами, єдиним можливим способом концентрування є випарювання.

Процеси випарювання здійснюють під вакуумом, за підвищеного або за атмосферного тиску. Вибір тиску пов'язаний з властивостями випаровуваного

розчину та можливістю використання тепла вторинної пари. Порівняльна характеристика способів випарювання наведена у таблиці 5.12.

Таблиця 5.12

Порівняльна характеристика способів випарювання речовин

Спосіб	Переваги	Недоліки
Під вакуумом	Низька температура проведення, мала поверхня нагрівання	Велика витрата пари, вартість, великі експлуатаційні витрати, необхідність у додатковій апаратурі, що створює вакуум
Під надлишковим тиском	Можливість використання вторинної пари на інші потреби	Висока температура проведення
Під атмосферним тиском	Простота, економічність	Вторинна пара не використовується

*– дані про способи концентрування речовин наведені з [38].

Звертаючи увагу на вартість процесу випарювання під вакуумом та те, що гібереліни є термостійкими сполуками (температура розкладу становить 215°C), можна зробити висновок, що цей спосіб недоцільно використовувати для процесу концентрування у виробництві гіберелінів.

Використання випарювання при надлишковому тиску є недоцільним через необхідність створення високого тиску та вибухонебезпечність конструкції. Також використання вторинних парів етилацетату є неможливим через те, що вона йде на регенерацію.

Зважаючи на простоту та економічність процесу випарювання та на можливість одночасного проведення процесу випарювання та кристалізації у одному апараті, більш доцільним буде здійснювати процес випарювання під атмосферним тиском.

Для концентрування розчину гіберелінів та кристалізації можливо використовувати випарні апарати, що наведені у таблиці 5.13.

Порівняльна характеристика випарних апаратів

Апарат*	Переваги	Недоліки
Роторно-плівковий випарник	Низька металоємність конструкції, високий енергетичний потенціал вторинної пари, високий ступінь випарювання	Незначна поверхня нагріву, наявність обертання ротора, необхідність встановлення додаткового устаткування для подальшої кристалізації
Трубчатий випарний апарат з примусовою циркуляцією	Простота конструкції та експлуатації, можливість концентрування в'язких рідин	Тривалий час перебування розчину у випарній установці, утворення накипу на поверхні нагріву, невисокі коефіцієнти тепло- та масообміну, необхідність встановлення додаткового устаткування для подальшої кристалізації
Випарний кристалізатор з псевдозрідженим шаром	Ефективність, збереження складу первинного продукту, швидкість, отримання однорідних кристалів правильної форми, відсутність потреби у встановленні додаткового устаткування для подальшої кристалізації	Витрати тепла

* – дані про переваги та недоліки випарних апаратів наведені зі [35], [38].

Зважаючи на перераховані недоліки випарників та необхідність ускладнення апаратного оформлення, можна зробити висновок про економічну недоцільність використання звичайних випарників. Отже, найбільш ефективною конструкцією є конструкція випарного апарата кристалізатора з псевдозрідженим шаром кристалів.

Тепло, яке потрібне для випарювання розчинника, підводиться до розчину в випарювачі. Вихідний розчин подається у всмоктуючу лінію циркуляційного

насоса, змішується з концентрованим розчином, що виходить із випарника, далі суміш надходить у сепаратор, де від розчину відділяється вторинна пара. Із сепаратора розчин опускається по трубі під нижній шар кристалів у кристалізаторі, підіймається по апарату, створюючи псевдозріджений шар кристалів. Достатньо великі кристали осідають у нижній частині на дно кристалізатора і частково у вигляді суспензії виводяться із апарату по трубі і далі надходять на фільтрацію. Суміш дрібних кристалів з маточним розчином із кристалізатора перетікає у випарювач [35]. Технічні характеристики випарника-кристалізатора наведені у специфікації (див. розділ 7).

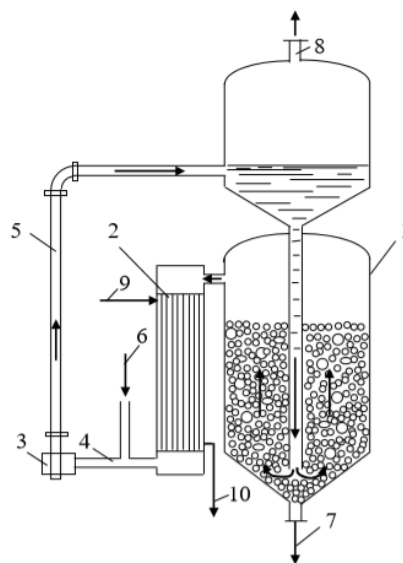


Рис.5.9. Схематичне зображення випарного кристалізатора з псевдозрідженим шаром

Для виділення кристалів зі суспензії використання фільтр-пресу є неможливим через їх занадто велику продуктивність для даних об'ємів суспензії (30 л). З цієї ж причини неможливим є використання барабанного вакуум-фільтра та стрічкового фільтра. Використання нутч-фільтра також є неможливим через відсутність змоги фільтрувати гарячі суспензії, оскільки у вакуумі такі рідини можуть закипіти[39].

Отже, конструктивно і економічно можливим є використання друк-фільтра. У верхню частину фільтра завантажують суспензію. Потрібну різницю

тисків створюють стисненим повітрям, що подається у верхню частину апарата. Тверді частинки суспензії затримуються на фільтрувальній перегородці. Пропонується використати фільтр ДСЕв 0,3-11-12-01. [38, 40]. Технічні характеристики фільтра наведені у специфікації (див. розділ 7).

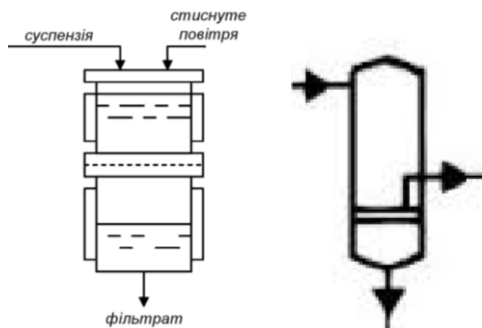


Рис.5.10. Схематичне зображення роботи та апаратне позначення друк-фільтра

5.2.7. Сушіння кристалів гіберелінів. Сушіння вологих кристалів гіберелінів (5 кг) можна здійснювати способами, наведеними у таблиці 5.14.

Таблиця 5.14

Порівняння способів сушіння кристалів гіберелінів

Спосіб сушіння*	Переваги	Недоліки
Камерне	Простота конструкції та експлуатації	Невелика продуктивність, необхідність подальшого подрібнення матеріалу
Барабанне	Продуктивність, простота конструкції та експлуатації	Громіздкість, високі капітальні витрати, тривалий контакт матеріалу з тепловим агентом, забруднення продукту золюю з топки, налипання вологого матеріалу на стінки барабану
У псевдокиплячому шарі	Ефективність, швидкість сушіння, низькі експлуатаційні витрати	Складність експлуатації

*– дані про способи сушіння наведені з [30], [41].

Зважаючи на дані, що наведені у таблиці, можна зробити висновок, що камерне сушіння недоцільно використовувати через невелику продуктивність та

необхідність подальшого подрібнення, що ускладнює апаратне оформлення. Барабанний спосіб сушіння також є недоцільним через вище перераховані недоліки.

Отже, доцільним є використання сушіння у псевдозрідженому шарі через ефективність і швидкість процесу при низьких експлуатаційних витратах. Вологий матеріал надходить з завантажувального бункера, підхоплюється теплоносієм і надходить в сушильну камеру з киплячим шаром. Висушування продукту до його заданої кінцевої вологості відбувається завдяки управлінню часом перебування продукту в сушильній камері та створенню необхідної висоти киплячого шару [42].

У камері матеріал інтенсивно циркулює до тих пір, поки висохлі частинки, як більш легкі, винесуться повітрям в циклон. Тут повітря відокремлюється від висушеного матеріалу, який видаляється через днище циклону. Технічні характеристики фільтра наведені у специфікації (див. розділ 7).

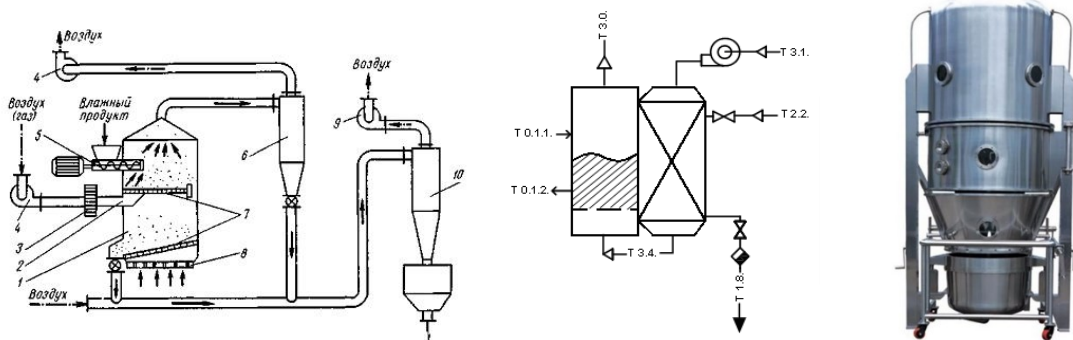


Рис.5.11. Схематичне зображення, апаратурне позначення та зовнішній вигляд сушарки з псевдозрідженим шаром

5.2.8. Вибір упаковки та способу фасування готового препарату гіберелінів. Для обприскування рослин використовують дуже слабкі водні розчини гіберелінів. Підвищення концентрації понад рекомендованої норми, знижує його позитивний ефект.

Витрата гіберелінів – 0,1 г/л для обробки 1 га [19]. Кількість обробок за 1 сезон становить 2 рази [6]. Отже, пропонується фасувати порошок гіберелінів у

плоскі трьохшовні металізовані поліетиленові пакети по 0,2 г. Таким чином однієї упаковки вистачить для однієї сезонної обробки 1 га насаджень.

Для фасування пропонується використовувати ваговий дозатор ВТА-60/3-7-1R[43]. Технічні характеристики дозатора наведені у специфікації (див. розділ 7). Після фасування пакети запаюються вручну за допомогою імпульснийного ручного запайщика.

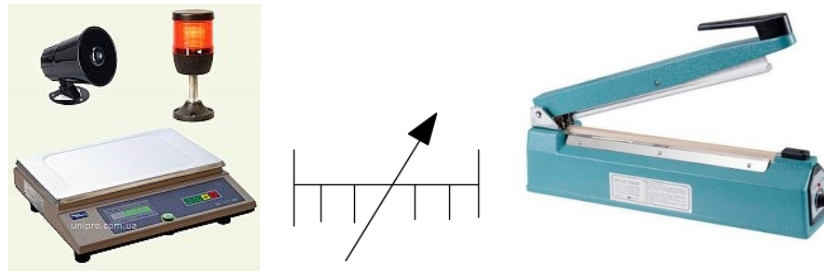


Рис.5.12. Зовнішній вигляд та апаратурне позначення вагового дозатора для фасування гіберелінів

На основі вище наведеного обґрунтування схема виділення гіберелінів матиме наступний вигляд:



Рис.5.12. Схема виділення і очищення препарату гіберелінів

5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення.

5.3.1. Розрахунок кількості соляної кислоти для виділення гіберелінів.

Для ефективної екстракції необхідно встановити рН на рівні 2,5-3. Для цього використовується соляна кислота концентрацією 6%. Для становлення рН 2,5-3,0 потрібно використати на 1 л супернатанту 3 мл соляної кислоти. Отже, для титрування 1756 л супернатанту необхідно 5,3 л соляної кислоти.

5.3.2. Розрахунок кількості гідроксиду натрію для виділення гіберелінів. Для виділення гіберелінів необхідно підготувати розчин гідроксиду натрію. Молярна маса гіберелової кислоти становить 346,4. Концентрація становить 3 г/л. Знаходимо кількість молей гіберелової кислоти, що містяться при даній концентрації:

$$\vartheta = \frac{3}{346,4} = 0,086 \text{ моль}$$

Молярна маса гідроксиду натрію становить 40. Кількість гідроксиду натрію, що витрачається на реакцію з гібереловою кислотою становитиме, що міститься у 1 л:

$$m = 0,086 \times 40 = 0,35 \text{ г}$$

Отже, кількість гідроксиду натрію, що витрачається на гіберелову кислоту, що міститься у всьому об'ємі:

$$m_{\text{заг}} = 0,35 \times 2500 = 875 \text{ г}$$

Оскільки гідроксид натрію є агресивною речовиною, луг розводять до концентрації 1%. Отже кількість розчину гідроксиду натрію, який братиме участь у реакції становить 87,5 л.

РОЗДІЛ 6.

МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ

З ТЕО потреба у препараті гіберелінів складає $G_{нт} = 16,5$ кг. Цю кількість гіберелінів потрібно виробити за $T_{рд} = 30$ днів. Максимальний синтез гіберелінів (15г/л за 192 год) досягається за умов росту штаму *Fusarium moniliforme* NCIM 1100 на середовищі такого складу (г/л): сахароза – $C_1=35$; $NaNO_3$ – $C_2=3$; K_2HPO_4 – $C_3=1$; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – $C_4=0,5$; KCl – $C_5=0,5$; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – $C_6=0,01$. Всього – $C_{\Sigmaф}=40,1$ г/л. Посівний матеріал вирощують на поживному середовищі такого самого складу.

Вміст сухих речовин складає 90%. Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера $T_{цф} = T_{ф} + T_{по} = 192 + 80 = 200$ год, де $T_{по}$ – час підготовчих операцій; коефіцієнт запасу приймаємо $K_1 = 1,1$; коефіцієнт заповнення ферментера $K_{зф} = 0,6$; коефіцієнт заповнення посівного апарата $K_{па} = 0,6$; коефіцієнт заповнення інокулятора $K_{ін} = 0,6$; коефіцієнт заповнення колб $K_{кол} = 0,2$; коефіцієнт заповнення збірника $K_{кол} = 0,8$.

Виділення і очищення цільового продукту складається з таких стадій: фільтрування культуральної рідини, екстракція гіберелінів етилацетатом, переведення гіберелінів у водний розчин шляхом екстракції розчином гідроксиду натрію, адсорбція гіберелінів на активованому вугіллі, десорбція гіберелінів етилацетатом, кристалізація гіберелінів шляхом випарювання розчинника, відфільтровування кристалів гіберелінів від маточного розчину, сушіння кристалів гіберелінів, фасування і пакування.

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Лазюка Ю.В			РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок технологічного обладнання	Літ.	Арк.	68 аркушів
Консульт.							68	25
Керівник		Скроцька О.І				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав.каф.		Пирог Т.П						

Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат по стадіям виділення готового продукту) $E_{св}= 0,4$; $E_{фт}=0,07$ (коефіцієнт втрат при фільтруванні культуральної рідини, частка), $E_{е}=0,05$ (коефіцієнт втрат при екстракції, частка), $E_{п}=0,05$ (коефіцієнт втрат при переведенні гіберелінів у водний розчин, частка), $E_{а}=0,05$ (коефіцієнт втрат при адсорбції, частка), $E_{д}=0,05$ (коефіцієнт втрат при десорбції, частка), $E_{п}= 0,03$ (коефіцієнт втрат при кристалізації шляхом упарювання, частка), $E_{фт}=0,07$ (коефіцієнт втрат при фільтруванні суспензії з кристалами гіберелінів, частка), $E_{сш} =0,02$ (коефіцієнта втрат при сушінні, частка), $E_{уп}= 0,01$ (коефіцієнт втрат при фасуванні, частка).; концентрація посівного матеріалу для виробничих ферментерів $X_{ф}= 0,1$; концентрація посівного матеріалу для посівних апаратів $X_{па}= 0,1$; концентрація посівного матеріалу для інокуляторів $X_{ін}= 0,1$; концентрація посівного матеріалу для качалочних колб $X_{кол}= 0,1$; втрати культуральної рідини при біосинтезі $E_{ф}= 0,15$; втрати посівного матеріал при його культивуванні в посівних апаратах $E_{па}= 0,15$; втрати посівного матеріал при його культивуванні в інокуляторах $E_{ін}= 0,15$; втрати посівного матеріал при його культивуванні в колбах $E_{ін}= 0,01$.

6.1. Розрахунок партій продукту (виробничих циклів).

6.1.1. Кількість готового препарату на добу: $G_{нтд} = G_{нт}/T_{рд} = 16,6/30 = 0,55$ кг/добу.

6.1.2. Кількість готового препарату за цикл: $G_{цк} = G_{пд} \times T_{цф}/24 = 0,546 \times 200/24 = 4,6$ кг/цикл.

6.1.3. Кількість готового препарату за цикл з врахуванням втрат при його виділенні: $G_{цк} = G_{пд} \cdot T_{цф} \cdot (1 - W_v) / 24 \cdot (1 - E_{св}) = 0,55 \times 200 \times (1 - 0,1) / 24 \times (1 - 0,4) = 6,9$ кг/цикл.

6.1.4. Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл): $V_{кр} = K_1 \times G_{цк} \times C_{рп} / P_{кр} \times (1 - E_{св}) = 1,1 \times 4,6 \times 0,95 / 8,6 \times (1 - 0,4) = 0,5$ м³.

6.1.5. Кількість циклів на рік: $N_{цк} = G_{нт} / G_{цк} = 16,5 / 4,6 = 3,6$. Округлюємо кількість циклів до цілого $N_{цк} = 4$.

6.2. Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу.

6.2.1. Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу для виробничого біосинтезу

6.2.1.1. Об'єм готового середовища та посівного матеріалу у виробничому ферментері з врахуванням втрат при біосинтезу: $V_{\phi} = V_{кр} / (1 - E_{\phi}) = 500 / (1 - 0,15) = 588$ л.

6.2.1.2. Об'єм готового поживного середовища для виробничого ферментера: $V_{псф} = V_{\phi} / (1 + X_{\phi}) = 588 / (1 + 0,1) = 535$ л.

6.2.1.3. Втрати посівного матеріалу на засів виробничого ферментера: $V_{пмф} = V_{\phi} - V_{псф} = 588 - 535 = 53$ л.

6.2.1.4. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища виробничого ферментера

6.2.1.4.1. У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища складуть:

$$G_{\phi} = V_{псф} \times C_{\Sigma\phi} = 535 \times 40,1 = 21,45 \text{ кг, в тому числі:}$$

Сахароза	$G_1 = G_{\phi} \times C_1 / C_{\Sigma\phi} = 21,45 \times 35 / 40,1 = 18,7$
Нітрат натрію	$G_2 = G_{\phi} \times C_2 / C_{\Sigma\phi} = 21,45 \times 3 / 40,1 = 1,6$
Калій фосфорнокислий однозаміщений	$G_3 = G_{\phi} \times C_3 / C_{\Sigma\phi} = 21,45 \times 1 / 40,1 = 0,6$
Магній сульфат	$G_4 = G_{\phi} \times C_4 / C_{\Sigma\phi} = 21,45 \times 0,5 / 40,1 = 0,3$
Калій хлорид	$G_5 = G_{\phi} \times C_5 / C_{\Sigma\phi} = 21,45 \times 0,5 / 40,1 = 0,3$
Ферум сульфат	$G_6 = G_{\phi} \times C_6 / C_{\Sigma\phi} = 21,45 \times 0,01 / 40,1 = 0,006$

6.2.1.4.2. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого ферментера.

Кількість води визначають за наступною формулою $V_{вф} = V_{псф} - G_{\phi} - V_{фк}$, де $V_{фк} = V_{псф} \times K_{кон}$ – розбавлення виробничого поживного середовища конденсатом пари його стерилізації, $K_{кон}$ – частка конденсату у загальній кількості води, що йде на приготування поживного середовища.

Залежно від способу та обладнання, яке використовують для стерилізації компонентів поживного середовища, величина $K_{\text{кон}}$ може скласти:

- у разі стерилізації компонентів у колбах в автоклавів $K_{\text{кон}}=0$
- у разі стерилізації компонентів безпосередньо у реакторі-змішувачі або безпосередньо у ферментері $K_{\text{кон}}=0,1-0,15$
- у разі стерилізації компонентів в УБС $K_{\text{кон}}=0,2$.

Оскільки об'єм поживного середовища у ферментері складає $V_{\text{псф}} = 3,2\text{м}^3$, приймаємо рішення щодо використання для стерилізації реактор-змішувач.

Тоді кількість конденсату становитиме $V_{\text{фк}} = V_{\text{псф}} \times K_{\text{кон}} = 535 \times 0,15 = 80,25\text{л}$.

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде $V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}} = 535 - 18,73 - 80,25 = 436\text{ л}$

6.2.1.4.3. Формування композицій А та Б

Таблиця 6.1

Композиції для стерилізації поживного середовища у реакторі-змішувачі

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 535 л середовища, кг(л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	35	18,7	А	45
Вода		26,4		
Нітрат натрію	3	1,6	Б	410,9
Калій фосфорнокислий однозаміщений	1	0,5		
Магній сульфат	0,5	0,3		
Калій хлорид	0,5	0,3		
Ферум сульфат	0,01	0,005		

Вода		407		
Конденсат		80,25		80,25
Разом:		535		535

Оскільки 40%-й розчин сахарози стерилізують при температурі 112°C, він виділяється в окрему композицію.

З метою економії усі солі стерилізуються разом при температурі 131°C. Для унеможливлення випадання осаду фосфату магнію стерилізація проводиться при рН 4,0.

6.2.2. Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу для вирощування у інокуляторі.

6.2.2.1. Об'єм готового середовища та посівного матеріалу у посівному апараті з врахуванням втрат при біосинтезі: $V_{ін} = V_{кр} / (1 - E_{па}) = 53 / (1 - 0,15) = 62$ л.

6.2.2.2. Об'єм готового поживного середовища для посівного апарата: $V_{псін} = V_{ін} / (1 + X_{ін}) = 62 / (1 + 0,1) = 56$ л.

6.2.2.3. Втрати посівного матеріалу на засів посівного апарата: $V_{пмін} = V_{ін} - V_{псін} = 62 - 56 = 6$ л.

6.2.2.4. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для інокулятора

6.2.2.4.1. У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для інокулятора загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища складуть:

$$G_{ін} = V_{псін} \times C_{\Sigmaін} = 62 \times 40,1 = 2,5 \text{ кг, в тому числі:}$$

Сахароза	$G_1 = G_{ф} \times C_1 / C_{\Sigmaф} = 2,5 \times 35 / 40,1 = 1,86$
Нітрат натрію	$G_2 = G_{ф} \times C_2 / C_{\Sigmaф} = 2,5 \times 3 / 40,1 = 0,18$
Калій фосфорнокислий однозаміщений	$G_3 = G_{ф} \times C_3 / C_{\Sigmaф} = 2,5 \times 1 / 40,1 = 0,05$
Магній сульфат	$G_4 = G_{ф} \times C_4 / C_{\Sigmaф} = 2,5 \times 0,5 / 40,1 = 0,03$
Калій хлорид	$G_5 = G_{ф} \times C_5 / C_{\Sigmaф} = 2,5 \times 0,5 / 40,1 = 0,03$
Ферум сульфат	$G_6 = G_{ф} \times C_6 / C_{\Sigmaф} = 2,5 \times 0,01 / 40,1 = 0,0005$

6.2.2.4.2. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для посівного апарата.

Кількість води визначають за наступною формулою $V_{\text{впа}} = V_{\text{пспа}} - G_{\text{па}} - V_{\text{пак}}$, де $V_{\text{пак}} = V_{\text{пспа}} \times K_{\text{кон}}$ – розбавлення виробничого поживного середовища конденсатом пари його стерилізації, $K_{\text{кон}}$ – частка конденсату у загальній кількості води, що йде на приготування поживного середовища.

Залежно від способу та обладнання, яке використовують для стерилізації компонентів поживного середовища, величина $K_{\text{кон}}$ може скласти:

- у разі стерилізації компонентів у колбах в автоклавів $K_{\text{кон}}=0$
- у разі стерилізації компонентів безпосередньо у реакторі-змішувачі або безпосередньо у ферментері $K_{\text{кон}}=0,1-0,15$
- у разі стерилізації компонентів в УБС $K_{\text{кон}}=0,2$.

Оскільки композицію А стерилізується у автоклаві, то конденсат не утворюється. Об'єм композиції становить 4,6 л. Отже, об'єм композиції Б, який буде стерилізуватись у ферментері складає $V_{\text{псБ}} = 56-4,6=51,4$ л.

Тоді кількість конденсату становитиме $V_{\text{пак}} = V_{\text{псБ}} \times K_{\text{кон}} = 51,4 \times 0,15 = 6,2$ л.

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде $V_{\text{впа}} = V_{\text{псБ}} - G_{\text{паБ}} - V_{\text{пак}} = 51,4 - 0,2 - 6,2 = 45$ л

6.2.2.4.3. Формування композицій А та Б

**Композиції для стерилізації поживного середовища у реакторі-
змішувачі**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 56 л середовища, кг(л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	35	1,86	А	4,6
Вода		2,74		
Нітрат натрію	3	0,18	Б	45,3
Калій фосфорнокислий однозаміщений	1	0,05		
Магній сульфат	0,5	0,03		
Калій хлорид	0,5	0,03		
Ферум сульфат	0,01	0,0005		
Вода		45		
Конденсат		6,2		6,2
Разом:		56		56

Оскільки 40%-й розчин сахарози стерилізують при температурі 112°C, він виділяється в окрему композицію.

З метою економії усі солі стерилізуються разом при температурі 131°C. Для унеможливлення випадання осаду фосфату магнію стерилізація проводиться при рН 4,0.

6.2.3. Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу для вирощування у інокуляторі.

6.2.3.1. Об'єм готового середовища та посівного матеріалу у колбах: $V_{ін}=6$

л.

6.2.3.2. Об'єм готового поживного середовища для засіву колб: $V_{псін} = V_{ін}/(1+X_{ін}) = 6/(1+0,1) = 5,45$ л.

6.2.3.3. Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву колб: $V_{пмін} = V_{псін} - V_{псін} = 6 - 5,45 = 0,55$ л.

6.2.3.4. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для об'єму середовища у колбах

6.2.3.4.1. У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для качалкових колб загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища складуть:

$G_{ін} = V_{псін} \times C_{\Sigma ін} = 6 \times 40,1 = 0,24$ кг, в тому числі:

Сахароза	$G_1 = G_{ф} \times C_1 / C_{\Sigma ф} = 0,24 \times 35 / 40,1 = 0,2$
Нітрат натрію	$G_2 = G_{ф} \times C_2 / C_{\Sigma ф} = 0,24 \times 3 / 40,1 = 0,017$
Калій фосфорнокислий однозаміщений	$G_3 = G_{ф} \times C_3 / C_{\Sigma ф} = 0,24 \times 1 / 40,1 = 0,006$
Магній сульфат	$G_4 = G_{ф} \times C_4 / C_{\Sigma ф} = 0,24 \times 0,5 / 40,1 = 0,003$
Калій хлорид	$G_5 = G_{ф} \times C_5 / C_{\Sigma ф} = 0,24 \times 0,5 / 40,1 = 0,003$
Ферум сульфат	$G_6 = G_{ф} \times C_6 / C_{\Sigma ф} = 0,24 \times 0,01 / 40,1 = 0,00006$

6.2.3.4.2. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для качалкових колб.

Враховуючи малу кількість компонентів їх стерилізація проводиться в колбах в автоклаві. При цьому конденсат не утворюється.

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде $V_{в} = V_{псін} - G_{заг} = 5,45 - 0,21 = 5,24$ л

6.2.3.4.3. Формування композицій А та Б

**Композиції для стерилізації поживного середовища у реакторі-
змішувачі**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5450 мл середовища, г(мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Сахароза	35	200	А	450
Вода		250		
Нітрат натрію	3	17	Б	4896
Калій хлорид	0,5	3		
Магній сульфат	0,5	3		
Ферум сульфат	0,01	0,04		
Вода		4890		
Калій фосфорнокислий однозаміщений	1	6	В	106
Вода		100		
Разом		5460		5460

Оскільки 40%-й розчин сахарози стерилізують при температурі 112°C, він виділяється в окрему композицію.

Солі стерилізуються разом при температурі 131°C.

6.2.4. Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу для вирощування у колбах на качалках.

6.2.4.1. Об'єм готового середовища та посівного матеріалу у колбах: $V_{\text{псм}} = V_{\text{кол}} = 0,55$ л.

6.2.4.2. Об'єм готового поживного середовища для засіву колб: $V_{\text{пск}} = V_{\text{псм}} / (1 + X_{\text{кол}}) = 0,55 / (1 + 0,1) = 0,6$ л.

6.2.4.3. Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву колб: $V_{\text{пмк}} = V_{\text{псм}} - V_{\text{пск}} = 0,6 - 0,55 = 0,05$ л.

6.2.4.4. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для об'єму середовища у колбах

6.2.4.4.1. У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для качалкових колб загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища складуть:

$$G_{\text{ін}} = V_{\text{пск}} \times C_{\Sigma\text{к}} = 0,55 \times 40,1 = 0,022 \text{ кг, в тому числі:}$$

Сахароза	$G_1 = G_{\text{ф}} \times C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 0,022 \times 35 / 40,1 = 0,020$
Нітрат натрію	$G_2 = G_{\text{ф}} \times C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 0,022 \times 3 / 40,1 = 0,0016$
Калій фосфорнокислий однозаміщений	$G_3 = G_{\text{ф}} \times C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 0,022 \times 1 / 40,1 = 0,0005$
Магній сульфат	$G_4 = G_{\text{ф}} \times C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 0,022 \times 0,5 / 40,1 = 0,00027$
Калій хлорид	$G_5 = G_{\text{ф}} \times C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 0,022 \times 0,5 / 40,1 = 0,00027$
Ферум сульфат	$G_6 = G_{\text{ф}} \times C_6 / C_{\Sigma\text{ф}} = 0,022 \times 0,01 / 40,1 = 0,000005$

6.2.4.4.2. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для качалкових колб.

Враховуючи малу кількість компонентів їх стерилізація проводиться в колбах в автоклаві. При цьому конденсат не утворюється.

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде $V_{\text{в}} = V_{\text{пск}} - G_{\text{заг}} = 0,55 - 0,019 = 0,53$ л

6.2.3.4.3. Формування композицій А та Б

**Композиції для стерилізації поживного середовища у реакторі-
змішувачі**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 550 мл середовища, г(мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Сахароза	35	20	А	50
Вода		30		
Нітрат натрію	3	16	Б	409
Калій хлорид	0,5	0,27		
Магній сульфат	0,5	0,27		
Ферум сульфат	0,01	0,005		
Вода		402		
Калій фосфорнокислий однозаміщений	1	0,5	В	100,5
Вода		100		
Разом		550		550

Оскільки 40%-й розчин сахарози стерилізують при температурі 112°C, він виділяється в окрему композицію.

Солі стерилізуються разом при температурі 131°C.

6.3. Розрахунок напівпродуктів та баластних речовин в культуральній рідині після виробничого біосинтезу.

6.3.1. Кількість абсолютно сухих речовин в поживному середовищі для виробничого біосинтезу $G_{\text{загф}} = 18,1$ кг.

6.3.2. Кількість абсолютно сухих речовин в посівному матеріалі з врахуванням втрат при вирощуванні в інокуляторі геометричним об'ємом 0,1м³ $E_{\text{ін}} = 0,15$ (частка) $G_{\text{заг}} = 2,2$ кг.

$$G_{\text{загп}} = G_{\text{заг}}(1 - E_{\text{п}}) = 1,9 \text{ кг.}$$

6.3.3. Загальна кількість абсолютно сухих речовин середовищі для виробничого біосинтезу становить

$$G_{\text{срф}} = G_{\text{загф}} + G_{\text{загп}} = 18,1 + 1,9 = 20 \text{ кг}$$

6.3.4. Кількість втрат абсолютно сухих речовин у культуральній рідині в процесі виробничого біосинтезу з врахуванням коефіцієнта втрат $E_{\text{бс}} = 0,6$ (частка).

$$G_{\text{втб}} = G_{\text{срф}} \times E_{\text{бс}} = 20 \times 0,6 = 12 \text{ кг}$$

6.3.5. Кількість абсолютно сухих речовин в культуральній рідині, що йде на подальшу переробку, становить:

$$G_{\text{сркр}} = G_{\text{срф}} - G_{\text{втб}} = 20 - 10 = 10 \text{ кг.}$$

6.3.6. Кількість культуральної рідини після виробничого біосинтезу, кг:

$G_{\text{кр}} = V_{\text{кр}} \times \rho_{\text{кр}} = 0,5005 \times 1030 = 515,5 \text{ кг}$, де $\rho_{\text{кр}}$ – середня густина культуральної рідини ($\rho_{\text{кр}} = (1020 \dots 1050 \text{ кг/м}^3)$).

6.3.7. Визначаємо кількість абсолютно сухої біомаси в культуральній рідині:

$$G_{\text{асб}} = V_{\text{кр}} \times X_{\text{кр}} = 0,5005 \times 5 = 2,5 \text{ кг.}$$

6.3.8. Визначаємо кількість абсолютно сухогих гіберелінів в культуральній рідині:

$$G_{\text{асг}} = V_{\text{кр}} \times P_{\text{кр}} = 0,5005 \times 15 = 7,5 \text{ кг.}$$

6.3.9. Кількість абсолютно сухих баластних речовин в культуральній рідині становить:

$$G_{\text{брв}} = G_{\text{сркр}} - G_{\text{асб}} - G_{\text{асг}} = 12 - 7,5 - 2,5 = 2 \text{ кг.}$$

6.3.10. Кількість води, що міститься в культуральній рідині, складе:

$$G_{\text{води}} = G_{\text{кр}} - G_{\text{асб}} - G_{\text{асг}} - G_{\text{брв}} = 515,5 - 7,5 - 2,5 - 2 = 503,5 \text{ кг.}$$

6.4. Стадія ТП. Виділення, очищення та фасування готової продукції.

6.4.1. Відділення біомаси фільтруванням.

6.4.1.1. Об'єм суспензії культуральної рідини, що йде на подальшу переробку складає $V_{\text{кр}} = 0,5005 \text{ м}^3$.

6.4.1.2. Біомаса містить вологи від 65...85% вологи, прийємо $W_{кл}=0,70$ (частка), тоді кількість вологої біомаси в культуральній рідині становитиме:

$$G_{вб} = G_{асб}/(1-W_{кл}) = 7,5/(1-0,7) = 25 \text{ кг.}$$

6.4.1.3. Вологий осад містить 10...15 % міжклітинної вологи, приймаємо $W_{мв} = 0,10$ (частка), тоді загальна кількість вологого осаду, що видаляється з культуральної рідини $V_{кр}$ складе: $G_{осв} = G_{вб} / (1 - W_{мв}) = 25 / (1 - 0,1) = 27,7 \text{ кг.}$

6.4.1.4. Маса вологого осаду, який одержують під час фільтрування 1 м^3 суспензії: $m_o = G_{осв} / V_{кр} = 27,7 / 0,5005 = 53,3 \text{ кг/м}^3$.

6.4.1.5. Об'єм волого осаду в суспензії становить: $V_{осв} = G_{осв} \times 1000 / \rho_{ос} = 27,7 \times 1000 / 1050 = 26,4 \text{ л.}$

6.4.1.6. Втрати суспензії при фільтруванні складають: $V_{втф} = V_{кр} \times 1000 \times E_{фт} = 0,5005 \times 1000 \times 0,07 = 35 \text{ л, де } E_{фт} = 0,07$ (коефіцієнт втрат при фільтруванні, частка).

6.4.1.7. Об'єм отриманого фільтрату з урахуванням втрат при фільтруванні: $V_{фгм} = V_{кр} - V_{осв} - V_{втф} = 500,5 - 26,4 - 35 = 439 \text{ л.}$

6.4.1.8. Маса абсолютно сухих речовин у фільтраті становить: $G_{фт} = (G_{сркр} - G_{асб}) = 12 - 2,5 = 9,5 \text{ кг.}$

6.4.1.9. Вміст сухих речовин у фільтраті становить: $CP_{ф} = G_{фт} \cdot 100 / V_{фгм} = 9,5 \cdot 100 / 439 = 2,15 \text{ мас.}\%$.

3.4.2. Розведення супернатанту.

6.4.2.1. Для ефективної екстракції необхідно здійснити розведення супернатанту у 5 разів. Отже, об'єм розведеного супернатанту становитиме: $V_{сроз} = 439 \times 5 = 2195 \text{ л.}$

6.4.3. Екстракція гіберелінів етилацетатом.

6.4.3.1. Кількість етилацетату, потрібного для екстракції, становить $V_e = 2195 \text{ л.}$

6.4.3.2. Втрати екстракту гіберелінів в етилацетаті після екстракції становить: $V_{втгек} = V_e \times E_e = 2195 \times 0,05 = 110 \text{ л, де } E_e = 0,05$ (коефіцієнт втрат при екстракції, частка).

6.4.3.3. Вихід екстракту гіберелінів у етилацетаті становить: $V_{ек} = 2195 - 110 = 2085$ л.

6.4.4. Переведення гіберелінів у водний розчин.

6.4.4.1. Кількість гідроксиду натрію, потрібного для екстракції, становить $V_{NaOH} = 87,5$ л.

6.4.4.2. Втрати водного екстракту гіберелінів становить: $V_{втв.ек} = V_{NaOH} \times E_{п} = 87,5 \times 0,05 = 4,4$ л, де $E_{е} = 0,05$ (коефіцієнт втрат при екстракції, частка).

6.4.4.3. Вихід водного екстракту гіберелінів становить: $V_{в.ек} = 87,5 - 4,4 = 83$ л.

6.4.5. Адсорбція гіберелінів на активованому вугіллі.

6.4.5.1. Втрати адсорбованого розчину гіберелінів становить: $V_{втад} = V_{в.ек} \times E_{а} = 83 \times 0,05 = 4,1$ л, де $E_{а} = 0,05$ (коефіцієнт втрат при адсорбції, частка).

6.4.5.2. Вихід адсорбованого гібереліну становить: $V_{ад} = 83 - 4,1 = 79$ л.

6.4.6. Десорбція гіберелінів етилацетатом.

6.4.6.1. Втрати десорбованого розчину гіберелінів становить: $V_{втде} = V_{ад} \times E_{д} = 79 \times 0,05 = 4$ л, де $E_{д} = 0,05$ (коефіцієнт втрат при десорбції, частка).

6.4.6.2. Вихід десорбованого гібереліну становить: $V_{де} = 79 - 4 = 75$ л.

6.4.7. Концентрування та кристалізація гіберелінів методом видалення частини розчинника випарюванням.

6.4.7.1. Концентрація гіберелінів після десорбції становить: $C_{гіб} = (439/75) \times 15 = 87,8$ г/л.

Кількість гіберелінів після десорбції становить: $G_{гіб} = 87,8 \times 75 = 6585$ г $\approx 6,6$ кг або 8,8%.

Приймаємо ступінь концентрування $K_{уп} = 10$.

6.4.7.2. Об'єм концентрату гіберелінів з врахуванням коефіцієнта втрат при упарюванні $E_{уп} = 0,03$ (частка) складатиме: $V_{кон} = V_{де} \times (1 - E_{уп}) / K_{уп} = 75 \times (1 - 0,03) / 10 = 7,3$ л.

6.4.7.3. Втрати об'єму концентрату при концентруванні: $V_{втуп} = V_{кон} \times E_{уп} = 7,3 \times 0,03 = 0,2$ л.

6.4.7.4. Вихід об'єму маточного розчину з гіберелінами: $V_{\text{мрг}} = V_{\text{кон}} - V_{\text{втул}} = 7,3 - 0,2 = 7$ л

6.4.7.5. Втрати гіберелінів при кристалізації становить: $G_{\text{вткгіб}} = 6,6 \times 0,03 = 0,2$ кг.

6.4.7.6. Вихід гіберелінів після кристалізації становить: $G_{\text{кгіб}} = 6,6 - 0,2 = 6,4$ кг.

6.4.8. Відділення кристалів гіберелінів фільтруванням.

6.4.8.1. Об'єм суспензії гіберелінів, що йде на фільтрування складає $V_{\text{мрг}} = 7$ л.

6.4.8.2. Об'єм фільтрату становить: $W_{\text{кр}} = V_{\text{де}} - G_{\text{вк}} = 7 - 6,4 = 0,6$ л.

6.4.8.3. Прийmemo кількість вологи $W_{\text{кр}} = 0,70$ (частка), тоді кількість вологих кристалів в суспензії становитиме: $G_{\text{вк}} = V_{\text{мрг}} / (1 - W_{\text{кр}}) = 7 / (1 - 0,7) = 23,3$ кг.

6.4.8.4. Втрата вологих кристалів гіберелінів становить: $G_{\text{втвк}} = 23,3 \times 0,07 = 1,6$ кг, де $E_{\text{фт}} = 0,07$ (коефіцієнт втрат при фільтруванні, частка).

6.4.8.5. Вихід кристалів гіберелінів після фільтрування становить: $G_{\text{вкг}} = 23,3 - 1,6 = 21,7$ кг.

6.4.8.4. Втрати гіберелінів при фільтруванні становить: $G_{\text{втгіб}} = 6,4 \times 0,07 = 0,45$ кг, де $E_{\text{фт}} = 0,07$ (коефіцієнт втрат при фільтруванні, частка).

6.4.8.5. Вихід гіберелінів після фільтрування становить: $G_{\text{гіб}} = 6,4 - 0,45 = 6$ кг.

6.4.9. Сушіння кристалів у псевдозрідженому шарі.

6.4.9.1. Масу кристалів, що йде на сушіння, при його густині $\rho_{\text{уф}}$ (1050 ... 1100), приймаємо $\rho_{\text{уф}} = 1050$ кг/м³: $G_{\text{кр}} = V_{\text{вк}} \times \rho_{\text{уф}} / 1000 = 21,7 \times 1050 / 1000 = 22,8$ кг.

6.4.9.2. Маса висушеного препарату з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні $E_{\text{сш}} = 0,02$ (частка) сухої речовини з повітрям, що виходить з сушарки, при стандартному вмісті сухих речовин в готовому продукті $CP_{\text{гп}} = (1 - W_{\text{в}}) = 0,9$ (частка): $G_{\text{сш}} = G_{\text{кгіб}} \times (1 - E_{\text{сш}}) / CP_{\text{гп}} = 6(1 - 0,02) / 0,9 = 6,5$ кг.

6.4.9.3. Маса води, що підлягає видаленню з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні $E_{сш} = 0,02$ (частка): $W_{сш} = G_{кр} \cdot (1 - E_{сш}) - G_{сш} = 22,8 \cdot (1 - 0,02) - 6,5 = 15,8$ кг.

6.4.9.4. Кількість висушених кристалів гіберелінів становить: $G_{скгіб} = G_{кр} - W_{сш} = 22,8 - 15,8 = 7$ кг.

6.4.10. Стадія ПМВ. Пакування, маркування, відвантаження.

6.4.10.1. Препарат розфасовують в поліетиленові трьохшовні пакети по 0,2г. Втрати при фасуванні складають $E_{уп} = 0,01$. Кількість гіберелінів для фасування з урахуванням втрат складає: $G_{уп} = G_{скгіб} \times (1 - E_{уп}) = 7 \times (1 - 0,01) = 6,93$ кг або кількість пакетів при заповненні $N_{п} = 0,2$ кг складає: $N_{пк} = G_{уп} / N_{п} = 6930 / 0,2 = 34650$ пакетів.

6.4.10.2. Механічні втрати гіберелінів при фасуванні становлять: $G_{втм} = (G_{сш} - G_{уп}) = 7 - 6,93 = 0,07$ кг.

Похибка продуктового розрахунку складає: $\Delta = (G_{уп} - G_{пк}) \cdot 100 / G_{уп} = (6,9 - 6,93) \cdot 100 / 6,9 = 0,4 \%$, що значно менше заданої точності $\pm 10 \%$. Робимо висновок, що продуктовий розрахунок зроблено вірно.

6.5. Розрахунок матеріального балансу.

Таблиця 6.5

Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, дм ³	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, дм ³
1	2	3	4	5
1.	Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках			
1.1	Сахароза	0,020	Нестерильне ПС	0,55
1.2	Нітрат натрію	0,0016		
1.3	Калій фосфорнокислий однозаміщений	0,0005		

Продовження табл. 6.5

1.4	Магній сульфат	0,00025		
1.5	Калій хлорид	0,00025		
1.6	Ферум сульфат	0,000005		
1.7	Вода	0,53		
	Всього	0,55	Всього	0,55
2.	Стерилізація поживного середовища в автоклаві			
2.1	Нестерильне ПС	0,55	Стерильне ПС	0,55
	Всього	0,55	Всього	0,55
3.	Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках			
3.1	Стерильне ПС	0,55	Посівний матеріал	0,594
3.2	Посівний матеріал з колби	0,05		
3.3	Втрати (частка)	0,01		0,006
	Всього	0,6		0,6
4.	Приготування поживного середовища для інокулятора об'ємом 10 л			
4.1	Сахароза	0,20	Нестерильне ПС	5,45
4.2	Нітрат натрію	0,017		
4.3	Калій фосфорнокислий однозаміщений	0,006		
4.4	Магній сульфат	0,003		
4.5	Калій хлорид	0,003		
4.6	Ферум сульфат	0,00004		
4.7	Вода	5,24		
	Всього	5,45	Всього	5,45
5.	Стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 10 л			
5.1	Нестерильне ПС	5,45	Стерильне ПС	5,45
	Всього	5,45	Всього	5,45
6.	Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л			
6.1	Стерильне ПС	5,45	Посівний матеріал	5,1
6.2	Посівний матеріал з колби	0,594		

Продовження табл. 6.5

6.3	Втрати (частка)	0,15		0,9
	Всього	6		6
7.	Приготування поживного середовища для інокулятора об'ємом 100 л			
7.1	Сахароза	1,86	Нестерильне ПС	49,8
7.2	Нітрат натрію	0,18		
7.3	Калій фосфорнокислий однозаміщений	0,05		
7.4	Магній сульфат	0,03		
7.5	Калій хлорид	0,03		
7.6	Ферум сульфат	0,0005		
7.7	Вода	47,7		
	Всього	49,8	Всього	49,8
8.	Стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 100 л			
8.1	Нестерильне ПС	49,8	Стерильне ПС	56
8.2	Конденсат	6,2	(втрат немає)	0
	Всього	56	Всього	56
9.	Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л			
9.1	Стерильне ПС	56	Посівний матеріал	52
9.2	Посівний матеріал з інокулятора об'ємом 10л	5,1		
9.3	Втрати (частка)	0,15		9
	Всього	61		61
10.	Приготування поживного середовища для інокулятора об'ємом 1000 л			
10.1	Сахароза	18,6	Нестерильне ПС	456,5
10.2	Нітрат натрію	1,6		
10.3	Калій фосфорнокислий однозаміщений	0,5		
10.4	Магній сульфат	0,3		
10.5	Калій хлорид	0,3		
10.6	Ферум сульфат	0,005		
10.7	Вода	436		

Продовження табл. 6.5

	Всього	456,5	Всього	456,5
11.	Стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 1000 л			
11.1	Нестерильне ПС	456,5	Стерильне ПС	536,75
11.2	Конденсат	80,25	(втрат немає)	0
	Всього	536,75	Всього	536,75
12.	Виробничий біосинтез			
13.	Стерильне ПС	536,75	Культуральна рідина на фільтрацію	500,45
13.1	Посівний матеріал з інокулятора об'ємом 630л	52	500	
13.2	Втрати (частка)	0,15	Втрати (кількість)	88,3
	Всього	588,75	Всього	588,75
14.	Фільтрування культуральної рідини			
14.1	КР на фільтрацію, м ³	0,5005	Супернатант	439
14.2			Вологий осад	26,4
14.3	Втрати (частка)	0,07	Втрати (кількість)	35
	Всього	0,5005	Всього	0,5005
15.	Розведення супернатанту			
15.1	Супернатант	439	Розведений супернатант	2195
15.2	Вода	1756		
	Всього	2195	Всього	2195
16.	Екстракція гіберелінів етилацетатом			
16.1	Розведений супернатант	2195	Екстракт гіберелінів у етилацетаті	2085
16.2	Етилацетат	2195		
16.3	Втрати	0,05	Втрати	87,8
	Всього	4390	Всього	4390
17.	Переведення гіберелінів у водний розчин			

Продовження табл. 6.5

17.1	Екстракт гіберелінів у етилацетаті	2085	Водний екстракт гіберелінів	83
17.2	Розчин гідроксиду натрію	87,5	Розчин етилацетату	1980,9
17.3	Втрати	0,05	Втрати	108,6
	Всього	2172,5	Всього	2172,5
18.	Адсорбція гіберелінів на активованому вугіллі			
18.1	Водний екстракт гіберелінів	83	Адсорбований розчин гіберелінів	79
18.2	Втрати	0,05	Втрати	4,1
	Всього	83	Всього	83
18.	Десорбція гіберелінів на етилацетатом			
18.1	Адсорбований розчин гіберелінів	79	Десорбований розчин гіберелінів	69,35
18.2	Розчин етилацетату	73		
18.3	Втрати	0,05	Втрати	4
	Всього	73	Всього	73
19.	Концентрування та кристалізація гіберелінів			
19.1	Десорбований розчин гіберелінів	69,35	Маточний розчин гіберелінів	65,85
19.2	(Гібереліни)	6,6	(Гібереліни)	6,4
19.3			Втрати (гібереліни)	0,03
19.4	Втрати	0,03	Втрати	2,25
	Всього	69,35	Всього	69,35
20.	Відділення кристалів гіберелінів фільтруванням			
20.1	Маточний розчин гіберелінів	65,85	Вологі кристали гіберелінів	21,7
20.2	Вологі кристали гіберелінів	23,3	Кількість вологи	0,7
20.3	Гібереліни	6,4	Гібереліни	6

20.4			Втрати кристалів гіберелінів	1,6
20.5	Втрати	0,07	Втрати гіберелінів	0,45
	Всього	23,3	Всього	23,3
21.	Сушіння кристалів гіберелінів			
21.1	Вологі кристали гіберелінів з врахуванням густини	22,7	Сухі кристали гіберелінів	7
21.2			Висушена волога	15,8
21.3	Втрати (частка)	0,02	Втрати (кількість)	0,5
	Всього	22,8	Всього	22,8
22.	Пакування кристалів гіберелінів			
22.1	Сухі кристали гіберелінів	7	Сухі кристали гіберелінів	6,93
22.2	Пакети			34650
22.3	Втрати (частка)	0,01	Втрати (кількість)	0,07
	Всього	7	Всього	7

Похибка продуктового розрахунку складає: $\Delta = (G_{уп} - G_{цк}) \cdot 100 / G_{уп} = (6,9 - 6,93) \cdot 100 / 6,9 = 0,4 \%$, що значно менше заданої точності $\pm 10 \%$. Робимо висновок, що продуктовий розрахунок зроблено вірно.

6.6. Розрахунок технологічного обладнання.

6.6.1. Розрахунок кількості виробничих ферментерів.

6.6.1.1. Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $K_{зф} = 0,6$, м³: $V_{фг} = V_{ф} / K_{зф} = 588,75 / 0,6 = 981,25$ л.

6.6.1.2. Вибираємо найближчий за об'ємом ферментер, м³: $V_{фг} = 1$.

6.6.1.3. Кількість виробничих ферментерів при заданому $K_{зф}$, од.: $N_{фр} = V_{фг} / V_{фг} = 981,25 / 1000 = 0,98$ - приймаємо 1.

6.6.1.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного ферментера, частка: $K_{зф} = V_{ф} / V_{фг} \times N_{фг} = 588,75 / 1000 \times 1 = 0,58$.

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5-0,65) приймаємо до установки кількість ферментерів $N_{фт}+1$ запасний.

6.5.2. Розрахунок кількості посівних апаратів

6.6.2.1. Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $K_{па} = 0,6$, m^3 : $V_{пт} = V_{па} / K_{па} = 61 / 0,6 = 101,6$ л.

6.6.2.2. Вибираємо найближчий за об'ємом ферментер, m^3 : $V_{пт} = 0,1$.

6.6.2.3. Кількість виробничих ферментерів при заданому $K_{зпа}$, од.: $N_{пр} = V_{пт} / V_{пт} = 101,6 / 100 = 1,01$ - приймаємо 1.

6.6.2.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного ферментера, частка: $K_{зпа} = V_{па} / V_{пт} \times N_{пр} = 61 / 100 \times 1 = 0,61$.

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5-0,65) приймаємо до установки кількість ферментерів $N_{пт}+1$ запасний.

6.6.3. Розрахунок кількості інокуляторів

6.6.3.1. Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $K_{ін} = 0,6$, m^3 : $V_{інт} = V_{ін} / K_{ін} = 6 / 0,6 = 10$ л.

6.6.3.2. Вибираємо найближчий за об'ємом ферментер, m^3 $V_{інт} = 10$.

6.6.3.3. Кількість виробничих ферментерів при заданому $K_{зін}$, од.

$N_{інр} = V_{інт} / V_{інт} = 10 / 10 = 1$ - приймаємо 1.

6.6.3.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного ферментера, частка: $K_{зін} = V_{ін} / V_{інт} \times N_{інр} = 6 / 10 \times 1 = 0,6$.

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5-0,65) приймаємо до установки кількість ферментерів $N_{інр}+1$ запасний.

6.6.6. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування композицій А, Б для виробничого процесу

Композицію Б стерилізують безпосередньо в ферментері, але для розчинення солей здійснюють у окремому реакторі-змішувачі. Для приготування і стерилізації композиції А сахарозу розчиняють і готують розчин концентрацією 40% (об'єм композиції 44 л і об'єм конденсату 6,6 л) в окремому реакторі-змішувачі.

6.6.6.1. Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції А.

Приблизний загальний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$: $V_{Аф} = V_A / K_{зб} = 50,6 / 0,8 = 63,25$ л.

Вибираємо найближчий за об'ємом реактор $V_{ртф} = 0,6$ м³.

Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$: $N_p = V_{Аф} / V_{ртф} = 63,25 / 0,6 = 1,05 = 1$ од.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного обладнання, частка, $K_{зр} = V_A / V_{ртф} \times N_p = 50,6 / 0,6 \times 1 = 0,84$. Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,7-0,85) приймаємо до установки кількість реакторів-змішувачів для композиції А $N_p + 1$ запасний.

6.6.6.2. Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції Б.

Приблизний загальний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$: $V_{Бф} = V_B / K_{зб} = 410,9 / 0,8 = 513,6$ л.

Вибираємо найближчий за об'ємом реактор $V_{ртф} = 0,5$ м³.

Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$: $N_p = V_{Бф} / V_{ртф} = 513,6 / 0,5 = 1,03 = 1$ од.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного обладнання, частка, $K_{зр} = V_B / V_{ртф} \times N_p = 410,9 / 0,5 \times 1 = 0,82$. Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,7-0,85) приймаємо до установки кількість реакторів-змішувачів для композиції Б $N_p + 1$ запасний.

6.6.7. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування композицій А, Б для вирощування посівного матеріалу

Композицію Б готують безпосередньо в ферментері, але для розчинення солей здійснюють у окремому реакторі-змішувачі. Для приготування і стерилізації композиції А сахарозу розчиняють і готують розчин концентрацією 40% (об'єм композиції 4,6 л) в лабораторному посуді та стерилізується в автоклаві, тому розрахунок ємнісної апаратури не проводиться.

6.6.7.1. Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції Б.

Приблизний загальний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$: $V_{Бп} = V_{Б}/K_{зб} = 45,3/0,8 = 56,6$ л.

Вибираємо найближчий за об'ємом реактор $V_{ртп} = 0,06$ м³.

Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$: $N_p = V_{Бп}/V_{ртп} = 56,6/0,06 = 0,94 = 1$ од.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного обладнання, частка, $K_{зр} = V_{Бп}/V_{ртп} \times N_p = 45,3/60 \times 1 = 0,75$. Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,7-0,85) приймаємо до установки кількість реакторів-змішувачів для композиції Б $N_p + 1$ запасний.

6.6.8. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування композицій А, Б для вирощування інокуляту

Композицію Б розчиняють і готують (об'єм композиції 4,896 л) в лабораторному посуді та стерилізується в автоклаві, тому розрахунок ємнісної апаратури не проводиться. Для приготування композиції А сахарозу розчиняють і готують розчин концентрацією 40% (об'єм композиції 0,45 л) в лабораторному посуді та стерилізується в автоклаві, тому розрахунок ємнісної апаратури не проводиться.

6.6.9. Розрахунок реактора-змішувача для культуральної рідини після процесу біосинтезу.

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для культуральної рідини після процесу біосинтезу. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$: $V_{крг} = V_{кр}/K_{зб} = 0,5005/0,8 = 0,63$ м³. Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{нр} = 0,62$ л. Оскільки номінальний та приблизний об'єм реактора співпадають уточнення коефіцієнта заповнення реактора не проводимо.

6.6.10. Розрахунок фільтр-преса ФПАКМ.

Вихідні дані для розрахунку:

Об'єм суспензії, що йде на фільтрування: $V_{сус} = V_{кр} = 0,5005$ м³.

Загальний час фільтрування суспензії: $T_{фт} = 12$ хв.

Час відтискання осаду і пересування стрічки: $\tau_d = 12$ хв.

Зазор між плитами апарата: $h = 45$ мм.

Робочий тиск в камерах $\Delta P = 1,26$ МПа.

Характеристики суспензії:

Питомий опір фільтруванню: $r_o = 1,0 \cdot 10^{13}$ м/кг.

Маса вологого осаду, який одержують під час фільтрування 1 м^3 суспензії:
 $m_o = 11$ кг/м³.

Густина суспензії $\rho_{\text{сус}} = 1050$ кг/м³.

Динамічна в'язкість суспензії, $\mu_{\text{сус}} = 1,5 \cdot 10^{-3}$ Па·с.

Обираємо ФПАКМ за умови, що товщина осаду в камері становитиме $\delta = 10$ мм.

6.6.10.1. Визначаємо об'єм осаду з 1 м^2 площі фільтра становитиме: $V_{1\text{ос}} = 1 \times \delta / 1000 = 1 \times 10 / 1000 = 0,01 \text{ м}^3$.

6.6.10.2. Маса осаду з 1 м^2 площі фільтра складе: $G_{1\text{ос}} = V_{1\text{ос}} \times \rho_{\text{сус}} = 0,01 \cdot 1050 = 10,5$ кг/м².

6.6.10.3. За один технологічний цикл треба переробити суспензії: $V_{1\text{сус}} = G_{1\text{ос}} / m_o = 10,5 / 55,3 = 0,2 \text{ м}^3$.

6.6.10.4. З даної суспензії один технологічний цикл одержують фільтрату: $V_{1\text{ф}} = V_{1\text{сус}} \cdot (1 - m_o / \rho_{\text{сус}}) = 0,2 \times (1 - 55,3 / 1050) = 0,01 \text{ м}^3$.

6.6.10.5. Час фільтрування суспензії за один технологічний цикл:

$\tau_{\text{ф}} = (V_{1\text{ф}})^2 \times m_o \times r_o \times \mu_{\text{сус}} / 2 \times 3600 \times \Delta P \times 10^6 = (0,01)^2 \times 55,3 \times 1,0 \times 10^{13} \times 1,5 \times 10^{-3} / 2 \times 3600 \times 1,6 \times 10^6 = 0,3$ год.

6.6.10.6. Тривалість періоду фільтрування за один технологічний цикл фільтрування: $T = \tau_{\text{ф}} + \tau_{\text{д}} / 60 = 7 + 12 / 60 = 0,3$ год.

6.6.10.7. Необхідна площа фільтрування для всієї суспензії: $\sum F = V_{\text{сус}} \times T / T_{\text{фт}} \times V_{1\text{сус}} = 0,5005 \times 0,3 / 0,2 \cdot 0,2 = 3,75 \text{ м}^2$.

Обираємо ФПАКМ 2,5 з площею фільтрації $2,5 \text{ м}^2$.

6.6.10.8. Уточнюємо реальний час фільтрування суспензії за вибраним ФПАКМом: $T_{\text{фр}} = T_{\text{фт}} \times \sum F / F_{\text{фпакм}} = 12 \cdot 3,75 / 2,5 = 18$ хв.

6.6.11. Підбираємо геометричний об'єм збірника для розчину гідроксиду натрію.

6.6.11.1. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$: $V_{згн} = V_{гн}/K_{зб} = 87,5/0,8 = 109$ л.

6.6.11.2. Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{гнг} = 100$ л.

6.6.11.3. Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить: $N_p = V_{згн}/V_{гнг} = 109/100 = 1,09$. Приймаємо – 1 од.

6.6.11.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора: $K_{зр} = V_{гн}/(V_{гнг} \times N_p) = 0,87/(100 \times 1) = 0,875$.

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість збірників для супернатанту – 1.

6.6.12. Підбираємо геометричний об'єм екстрактора.

6.6.12.1. Приблизний геометричний об'єм екстрактора при заданому $K_{зб} = 0,8$: $V_{зек} = V_e/K_{зб} = 4390/0,8 = 5487$ л.

6.6.12.2. Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{гек} = 6,3$ м³.

6.6.12.3. Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить: $N_p = V_{зек}/V_{гек} = 5487/6300 = 0,87$. Приймаємо – 1 од.

6.6.12.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора: $K_{зр} = V_e/(V_{гек} \times N_p) = 4390/(6300 \times 1) = 0,7$.

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість збірників для супернатанту – 1.

6.6.13. Розрахунок друк-фільтра.

Площа фільтрування друк-фільтра становить $F = 0,3$ м², надлишковий тиск $\Delta P = 0,04$ МПа = 4×10^4 Па.

6.6.13.1. Час фільтрування становитиме: $\tau_{\phi} = (0,06/0,3)^2 \times 3,3 \times 4 \times 10^{11} \times 1,7 \times 10^{-3} / 2 \times 4 \times 10^4 = 1125$ с = 0,3 год = 19 хв.

РОЗДІЛ 7.
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 7.1

Специфікація обладнання допоміжних робіт, виробничого біосинтезу та процесу виділення гіберелінів

Позначки	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
СП-1	СІР-мийка	1	СІР-станція з нержавіючої сталі марки AISI 304 об'ємом 400 л ("Пивояр", Україна) [44]
Д-2 Д-33 Д-38	Об'ємний дозатор	3	Об'ємний дозатор серії ДЖ-100 з регуляцією дози 0,2-2500 л ("PackTech", Україна) [45]
Ф-3	Фільтр для розчинів	1	Фільтр фільтри, серії PREPOR, фільтруючий матеріал – поліпропілен ("Parker", Україна) [46]
ПЗ-4	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень та чохлам для захисту від непогоди ("Kratki", Польща) [47]
Ф-5	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтрувальний матеріал ФВКас-G3-66-48, хімволокно, номінальна продуктивність фільтру – 3400 м ³ /год ("Vozfilter", Росія) [48]
К-6	Компресор	1	Компресор серії SF, потужність 1,9-40,8 л/с, робочий тиск 0,8-1 МПа ("Atlas Copco", Швеція) [49]
Т-7	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач серії WHE 2015, продуктивністю 80 л/хв ("Paskal", Турція) [50]
РС-8	Ресивер	1	Ресивер серії RB500, об'єм 500 л, робочий тиск 1,1 МПа ("AirCast", Білорусь) [51]
Т-9	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний повітрянагрівач серії VBC, максимальна температура – 150°C, максимальний робочий тиск – 1,6 МПа ("Systemair", Швеція) [52]
Ф-10	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр серії ФПП-F5000-1, фільтруючий матеріал – полікарбонат, Е=99%, швидкість фільтрування – 8500 л/хв ("Pnevmo", Україна)[53]
Д-15 Д-20	Ваговий дозатор	2	Дозатор ваговий ВД-10 з регуляцією дози 10-1000 г ("PackTech", Україна) [54]
Д-24	Ваговий дозатор	1	Дозатор ваговий ШД-8 з регуляцією дози 0,5-30кг ("PackTech", Україна) [55]
Н-22 Н-29	Відцентровий насос	2	Відцентровий насос з магнітною муфтою серії DM 10, продуктивність 1-13м ³ /год ("DEBEM", Україна) [56]

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Лазюка Ю.В			РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання	Літ.	Арк.	94
Консульт.							94	4
Курівник		Скороцька О.І				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав.каф.		Пирог Т.П						

P-16	Реактор-змішувач для приготування композиції Б для вирощування посівного матеріалу	1	Реактор-змішувач з нержавіючої сталі марки AISI 316 оснащений перемішуючим пристроєм, загальний об'єм 70 л, максимальна швидкість перемішування 100об/хв діаметр 0,4 м, висота 0,8 м ("STS", Україна)[57]
P-21	Реактор-змішувач для приготування композиції Б для виробничого процесу	1	Реактор-змішувач з нержавіючої сталі марки AISI 316 оснащений перемішуючим пристроєм, загальний об'єм 600 л, максимальна швидкість перемішування 100об/хв, діаметр 0,8 м, висота 1,6 м ("STS", Україна) [57]
P-25	Реактор-змішувач для приготування композиції А для виробничого процесу	1	Реактор-змішувач з нержавіючої сталі марки AISI 316 оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм, загальний об'єм 60 л, максимальна швидкість перемішування 100 об/хв діаметр 0,4 м, висота 0,8 м ("STS", Україна) [57]
ЗП-13	Засівний пристрій	1	Засівний бак з нержавіючої сталі марки AISI 316, загальний об'єм 1 л м ("STS", Україна) [57]
Ф-11 Ф-12 Ф-17 Ф-18 Ф-23 Ф-26 Ф-27	Фільтри індивідуальної очистки	7	Фільтри марки А501, фільтруючий матеріал – фторопласт, Е= 99,999% ("Bonoco", Швейцарія)[58]
ФР-14	Ферментер (інокулятор)	1	Пілотний ферментер BIORUS 10 з нержавіючої сталі марки AISI 316., робочий об'єм 10 л, швидкість перемішування 20-200 об/хв діаметр 0,25 м, висота 0,5м ("BIORUS", Росія) [59]
ФР-19	Ферментер (посівний апарат)	1	Пілотний ферментер BIORUS 100 з нержавіючої сталі марки AISI 316, робочий об'єм 100 л, швидкість перемішування 20-200 об/хв діаметр 0,5 м, висота 1м ("BIORUS", Росія) [59]
ФР-28	Ферментер	1	Виробничий ферментер BIORUS 1000 з нержавіючої сталі марки AISI 316, робочий об'єм 1000 л, швидкість перемішування 20-200 об/хв діаметр 1 м, висота 2 м ("BIORUS", Росія) [60]
З-30	Збірник культуральної рідини	1	Збірник з нержавіючої сталі марки AISI 316, загальний об'єм 600 л, діаметр 0,8 м, висота 1,6м ("STS", Україна) [57]
Н-31 Н-37	Відцентровий насос	2	Відцентровий насос з магнітною муфтою серії DM 06, продуктивність 0,5-6м ³ /год ("DEBEM", Україна) [61]

Ф-32	Фільтр-прес	1	Фільтр-прес КМП 2,5, продуктивність 1-6 м ³ /м ² ×год, площа фільтрування 2,5 м ² , габаритні розміри 2,91×1,95×2,55 м ("ENCE GmbH", Швейцарія) [32]
Е-34	Екстрактор	1	Екстрактор з нержавіючої сталі марки AISI 316 оснащений перемішувачим пристроєм, загальний об'єм 6,3 м ³ , максимальна швидкість перемішування 100об/хв, діаметр 1,6м, висота 3,2 м ("STS", Україна) [57]
Д-35	Ваговий дозатор	1	Дозатор ваговий ВД-10 з регуляцією дози 10-1000 г ("PackTech", Україна) [62]
Р-36	Реактор-змішувач для приготування розчину гідроксиду натрію	1	Реактор-змішувач з нержавіючої сталі марки AISI 316 оснащений перемішувачим пристроєм, загальний об'єм 100 л, максимальна швидкість перемішування 100 об/хв діаметр 0,5м, висота 1 м ("STS", Україна) [57]
А-39	Адсорбер	1	Адсорбер з нержавіючої сталі марки AISI 316, оснащений згущувачем, висотою 4 м та діаметром 1,3 м ("Bucher Unipektin", Швейцарія) [63]
ВК-40	Випарний кристалізатор	1	Кристалізатор з нержавіючої сталі марки AISI 316 сепаратором вторинної пари, продуктивністю 200 л/год, діаметром 1 м, висотою 2 м ("ВМА", Німеччина) [64]
Т-41	Теплообмінник	1	Теплообмінник МРЕ 55/1 з пропускною здатністю 9,4м ³ /год, габаритними розмірами 0,168м×0,168м×1,28м ("Onda", Італія) [65]
Н-42	Циркуляційний насос	1	Циркуляційний насос G 25-6-130, продуктивністю 3,5л/хв, діаметр вхідного отвору – 1,5 м ("Grundfos", Данія) [66]
Ф-43	Друк-фільтр	1	Фільтр ДСЕв 0,3-11-12-01 з поверхнею фільтрування 0,3 м ² , об'ємом 0,06 м ³ та габаритними розмірами 1,75м×0,765м×0,8м("ГК ЕВРОХІММАШ К.О.", Україна) [40]
С-44	Сушарка киплячого шару	1	Сушарка киплячого шару СJM-5 продуктивність 4-6 кг/год, температура повітря 20-120°, діаметр 0,4 м, висота 2 м ("Minipres", Росія) [42]

Закінчення табл. 7.1

В-45	Вентилятор	1	Центробіжний вентилятор середнього тиску моделі ВР 287-46 з діаметром робочого колеса 500 мм, з двигуном потужністю 11 кВт на 1000 об./хв, тиском 1100-850 Па, продуктивністю 4,5-17,8 тис.м ³ /год, габаритними розмірами вентилятора 0,914м×0,770м×0,988м ("Горизонт", Україна)[67]
К-46	Калорифер	1	Калорифер КПСк 2-11 з продуктивністю за повітрям 16000 м ³ /год, продуктивністю за теплом 282,8 кВт, площею поверхні теплообміну 57,1 м ² , габаритними розміри 1,703м×1,727м×1,774м ("Т.С.Т", Росія) [68]
Ц-47	Циклон	1	Циклон JCDC-3 продуктивністю 2600 м ³ /год, об'ємом 250 л і габаритними розмірами 1,45м×0,772м×2,235м ("JET", Швейцарія) [69]
Д-48	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор ВТА-60/3-7-1R з дискретністю відліку 0,1, 0,2 і 0,5 г і габаритними розмірами 0,325м×0,345м×0,095м("Unipro", Україна) [43]
ПС-49	Пакувальний стіл	1	Пакувальний стіл 3035-01 з нержавіючої сталі оснащений бортом, полицею та імпульсним ручним запайщиком габаритними розмірами 0,6×0,6×0,85м ("Enjoy-Trade", Україна) [70]

РОЗДІЛ 8.

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема отримання гіберелінів включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, підготовка і стерилізація поживних середовищ, розчину 6% соляної кислоти та 6% гідроксиду натрію, підготовка реагентів для екстракції гіберелінів), технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, біосинтез гібереліну за допомогою гриба *F. moniliforme* NCIM 1100, відділення біомаси, розведення культуральної рідини, екстракція гіберелінів, адсорбція активованим вугіллям, десорбція етилацетатом, концентрування і кристалізація гіберелінів, відфільтровування кристалів гіберелінів, висушування кристалів гіберелінів), пакування, маркування та відвантаження, знешкодження відходів (знешкодження рідких відходів, знешкодження твердих відходів і знешкодження газоподібних відходів).

Технологічну схему отримання гіберелінів наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.

ДР 1.1. Підготовка мийних і дезинфікувальних засобів.

ДР 1.1.1 Приготування розчину "Аллесрейнігер".

Робочий розчин "Аллесрейнігер" концентрацією 1% готують з концентрованого розчину (10%). У збірник СІР-мийки (СМ-1) з нержавіючої сталі об'ємом 400 л за допомогою об'ємного дозатора Д-2 вносять 4 л концентрованого розчину та додають 364 л питної води.

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Лазюка Ю.В			РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	98	рушіє
Консульт.							98	17	
Керівник		Скроцька О.І				Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Зав.каф.		Пирог. Т.П							

ДР 1.1.2. Приготування розчину "Полідез-А".

Робочий розчин "Полідез-А" концентрацією 0,2% готують з концентрованого розчину (10%). У переносну емальовану ємність з нержавіючої сталі об'ємом 10 л за допомогою мірного циліндра вносять 20 мл концентрованого розчину та додають 10л питної води.

ДР 1.2. Підготовка персоналу.

Персонал проходить навчання і інструктаж з техніки безпеки. За тим персонал одягається у спеціальний одяг (халат), за потреби, зав'язує волосся. Після цього персонал може бути допущений до роботи на виробництві.

ДР 1.3. Підготовка приміщень.

ДР. 1.3.1. Щоденне прибирання.

Миють підлогу водою. Контролюють якість прибирання візуально. Використана вода направляється на стадію знешкодження рідких відходів (до ЗВ 14.2).

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання.

Генеральне прибирання відбувається один раз на 10 днів. Прибирають підлоги, зовнішньої поверхні обладнання, комунікацій і трубопроводів, змочують килимки при вході у всі приміщення, використовуючи воду і робочий розчин дезінфікуючого засобу "Полідез-А". Контролюють якість прибирання візуально. Використаний миючий розчин направляється на стадію знешкодження рідких відходів (до ЗВ 14.2).

ДР 1.4. Підготовка обладнання і комунікацій.

ДР 1.4.1. Миття обладнання.

Миття здійснюється за допомогою СІР-мийки (СМ-1) впродовж 52 хв: ополіскування водою впродовж 10 хв при 20°C, циркуляція робочої концентрації миючого розчину "Аллесрейнігер" впродовж 20 хв при 80°C, ополіскування водою зі скиданням у каналізацію впродовж 10 хв при 50°C, нагрів гарячою водою до температури стерилізації впродовж 2 хв при 100°C, стерилізація гарячою водою протягом 10 хв при 100°C. Після декількох циклів миття

обладнання використаний миючий розчин направляється на стадію знешкодження рідких відходів (до ЗВ 14.2).

ДР 1.4.2. Технічний огляд.

Технічний огляд здійснюється візуально. У разі знаходження видимих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.4.3. Перевірка на герметичність.

На апараті закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують покази манометра на кришці апарату та час витримки (30-60хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважається, що апарат герметичний. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень на апараті та у місцях з'єднання запірної арматури з комунікаціями з використанням галогенових течієпошукачів. Перед набором тиску в апарат вносять чотирихлорний карбон, закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80°C і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. Пари чотирихлорного карбону проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість перевірки одного апарату становить 1 год. У разі виявлення неущільнень здійснюють операції з їх ліквідації як описано вище. Відпрацьовані гази направляються на стадію знешкодження газоподібних відходів (до ЗВ 14.1).

ДР 1.4.4. Стерилізація обладнання.

Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації (125-130°C) закривають усю запірну арматуру на апараті, крім парової, і витримують заданий час стерилізації (1 год). При

стерилізації апарата паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного і відпрацьованого повітря.

ДР 2. Підготовка стерильного аераційного повітря.

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря.

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником (ПЗ-4), який знаходиться на 2 м вище від рівня даху будівлі (6 м), де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря;

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток.

Очищення повітря від пилу з розміром часток $\delta > 50 \mu\text{м}$ на тканинних фільтрах грубого очищення (Ф-5). Ступінь очищення становить 80%.

ДР 2.3. Стиснення повітря.

Стиснення повітря в компресорі (К-6) до тиску $P=0,35 \text{ МПа}$. Повітря нагрівається до $120-250^\circ\text{C}$.

ДР 2.4. Охолодження повітря і видалення вологи.

Охолодження стисненого повітря до температури "точки роси" ($25-30^\circ\text{C}$), за якої волога повітря конденсується, відбувається у водяному теплообміннику (Т-7). Зайва волога видаляється у краплевловлювачі ресивера (РС-8), де зменшуються пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря. Вологість повітря має становити 60-70%.

ДР 2.5. Нагрівання повітря.

Стабілізація показників тиску та температури відбувається підігріванням до температури $45-50^\circ\text{C}$ парою у відповідних теплообмінниках (Т-9). Вологість повітря має становити 50%.

ДР 2.6. Очищення повітря у головному фільтрі.

Очищення у головних ємнісних набивних фільтрах (Ф-10) до ступеня очищення 99%.

ДР 2.6. Очищення повітря у індивідуальному фільтрі.

Повітря від головних фільтрів (Ф-10) через трубопроводи подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів (Ф-11), (Ф-12), (Ф-17), (Ф-18), (Ф-23),

(Ф-26), (Ф-27) встановлених безпосередньо перед кожним ферментером. При цьому повітря очищають до ступеня очищення 99,9999%.

ДР 3. Приготування та стерилізація розчинів титрувальних агентів.

ДР 3.1. Приготування 6% розчину соляної кислоти.

ДР 3.1.1. Приготування 6% розчину соляної кислоти для вирощування посівного матеріалу у ферментері об'ємом 100 л.

У колбу об'ємом 200 мл за допомогою мірного циліндру вносять 17 мл соляної кислоти концентрацією 37% та доводять об'єм до 104 мл питною водою.

ДР 3.1.2. Приготування 6% розчину соляної кислоти для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1000 л.

У колбу об'ємом 2 л за допомогою мірного циліндру вносять 160 мл соляної кислоти концентрацією 37% та доводять об'єм до 980 мл питною водою.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію.

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію для вирощування посівного матеріалу у ферментері 100 л.

На технічних терезах зважують 7,7 г гідроксиду натрію, поміщають у колбу об'ємом 200 мл, доводять об'єм до 128 мл питною водою, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві при 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію для вирощування посівного матеріалу у ферментері 1000 л.

На технічних терезах зважують 72 г гідроксиду натрію, поміщають у колбу об'ємом 3 л, доводять об'єм до 1200 мл питною водою, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві при 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ.

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Для вирощування інокуляту в колбах на качалках необхідно приготувати 400 мл поживного середовища. Джерелом вуглецю в середовищі є сахароза, джерелом азоту – NaNO_3 . Вміст компонентів для приготування 400 мл середовища наведено у таблиці 8.1.

Таблиця 8.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,4 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,4 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Сахароза	35	14	А	35
Нітрат натрію	3	1,2	Б	345
Калій хлорид	0,5	0,2		
Магній сульфат	0,5	0,2		
Ферум сульфат	0,01	0,004		
Калій фосфорнокислий однозаміщений	1	0,4	В	20
Всього 0,4 л				

ДР4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних терезах зважують 14 г сахарози, поміщають у колбу об'ємом 100мл, доводять об'єм до 35 мл питною водою, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві при 112 °С упродовж 20хв.

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На технічних терезах зважують 1,2 г NaNO_3 , 0,2 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 г KCl , 0,004 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, поміщають у колбу об'ємом 1 л, доводять об'єм до 345 мл

питною водою, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві при 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В.

На технічних терезах зважують 0,4 г K_2HPO_4 , поміщають у колбу об'ємом 50 мл, доводять об'єм до 20 мл питною водою, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві при 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі 10 л.

Для другої стадії підготовки посівного матеріалу у ферментері об'ємом 10 л необхідно приготувати 6,4 л поживного середовища.

Враховуючи, що для засіву ферментера використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 0,4 л, загальна кількість води, яку необхідно додати для приготування середовища – 6 л. Вміст компонентів для приготування 6,4 л середовища наведено у таблиці 8.2.

Таблиця 8.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6,4 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6,4 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Сахароза	35	224	А	560
Нітрат натрію	3	22,2	Б	5000
Магній сульфат	0,5	3,7		
Калій хлорид	0,5	3,7		
Ферум сульфат	0,01	0,074	В	440
Калій фосфорнокислий однозаміщений	1	7,4		
Всього 6 л				

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних терезах зважують 224 г сахарози, поміщають у колбу об'ємом 1 л, доводять об'єм до 560 мл питною водою, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві при 112 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На технічних терезах зважують 22,2 г NaNO_3 , 3,7 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 3,7 г KCl , 0,074 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, поміщають у колбу об'ємом 10 л, доводять об'єм до 5 л питною водою, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві при 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В.

На технічних терезах зважують 7,4 г K_2HPO_4 , поміщають у колбу об'ємом 1 л, доводять об'єм до 440 мл питною водою, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві при 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у посівному апараті 100 л.

Для третьої стадії підготовки посівного матеріалу у ферментері об'ємом 100 л необхідно приготувати 70,5 л поживного середовища.

Враховуючи, що для засіву ферментера використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 6,4 л, і конденсат після стерилізації, об'єм якого становить 6,4 л, загальна кількість води, яку необхідно додати для приготування середовища – 51 л. Вміст компонентів для приготування 64 л середовища наведено у таблиці 8.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 64 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 64 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	35	2467	А	6
Нітрат натрію	3	211	Б	51
Калій фосфорнокислий однозаміщений	1	70,5		
Магній сульфат	0,5	35		
Калій хлорид	0,5	35		
Ферум сульфат	0,01	0,7		
Всього 57				

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних терезах зважують 2467 г сахарози, поміщають у колбу об'ємом 10 л, доводять об'єм до 6 л питною водою, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві при 112 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

За допомогою вагового дозатора (Д-15) зважують 211 г NaNO_3 , 35 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 35 г KCl , 0,7 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 70,5 г K_2HPO_4 вносять у реактор (Р-16) об'ємом 60 л, доводять об'єм до 51 л питною водою. Розчин солей подають у ферментер об'ємом 100 л (Фр-19) самопливом, додають 104 мл 6% розчин соляної кислоти з колби через штуцер (від ДР 3.1.1) і стерилізують подачею гострої пари у ферментер і у сорочку при 131 °С і рН 4,0 упродовж 40 хв.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування у ферментері 1000 л.

Для виробничого культивування у ферментері об'ємом 1000 л необхідно приготувати 660 л поживного середовища.

Враховуючи, що для засіву ферментера використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 60 л, і конденсат після стерилізації, об'єм якого становить 60 л, загальна кількість води, яку необхідно додати для приготування середовища – 540 л. Вміст компонентів для приготування 600 л середовища наведено у таблиці 8.4.

Таблиця 8.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 600 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 600 л середовища, кг(л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	35	23,1	А	58
Нітрат натрію	3	2	Б	482
Калій фосфорнокислий однозаміщений	1	0,66		
Магній сульфат	0,5	0,33		
Калій хлорид	0,5	0,33		
Ферум сульфат	0,01	0,006		
Всього 540				

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А.

За допомогою вагового дозатора (Д-24) зважують 23,1 кг сахарози, вносять у реактор об'ємом 60 л (Р-25), доводять об'єм до 58 л питною водою. Стерилізують подачею гострої пари у реактор і у сорочку при 112 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

За допомогою вагового дозатора (Д-20) зважують 2 кг NaNO₃, 0,33 кг MgSO₄×7H₂O, 0,33 кг KCl, 0,006 кг FeSO₄×7H₂O, 0,66 кг K₂HPO₄ вносять у реактор об'ємом 600 л (Р-21), доводять об'єм до 482 л питною водою. Розчин солей подають у ферментер об'ємом 1000 л (Фр-28) за допомогою насоса (Н-22), додають 980 мл 6% розчину соляної кислоти через штуцер (від ДР 3.1.2) і стерилізують подачею гострої пари у ферментер і у сорочку при 131 °С і рН 4,0 упродовж 40 хв.

ДР 5. Підготовка реагентів для переведення гіберелінів у водний розчин.

ДР 5.1. Підготовка 6% розчину соляної кислоти.

У колбу об'ємом 10 л за допомогою мірного циліндру вносять 860 мл соляної кислоти концентрацією 37% та доводять об'єм до 5,3 л питною водою.

ДР 5.2. Підготовка 1% розчину гідроксиду натрію.

За допомогою вагового дозатора (Д-35) зважують 875 г NaOH, вносять у реактор (Р-36) об'ємом 100 л, доводять об'єм до 85,5 л питною водою та перемішують 2 хвилини.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу.

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *F. moniliforme* NCIM 1100 зберігають у пробірках зі скошеним картопляно-глюкозним агаром в холодильнику при 4 °С. Пересіви здійснюють кожні 10 - 12 місяців. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 6.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах.

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з картопляно-глюкозним агаром, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із картопляно-глюкозним агаром і вирощують при температурі 28 °С упродовж 72 год.

ТП 6.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах.

Отримані ізолювані колонії (від ТП 6.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним картопляно-глюкозним агаром (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування 7 діб.

ТП 6.4. Вирощування культури в колбах на качалках.

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 1 л із 345 мл розчину композиції Б (від ДР 4.1.2.) в асептичних умовах вносять 35 мл розчину композиції А (від ДР 4.1.1.) та 20 мл розчину композиції В (від ДР 4.1.3.). Перемішують і переливають у стерильну качалкову колбу об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *F. moniliforme* NCIM 1100, вирощену на картопляно-глюкозному агарі, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують спори, піпеткою відбирають суспензію спор і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію, одержану з однієї пробірки.

Після вирощування грибів у колбах на качалці 72 год при рН 7, 240 об/хв і 27°C культуральну рідину з колб переносять самопливом за допомогою факелу у стерильний засівний бак об'ємом 1 л (ЗП-13).

Мікробіологічний аналіз культуральної рідини проводять у кінці культивування. Визначають концентрацію біомаси, джерела вуглецю та азоту.

ТП 6.5. Вирощування посівної культури у ферментері 10 л.

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у інокулятор об'ємом 10 л (ФР-14) в асептичних умовах через штуцер при горінні факелу вносять 5 л розчину композиції Б (від ДР 4.2.2.), 0,56 л розчину композиції А (від ДР 4.2.1.), 0,44 л розчину композиції В (від ДР 4.2.3.) і посівний матеріал *F. moniliforme* NCIM 1100 (через засівний бак (ЗП-13) від ТП 6.4.).

Вирощування грибів у інокуляторі триває 72 год при рН 7 і 27 °С. Через кожні 12 год проводять мікробіологічний аналіз культуральної рідини,

визначають концентрацію біомаси, джерела вуглецю та азоту. Відпрацьовані гази направляються на стадію знешкодження газоподібних відходів (до ЗВ 14.1).

ТП 6.6. Вирощування посівної культури у ферментері 100 л.

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у посівний апарат об'ємом 100л (Фр-19) із 51 л розчину композиції Б (від ДР 4.3.2.) в асептичних умовах через штуцер при горінні факелу вносять 6 л розчину композиції А (від ДР 4.3.1.), 128 мл стерильного розчину 6% гідроксиду натрію для підвищення рН до оптимального рівня 7,0 для біосинтезу (від ДР 3.2.2) і посівний матеріал *F.moniliforme* NCIM 1100 (через трубу перетискання від інокулятора (Фр-14) від ТП 6.5).

Вирощування грибів у інокуляторі триває 72 год при рН 7 і 27 °С [14]. Відпрацьовані гази направляються на стадію знешкодження газоподібних відходів (до ЗВ 14.1).

Через кожні 12 год проводять мікробіологічний аналіз культуральної рідини, визначають концентрацію біомаси, джерела вуглецю та азоту.

ТП 7. Біосинтез.

ТП 7.1. Біосинтез.

Для виробничого культивування у ферментер з робочим об'ємом 1 м³ (Фр-28) із 482 л розчину композиції Б (від ДР 4.4.2.) в асептичних умовах вносять 58 л розчину композиції А зі збірника (Р-25) самопливом (від ДР 4.4.1.), 1,2 л стерильного розчину 6% гідроксиду натрію в асептичних умовах через штуцер при горінні факелу для підвищення рН до оптимального рівня 7,0 для біосинтезу (від ДР 3.2.2) і посівний матеріал *F.moniliforme* NCIM 1100 (через трубу перетискання від посівного апарату (Фр-19) від ТП 6.6.).

Вирощування грибів у виробничому ферментері триває 8 діб при рН 7 і 30 °С. Вирощують культуру до стаціонарної фази росту [12]. Після процесу біосинтезу культуральна рідина перекачується за допомогою відцентрового насоса (Н-29) в збірник для культуральної рідини (З-30). Відпрацьовані гази направляються на стадію знешкодження газоподібних відходів (до ЗВ 14.1).

Через кожні 24 год проводять мікробіологічний аналіз культуральної рідини, визначають концентрацію біомаси, джерела вуглецю та азоту та концентрацію цільового продукту.

Процес культивування зупиняють тоді, коли кількість гіберелінів у культуральній рідині досягла значення 15 г/л або приблизно на 8 добу культивування.

ТП 8. Відділення біомаси.

ТП 8.1. Фільтрування культуральної рідини.

Зі збірника для зберігання культуральної рідини (З-30) за допомогою відцентрового насоса (Н-31) культуральна рідина у кількості 500 л надходить на автоматичний камерний фільтр-прес КМП 2,5 (Ф-32). Час фільтрації складає 12 хв. Фільтрат культуральної рідини надходить на розведення (до *ТП 9.1*), а міцелій продуцента надходить на стадію знешкодження твердих відходів (до *ЗВ 14.3*).

ТП 9. Розведення супернатанту.

ТП 9.1. Розведення супернатанту.

Відфільтрована культуральна рідина у кількості 439 л (від *ТП 8.1*) надходить у екстрактор (Е-34) об'ємом 6,3 м³. Культуральна рідина розводиться подачею питної води через лічильник у кількості 1756 л. Перемішується протягом 2 хв.

ТП 10. Виділення гіберелінів.

ТП 10.1. Екстракція гіберелінів етилацетатом.

До культуральної рідини у екстрактор (Е-34) через об'ємний дозатор (Д-33) вносять 5,3 л соляної кислоти (від *ДР 5.1.*) та 2195 л етилацетату. Екстракцію гіберелінів здійснюють 30 хв при перемішуванні 100 об/хв, після чого виключають мішалку та залишають суміш на 2 години для розділення фаз. Водна фаза зливається через нижній патрубок реактора та направляється на стадію знешкодження рідких відходів (до *ЗВ 14.2*).

ТП 10.2. Переведення гіберелінів у водний розчин.

До органічного екстракту гіберелінів у екстрактор (Е-34) самопливом вноситься 87,5 л 1% розчину гідроксиду натрію (від ДР 5.1) з реактора (Р-36). Вилучення гіберелінів здійснюють 30 хв при перемішуванні 100 об/хв, після чого виключають мішалку та залишають суміш на 2 години для розділення фаз. Водний екстракт гіберелінів у кількості 83 л перекачують за допомогою відцентрового насоса (Н-37) у адсорбер (А-38). Етилацетат зливається через нижній патрубок реактора та направляється на регенерацію.

ТП 11. Очищення гіберелінів.

ТП 11.1. Адсорбція гіберелінів на активованому вугіллі.

Водний екстракт гіберелінів у кількості 83 л (від ТП 10.3) надходить у адсорбер киплячого шару (А-39). Адсорбція триває 30 хвилин. Під час процесу адсорбції активоване вугілля з адсорбованими гіберелінами надходить у згущувач адсорберу, а водна фаза надходить на стадію знешкодження рідких відходів (до ЗВ 14.2).

ТП 11.2. Десорбція гіберелінів етилацетатом.

Активоване вугілля з адсорбованими гіберелінами у кількості 79 л надходить знову у адсорбер (А-39), куди через об'ємний дозатор (Д-38) подається етилацетат у кількості 73 л. Десорбція триває 30 хвилин. Органічний розчин гіберелінів у етилацетаті надходить у випарник-кристалізатор (ВК-40) (до ТП 12.1). Активоване вугілля надходить спочатку у згущувач для адсорбенту, а потім на регенерацію.

ТП 12. Отримання сухого препарату гібереліну.

ТП 12.1. Випарювання та кристалізація органічного розчину гіберелінів.

Органічний розчин гіберелінів у кількості 73 л (від ТП 11.2) надходить на випарювання та кристалізацію у випарник-кристалізатор (ВК-40) з псевдозрідженим шаром. Тепло, яке потрібне для випарювання розчинника, підводиться до розчину в теплообміннику (Т-41). Вихідний розчин подається у всмоктуючу лінію циркуляційного насоса (Н-42), змішується з концентрованим розчином, що виходить із випарника, далі суміш надходить у випарник-

кристалізатор. Випарювання здійснюється за температури 100°C. Процес здійснюється до повної кристалізації гіберелінів. Кристали надходять на фільтрування на друк-фільтр (Ф-43).

ТП 12.2. Фільтрування суспензії з кристалами гіберелінів.

З випарника-кристалізатора (ВК-40) суспензія з кристалами гіберелінів у кількості 30 л надходить на друк-фільтр ДСЕв 0,3-11-12-01 (Ф-43). Тривалість фільтрування становить 10 хв, тиск у апараті становить 0,05 МПа. Після фільтрування кристали гіберелінів вручну вивантажуються з фільтру та надходять на стадію висушування, відфільтрована рідина надходить на стадію знешкодження рідких відходів (до ЗВ 14.2).

ТП 12.3. Висушування кристалів гіберелінів.

Після фільтрування кристали гіберелінів у кількості 23 кг надходять на висушування у сушарці з псевдозрідженим шаром (С-44) при температурі 120 °С за допомогою гарячого повітря. Повітря забирається з вулиці за допомогою повітрозабірника, очищається фільтром грубої очистки, проходить через вентилятор (В-45), нагрівається у калорифері (К-46) до заданої температури та подається в апарат. В результаті сушіння виділяється вологе повітря, яке направляється на стадію знешкодження газоподібних відходів (до ЗВ 14.1), та отримується готовий продукт – кристали гіберелінів вологістю 2%, що направляються на циклон (Ц-47), з якого вивантажуються вручну у переносну ємність, яка надходить на стадію пакування (ПМВ 13).

ПМВ 13. Пакування, маркування, відвантаження.

ПМВ 13.1. Пакування, маркування, відвантаження.

Після висушування з циклону (Ц-47) готовий продукт у кількості 7 кг вручну вивантажується у переносну ємність та направляється на фасування. Фасування здійснюється за допомогою дискретного вагового дозатору (Д-48) у поліетиленові пакети по 0,2 г. Пакети запаюються з допомогою імпульсійного ручного запайщика на пакувальному столі (ПС-49), маркуються та

направляються на склад готової продукції. Залишки пакувального матеріалу надходять на стадію знешкодження твердих відходів (до ЗВ 14.3).

ЗВ 14. Знешкодження відходів.

ЗВ 14.1. Знешкодження газоподібних відходів.

Відпрацьовані гази (від ДР 1.4.3 та ТП 12.3) та гази, що утворюються при культивуванні (від ТП 6.5, ТП 6.6, ТП7) направляються на очищення шляхом пропускання через установку біоскруберу з подальшим викидом у навколишнє середовище.

ЗВ 14.2. Знешкодження рідких відходів.

Відпрацьовані розчини "Полідезу-А" та "Аллесрейнігер" та відпрацьована вода (від ДР 1.3.1, ДР 1.3.2, ДР 1.4.1, ДР 1.4.4, ДР2.5, ТП 10.1, ТП 11.1, ТП 12.2) направляються на очищення шляхом пропускання через установку аеробно-анаеробного очищення – SBR-реактор з подальшим скиданням у каналізацію.

ЗВ 14.3. Знешкодження твердих відходів.

Міцелію продуцента (від ТП 8.1) направляється на знешкодження шляхом стерилізації з подальшим захороненням. Пакувальні матеріали від миючих засобів та залишки пакувального матеріалу (від ПМВ 13.1) готового продукту направляються на переробку у компанію "Крамар Ресайклинг"[71].

РОЗДІЛ 9.

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ГІБЕРЕЛІНІВ

9.1. Карта постадійного контролю.

Таблиця 9.1

Карта контрольних точок виробництва препарату гіберелінів

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
Кх 1.1.1 Приготування робочого розчину "Аллесрейнігер"	Концентрація розчину "Аллесрейнігер"	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=1%
Кх 1.1.2 Приготування робочого розчину "Полідез-А"	Концентрація розчину "Полідез-А"	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,2%
Кт 1.2.1, Км 1.2.2 Підготовка виробничих приміщень	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кт 1.3.1 Миття з'ємних частин обладнання	З'ємні частини обладнання, мийний розчин, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, візуальний огляд	Під час проведення операції	t=45°C
Кт 1.3.2 Миття обладнання	Мийний розчин, обладнання, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник, візуальний огляд	Під час проведення операції	t=20, 50, 80, 100°C, τ=10, 20, 10, 2хв
Кт 1.3.3 Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	P=0,2МПа, τ=1год

НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Лазюка Ю.В		
Консульт.				
Керівник		Скороцька О.І		
Н. Контр.				
Заф.каф.		Пирог Т.П		
РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва гіберелінів				
		Літ.	Арк.	115
			115	14
Кафедра БТМ				

Продовження табл. 9.1

Кт 1.3.4 Стерилізація обладнання	Температура стерилізації, час стерилізації	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	$P=0,2\text{МПа}$, $t=125-130^{\circ}\text{C}$, $\tau=1\text{год}$
Кт 2.1.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тиску	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E=90\%$, тиск згідно паспорту
Кт 2.2.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тиску	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E=90\%$, тиск згідно паспорту
Кт 2.2.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	$P=0,35\text{МПа}$, $t=120-250^{\circ}\text{C}$
Кт 2.2.4 Охолодження повітря	Охолодження повітря, температура, вологість	Термометр технічний	Після охолодження повітря	$t=25-30^{\circ}\text{C}$
Кт 2.2.5 Видалення зайвої вологи	Повітря після видалення зайвої вологи	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	$W=60-70\%$
Кт 2.2.6 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t=45-50^{\circ}\text{C}$, $W=50\%$
Кт 2.2.7 Тонке очищення повітря	Очищення повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі тонкого очищення	$E=99,9999\%$
Кт 2.2.8 Очищення повітря на індивідуальному у фільтрі	Очищення повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	$E=99,9999\%$
Км 3.1.1 Приготування соляної кислоти	Розчин соляної кислоти Концентрація	—	—	$C=6\%$,

Продовження табл. 9.1

Кт, Кх, Км 3.2.1 Приготування і стерилізація гідроксиду натрію	Розчин гідроксиду натрію Температура, час, концентрація, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічни й контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 40 хв, С=6 %, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.1 Стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, відсутність сторонньої мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічни й контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	t= 112 °С, τ= 20 хв, Р=0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Тиск, температура, час, рН, відсутність сторонньої мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, рН- метр, мікробіолог ічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, рН визначається перед стерилізацією, мікробіологічни й контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 40 хв, Р=0,15 МПа, рН=4,0, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В Тиск, температура, час, відсутність сторонньої мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічни й контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 40 хв, Р=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1 Стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, відсутність сторонньої мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічни й контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	t= 112 °С, τ= 20 хв, Р=0,05 МПа, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 9.1

Кт, Км 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Тиск, температура, час, рН, відсутність сторонньої мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, рН- метр, мікробіолог ічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, рН визначається перед стерилізацією, мікробіологічни й контроль після стерилізації	t= 131 °C, τ= 40 хв, P=0,15 МПа, рН=4,0, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В Тиск, температура, час, відсутність сторонньої мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічни й контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	t= 131 °C, τ= 40 хв, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.1 Стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, відсутність сторонньої мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічни й контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	t= 112 °C, τ= 20 хв, P=0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Тиск, температура, час, рН, відсутність сторонньої мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, рН- метр, мікробіолог ічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, рН визначається перед стерилізацією, мікробіологічни й контроль після стерилізації	t= 131 °C, τ= 40 хв, P=0,15 МПа, рН=4,0, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.1 Стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, відсутність сторонньої мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічни й контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	t= 112 °C, τ= 20 хв, P=0,05 МПа, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 9.1

Кт, Км 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Тиск, температура, час, рН, відсутність сторонньої мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, рН визначається перед стерилізацією, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau=40\text{ хв}$, $P=0,15\text{ МПа}$, $pH=4,0$, відсутність мікробіоти
Кх, Кт 5.1 Приготування розчину соляної кислоти	Розчин соляної кислоти, концентрація	–	–	$C=6\%$
Кх, Кт 5.2 Приготування розчину гідроксиду натрію	Розчин гідроксиду натрію, час, концентрація	Годинник	Час контролюється безпосередньо під час проведення процесу, концентрація контролюється після приготування розчину	$C=1\%$, $\tau=2\text{ хв}$
Кт, Км 6.3 Вирощування культури на агаризованому середовищі у пробірках	Посівний матеріал, Морфологічна однорідність, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль	$t=28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau=7\text{ діб}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.4 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, морфологічна відповідність організмів	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп, технічні ваги	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 12 годин	$t=27\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau=72\text{ год}$, $\omega=120\text{ об/хв}$, $C_{\text{біомаси}}=2\text{ г/л}$, $P_{\text{надл.}}=0,02\text{ МПа}$, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 6.5 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 100 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, морфологічна відповідність організмів	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп, технічні ваги	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 12 годин	$t = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72$ год, $\omega = 120$ об/хв, $C_{\text{біомаси}} = 2$ г/л, $P_{\text{надл.}} = 0,02$ МПа, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 7.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 1000 л	Культуральна рідина, тривалість культивування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, концентрація гіберелінів, концентрація біомаси <i>Fusarium moniliforme</i> NCIM 1100	Датчик рН, годинник, термометр технічний, тахометр, манометр, мікроскоп, технічні ваги	рН визначають в останні години культивування; температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування; мікроскопіювання – кожні 24 годин	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 192$ год, $\omega = 120$ об/хв, $P_{\text{надл.}} = 0,02$ МПа, $C_{\text{гіберелінів}} = 15$ г/л, $C_{\text{біомаси}} = 5$ г/л відсутність сторонньої мікробіоти
Кт 8.1 Фільтрування культуральної рідини	Тривалість фільтрування	Годинник	Час контролюється безпосередньо під час проведення процесу	$\tau = 12$ хв
Кт 9.1 Розведення супернатанту	Час розведення	Годинник	контролюється безпосередньо під час проведення процесу	$\tau = 2$ хв
Кт 10.1 Екстракція гіберелінів етилацетатом	Частота обертів мішалки, час проведення процесу, рН	Тахометр, годинник, датчик рН	Час, рН та частота обертів контролюються безпосередньо під час проведення процесу	$\tau_1 = 30$ хв, $\tau_2 = 2$ год, $\text{pH} = 2,5-3$ $w = 100$ об/хв
Кт 10.2 Переведення гіберелінів у водний розчин	Частота обертів мішалки, час проведення процесу	Тахометр, годинник	Час та частота обертів контролюються безпосередньо під час проведення процесу	$\tau_1 = 30$ хв, $\tau_2 = 2$ год, $w = 100$ об/хв

Кт 11.1 Адсорбція гіберелінів на активованому вугіллі	Час проведення процесу	Годинник	Час контролюється безпосередньо під час проведення процесу	$\tau = 30\text{хв}$
Кт 11.2 Десорбція гіберелінів етилацетатом	Час проведення процесу	Годинник	Час контролюється безпосередньо під час проведення процесу	$\tau = 30\text{хв}$
Кт 12.1 Випарювання та кристалізація гіберелінів	Температура проведення процесу	Термометр	Температура контролюється безпосередньо під час проведення процесу	$t = 100^{\circ}\text{C}$
Кт 12.2 Фільтрування суспензії з кристалами гіберелінів	Час проведення процесу, тиск	Годинник, манометр	Час та тиск контролюються безпосередньо під час проведення процесу	$\tau = 10\text{хв}$
Кт 12.3 Висушування кристалів гіберелінів	Температура проведення процесу, вологість продукту	Термометр, вологомір	Температура контролюються безпосередньо під час проведення процесу, вологість вимірюється після закінчення процесу	$t = 120^{\circ}\text{C}$
Кт 13.1 Пакування готового продукту	Маса продукту	Ваги	Вага контролюються безпосередньо під час проведення процесу	$m = 0,2\text{ г}$

Упродовж культивування періодично (кожні 24 год) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси і цільового продукту (гіберелінів), а також вмісту джерела вуглецю (сахароза) і азоту (нітрат натрію).

Після процесу висушування препарату відбирають проби готового продукту для ідентифікації продукту і визначення його вологості.

9.2. Мікробіологічний контроль. Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопіюванням.

Культуральну рідину *F. moniliforme* NCIM 1100 розсівають методом виснаженого штриха на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром для виявлення бактерій, з сусло-агаром або картопляно-глюкозним агаром для виявлення дріжджів і грибів, які інкубують 5 діб при 30 °С для бактерій і 25 °С для грибів і дріжджів.

Для мікроскопування використовують препарати "роздавлена крапля". Препарат "роздавлена крапля" готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, накривають накривним скельцем і розглядають з об'єктивом 40х, а також мікроскопіюють препарат з імерсійною системою.

У полі зору мікроскопа повинні спостерігати макро- та мікроконідії серповидної форми, які утворюються при безстатевому розмноженні гриба. Макроконідії шилоподібні, злегка серповидні, слабо звужуються до обох кінців, з чітко вираженою ніжкою біля основи, з 3-5 перегородками. Мікроконідії ланцетоподібні, овальні, яйцеподібні, звужені біля основи, одноклітинні або з однією перетинкою [15].



Рис 9.1. Вигляд колонії *F. moniliforme* NCIM 1100 на чашці Петрі та мікро- та макроконідій *F. moniliforme* NCIM 1100 під світловим мікроскопом з об'єктивом $\times 40$

9.3. Показники росту і синтезу цільового продукту. Для визначення концентрації біомаси, джерел вуглецю і азоту та цільового продукту необхідно відібрати 100 мл культуральної рідини та відділити біомасу шляхом фільтрування через паперові фільтри на воронці Бюхнера.

9.3.1. Концентрація біомаси. Біомасу *F. moniliforme* NCIM 1100 визначають ваговим методом (прямий метод):

- 1) Паперові фільтри попередньо зважуються.
- 2) Зважені фільтри поміщають у воронку Бюхнера і фільтрують.
- 3) Культуральну рідину декілька разів повертають на фільтр для повторної фільтрації.
- 4) Осад на фільтрі ретельно промивають підкисленою дистильованою водою.
- 5) Фільтри висушують у приладі Чижової упродовж 5-7 хвилин при температурі 160°C за допомогою інфрачервоного випромінювання до постійної маси.
- 6) Кількість сухої біомаси визначають за формулою, г/л:

$$x = \frac{(A - B)1000}{V},$$

де А і В – маса фільтра з осадом і без осаду відповідно, г; V – об'єм культуральної рідини, відібраної для фільтрування, мл.

Біомасу ваговим методом визначають в двох паралельних пробах [72].

9.3.2. Концентрація цільового продукту (гіберелінів). Концентрацію гібереліну GA₃ у культуральній рідині можливо визначати спектрофотометрично при довжині хвилі світла 254 нм після попередньої екстракції GA₃ з культуральної рідини етилацетатом при рН 1-2 [73]. Але загальноприйнятою, точною, проте трудомісткою і вартісною, є методика визначення гіберелінів за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з використанням у якості рухомої фази суміші метанолу з водою (3: 1) при швидкості потоку 1 мл /

хв після попередньої екстракції GA₃ з культуральної рідини етилацетатом при рН 2[74].

Проте не всі підприємства можуть собі дозволити використовувати такий дороговартісний метод, як ВЕРХ. Тому наведемо і спектрофотометричний метод визначення, який є менш точним, але більш дешевим, за допомогою якого можливо попередньо впевнитись в наявності досліджуваної речовини, і також наведемо хроматографічний метод для більш точного визначення.

Визначення GA₃ спектрофотометричним методом. Оскільки метод визначення GA₃ розрахований на концентрацію GA₃ 0,1-1 г/л, а продуцент *F. moniliforme* NCIM 1100 синтезують 15 г/л, необхідне зробити ряд послідовних розведень у 20, 30, 40 і 50 разів.

Підготування проби. Після відділення біомаси від культуральної рідини шляхом фільтрування відбирають 10 мл фільтрату. Роблять ряд послідовних розведень (у 20, 30, 40 та 50 разів). Аліквоту, яка, як очікується, міститиме від 2 до 6 мг GA₃ (0,2 мл, 0,3 мл, 0,4 мл і 0,5 мл відповідно до розведення) переносять у ділильну воронку на 100 мл, доводять об'єм водою до 10 мл, доводять значення рН до 1-2, використовуючи 0,1 М розчин соляної кислоти. Додають 20 мл етилацетату і струшують 60 с. Водну фазу поміщають у другу ділильну воронку і повторюють процес екстракції, додаючи ще 20 мл етилацетату. Потім водну фазу зливають, а органічну фазу переносять на першу ділильну воронку. GA₃ повторно екстрагують етилацетатом з порціями 20 мл, 15 мл і 10 мл фосфатного буфера (рН 7,4), струшуючи кожен раз протягом 60 с. Після кожної екстракції продукт збирають у колбу об'ємом 50 мл, доводять об'єм до 50 мл фосфатним буфером.

Визначення на спектрофотометрі. Зразок органічної фази об'ємом 1 мл і 1 мл абсолютного етанолу (99,7-99,8%) поміщають у мірну колбу об'ємом 10 мл, доводять об'єм до 10 мл 3,75 М розчином HCl, перемішують протягом 10 с. Світлопоглинання отриманого розчину вимірюють при довжині хвилі 254 нм з реєстрацією кожні 20 с протягом 2 хв. Температуру підтримують на рівні 20°C.

Концентрацію гібереліну визначають за допомогою калібрувального графіка залежності світлопоглинання і концентрації гібереліну, отриманого за аналізу стандартних розчинів GA₃, які готували шляхом розчинення 0,04 г чистого GA₃ у абсолютному етанолі і розведенням абсолютним етанолом до 100 мл у мірній колбі[73].

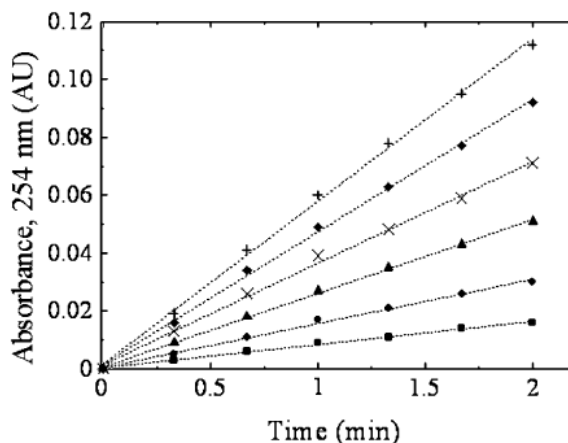


Рис.9.2. Калібрувальний графік для визначення концентрації GA₃

Визначення GA₃ хроматографічним методом.

Підготування проби. Після відділення біомаси від культуральної рідини шляхом фільтрування відбирають 1,5 мл фільтрату, доводять рН до 2 за допомогою 1М розчину HCl. Отриманий розчин тричі екстрагують етилацетатом у кількості 5 мл на одну екстракцію. Органічну фазу відділяють та промивають сольовим розчином (5 мл) сушать (використовуючи 1 г Na₂SO₄) і випарюють досуха на роторному випарному апараті. Залишок повторно розчиняють в 1 мл метанолу і фільтрують через фільтр з розміром пор 0,22 мкм.

Визначення на хроматографі. Аліквоту (10 мкл) вводять в систему HPLCMS (ModelLCQ, Finnigan MAT; ThermoFinnigan, San Jos'e, Каліфорнія, США) за допомогою системи Model-Spectra (ThermoSeparation Products, Riviera Beach, FL, США). Хроматограф оснащений колоною Hypersi(4,6 мм × 150 мм), наповненою октадецилсиланом, та УФ-детектором (визначення проводиться при довжині хвилі світла 206 нм). У якості рухомої фази використовується суміш

метанолу з водою у співвідношенні 3:1. Швидкість потоку складає 1 мл/хв. У цих умовах GA₃ елююється за 3 хв[74].

9.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.

9.3.3.1. Визначення концентрації джерела вуглецю. Джерелом вуглецю в середовищі для культивування грибів *F. moniliforme* NCIM 1100 є сахароза. Концентрацію сахарози визначають за допомогою біохімічного аналізатору YSI 2900, принцип роботи якого полягає у визначенні концентрації перекису водню, який утворився після послідовної взаємодії сахарози з трьома ферментами (інвертаза, мутаротаза, оксидаза), які іммобілізовані на мембрані датчику.

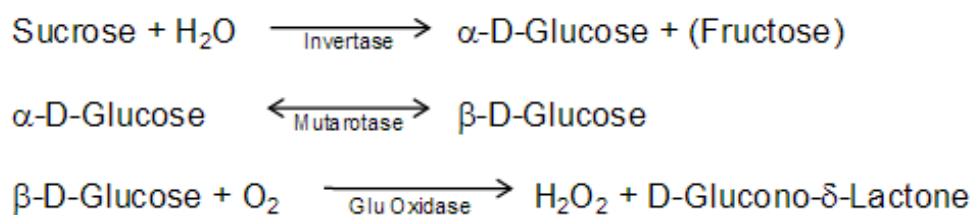


Рис. 9.3. Хімізм визначення сахарози за допомогою біохімічного аналізатору YSI 2900

Визначення сахарози за допомогою біохімічного аналізатору. Відбирають 1 мл фільтрату після відділення біомаси від культуральної рідини. Оскільки метод визначення сахарози розрахований на концентрацію до 25 г/л, потрібно зробити розведення у 2 рази YSI буфером. Відбирають 25 мкл проби і наносять на ферментний датчик. Результат отримують через 30 с [75, 76].

9.3.3.2. Визначення концентрації джерела азоту. Джерелом азоту в середовищі для культивування грибів *F. moniliforme* NCIM 1100 є нітрат натрію. Визначення нітрату натрію проводиться спектрофотометричним методом при $\lambda=540$ нм після попереднього відновлювання елементарним цинком та підкисленням оцтовою кислотою.

Спектрофотометричний метод визначення нітрату. Відбирають 5 мл фільтрату після відділення біомаси від культуральної рідини. Для визначення нітрату його попередньо відновлюють цинковим пилом до нітриту. З цією метою

до проби додавали 0,3 г сухого відновника і 5 мл 12% розчину оцтової кислоти. Через 10 хв пробу фільтрують через паперові фільтри. Отриманий фільтрат спектрофотометрують при $\lambda=540$ нм. За калібрувальною кривою знаходять концентрацію нітрату[77].

9.4. Контроль готового продукту.

9.4.1. Визначення вологості висушених кристалів гіберелінів. Для вимірювання вологості готового продукту доцільно застосовувати вологомір WALCOM ТК-100, робота якого заснована на кондуктометричному методі вимірювання співвідношення відсоткового вмісту води та електричного опору. Діапазон вимірювання становить 0-80 %, точність приладу становить $\pm 0,5\%$ [78].

Визначення вологості у готовому продукті. Металеві щупи занурюють у ємність з висушеними кристалами гіберелінів і дивляться на показники вологості, що відображаються на дисплеї. Показники вологості готового продукту не мають перевищувати 2 %.



Рис 9.4. Зовнішній вигляд вологоміру

9.4.2. Ідентифікація готового продукту (гіберелінів). Ідентифікацію можливо здійснювати спектрофотометричним методом при $\lambda=254$ нм після попереднього розчинення наважки готового продукту у абсолютному етанолі.

Визначення GA_3 спектрофотометричним методом. Наважку готового продукту 0,04 г розчиняють у абсолютному етанолі і розводять абсолютним етанолом до 100 мл у мірній колбі. Світлопоглинання отриманого розчину вимірюють при довжині хвилі 254 нм з реєстрацією кожні 20 с протягом 2 хв. Температуру підтримують на рівні 20 °С.

У якості контролю використовують стандартні розчини GA_3 , які готували шляхом розчинення 0,04 г чистого GA_3 у абсолютному етанолі і розведенням абсолютним етанолом до 100 мл у мірній колбі[73].



Рис 9.5. Зовнішній вигляд спектрофотометра

РОЗДІЛ 10.

АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

10.1. Опис апаратурно-технологічної схеми виробничої ділянки.

Ключовим фактором виробництва якісної продукції, при гранулюванні і брикетуванні будь-яких видів сухих сипких препаратів, є відповідна підготовка сировини, тобто подрібнення, сушіння, видалення сторонніх домішок.

Якщо видалення сторонніх домішок, за допомогою просіювання, і подрібнення, шляхом дроблення вихідної сировини, є досить простими технологічними процесами, то сушка вологих матеріалів до необхідного вмісту вологи, є найбільш відповідальним і складним процесом. У процесі сушіння відбувається видалення з матеріалів вологи шляхом її випаровування і відведення пари, що утворилася.

Як сушильний агент застосовується нагріте повітря або димові гази. Для отримання «чистого» продукту використання димових газів неприйнятно, тому сушильне устаткування повинно мати теплообмінник, в якому відбувається нагрівання атмосферного повітря.

Швидкість процесу сушіння залежить від температури осушаючого агента, відносної швидкості його руху, питомої поверхні висушуваних частинок, фізичних властивостей матеріалу.

					НУХТ БТЕК 04.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва	Літ.	Арк.	129
Розроб.		Лазюка Ю.В						129
Консульт.		Клименко О.М					129	6
Керівник		Скороцька О.І				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав.каф.		Пирог. Т.П						

У початковий період (період постійної швидкості сушіння) вологість матеріалу постійна у всьому обсязі. Після певного періоду часу сушіння, коли концентрація вологи внаслідок випаровування на поверхні матеріалу знижується, волога починає переміщатися з центру часток до поверхні внаслідок градієнта концентрації, настає період падаючої швидкості сушки, температура матеріалу починає рости. У міру зниження вмісту вологи матеріалу температура висушуваних частинок наближається до температури осушаючого агента.

Таким чином, існує обмеження температури застосовуваного осушаючого агента, в зв'язку з можливістю займання дрібнодисперсних сухих часток використовуваного матеріалу.

Сушарка з «киплячим» шаром працює при температурі осушаючого агента 120-150 ° С, що виключає небезпеку загоряння осушуваних частинок. Запускається сушарка протягом декількох хвилин, процес сушіння легко керований і контролюємий.

Сушка матеріалу в сушильній установці забезпечується інтенсивним масо-повітрообміном, який є результатом технічного рішення даного апарату. Також, процес сушіння прискорюється в зв'язку з інтенсивним тертям частинок один об одного в щільному шарі, при русі з високою окружною швидкістю.

Швидкість осушаючого агента щодо часток матеріалу в аеродинамічній сушарці становить 25-28 м/с, що дозволяє сушити дрібнофракційні матеріали в компактній конструкції, що займає невеликі виробничі площі, що володіє низькою металоемкістю.

Тривалість сушки і витрата енергії, при сушінні в імпульсному киплячому шарі значно нижче, ніж в вакуум-сушарках. В наш час сушарки з псевдокиплячим шаром також витісняють барабанні сушарки і труби-сушарки[79].

Продуктивність сушарки становить 4-6 кг за партію сухого продукту з вмістом вологи $\geq 2\%$. Діаметр сушарки становить 0,4 м, висота становить 2 м.

Переваги аеродинамічних сушок в порівнянні з сушильними барабанами та іншими видами сушильних установок:

- компактність, набагато менші витрати на будівлі, фундаменти, транспортні елементи і т.п.
- пожежна безпека: небезпека загоряння виключена через високу швидкість матеріалу в активаторі і низької температури осушаючого агента;
- максимальна заводська готовність, легкість монтажу;
- швидкий запуск і зупинка, висновок на робочий режим займає кілька хвилин;
- високий ступінь автоматизації, параметри сушки регулюються оператором з пульта;
- низькі експлуатаційні витрати;
- на виході отримуємо сировину однорідно дрібної, ідеальною для виробництва паливних брикетів або гранул, фракції[1].

Недоліками є значна витрата електроенергії для створення тиску газу під решітками, що забезпечує кипіння шару, а також здрібнювання частинок матеріалу в псевдокиплячому шарі[80].

Після фільтрування кристали гіберелінів надходять на висушування у сушарці з псевдозрідженим шаром (рівень кристалів у сушарці вимірюється датчиком) при температурі 120 °C за допомогою гарячого повітря (температура у камері вимірюється датчиком). Повітря забирається з вулиці за допомогою повітрозабірника, очищається фільтром грубої очистки, проходить через вентилятор (швидкість подачі повітря контролюється датчиком), нагрівається у калорифері до заданої температури (температура на виході з калорифера вимірюється датчиком) та подається в апарат. В результаті сушіння виділяється вологе повітря, яке направляється на стадію знешкодження газоподібних відходів, та отримується готовий, що направляються на циклон, з якого вивантажуються вручну у переносну ємність, яка надходить на стадію пакування.

10.2. Технологічні вимоги до системи автоматизації.

Таблиця 10.1

Технологічні вимоги до системи автоматизації сушарки з «киплячим» шаром

№ п/п	Машина, апарат, агрегат	Параметр, місце відбору імпульсу	Значення параметру, допустимі відхилення	Система автоматизації		
				Вид системи автоматизації	Характер контролю, регулювання, управління	Додаткові вимоги
1	Сушарка киплячого шару	Температура теплоносія у камері	$120 \pm 10^{\circ}\text{C}$	Контроль	Показ, реєстрація	АРМ оператора
2		Рівень	70%	Контроль	Сигналізація	Світова
3	Калорифер	Температура теплоносія перед входом у камеру	$130 \pm 10^{\circ}\text{C}$	Контроль, регулювання	Показ, реєстрація, зміна	Дія на нагрів спіралі
4	Вентилятор	Швидкість подачі повітря	$25 \pm 2 \text{ м/с}$	Контроль	Показ, реєстрація	АРМ оператора
5		Тиск	$0,5 \pm 0,1 \text{ МПа}$	Контроль, регулювання	Показ, реєстрація, сигналізація	Дія на двигун насоса

10.3. Обґрунтування та вибір системи засобів автоматизації. Зважаючи на умови виробництва обираються сучасні засоби автоматизації, з похибкою не більше 1%, які можуть задовольнити потреби в надійності та швидкодії. Для зручності підключення та економії на модулях контролера відають перевагу датчикам з уніфікованим вхідним сигналом 4-20мА. Використовуються вихідні уніфіковані сигнали 0-10 В.

10.4. Опис схеми автоматизації. На функціональній схемі автоматизації передбачено наступні контури.

Регулювання температури в камері сушарки. Вимірюється з допомогою датчика Sitrans TF2 (1а) з уніфікованими вихідними сигналами 4-20 мА, який надходить на модуль аналогових входів контролера.

Контроль рівня в камері сушарки. Вимірюється з допомогою датчика Aplisens APR-2000 (2а) з уніфікованими вихідними сигналами 4-20 мА, який поступає на модуль аналогових входів контролера.

Регулювання температури в калорифері. Вимірюється з допомогою датчика Sitrans TF2 (3а) з уніфікованими вихідними сигналами 4-20 мА, який поступає на модуль аналогових входів контролера. Управляючий сигнал 0-10 В поступає на перетворювач електричного сигналу в пневматичний ЕПП-3211 (3б), який подається на клапан МИМ-3077 (3в).

Регулювання швидкості повітря. Вимірюється з допомогою датчика EE75 (4а) з уніфікованими вихідними сигналами 4-20 мА, який поступає на модуль аналогових входів контролера.

Регулювання тиску повітря в вентиляторі. Вимірюється з допомогою датчика тиску РС-28 (5а) з уніфікованими вихідними сигналами 4-20 мА, який поступає на модуль аналогових входів контролера. МПК програмно реалізує ПІ-регулятор і видає сигнал на модуль аналогових виходів. Управляючий сигнал 0-10 В поступає на частотний перетворювач ATV-58HD64N4 (5б).

10.5. Специфікація на засоби автоматизації.

Специфікація на засоби автоматизації

№ п/п	№ позиції за схемою	Найменування і технічна характеристика виробу	Тип, марка	Одиниця вимірювання	К-ть	Виробник
1	2	3	4	5	6	7
1	1а, 3а	Вимірювальний мікропроцесорний перетворювач температури з вбудованим платиновим термометром опору Pt100 в захистній трубці із нержавіючої сталі, показуючий з світловою сигналізацією. Вихідний сигнал 4-20 мА Вимірювальний діапазон температур -50...+200°С.	Sitrans TF2	Шт.	2	Siemens
2	2а	Гідростатичний рівнемір Глибина резервуарів до 6000 мм. Основна похибка 0,16%. Вихідний сигнал 4...20 мА + HART.	Aplisens APR-2000	Шт.	1	Aplisen
3	3б	Електропневмо перетворювач перетворює сигнал з 4-20 мА в 0,2-1 кгс/см ² . Тиск живлення 1,4 кгс/см ² .	ЕПП-3211	Шт.	2	ООО «Саранские приборы»
4	3в	Пневматичний виконавчий механізм 2-х позиційний для одноходових прохідних клапанів Ду – 50 мм. В комплект входить клапан 2х позиційний 3257.	МИМ-3077	Шт.	2	„Делис”
5	4а	Високоточний датчик для вимірювання швидкості повітря. Вимірювальний діапазон 0-40 м/с. Вихідний сигнал 4...20 мА	EE75	Шт.	1	E+E Elektronik
6	5а	Вимірювальний перетворювач тиску. Межі вимір. 0 – 1 МПа. Вихідний сигнал 4-20 мА.	РС-28	Шт.	1	Aplisen
7	5б	Частотний перетворювач для асинхронних двигунів змінного струму потужністю 0,37-75 кВт, діапазон вих. част. 0,1..500Гц	ATV-58HD64N 4	Шт.	1	Schneider Electric

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Буценко Л.М., Пирог Т.П. Біотехнологічні методи захисту рослин: підручник – К.: Видавництво Ліра-К, 2018. – 346 с.
2. Макрушин М.М., Макрушина Є.М., Петерсон Н.В., Мельников М.М. Фізіологія рослин: Підручник. – Вінниця: Нова Книга, 2006. – 416 с.
3. Яструб Т.О. Токсолого-гігієнічна оцінка регуляторів росту рослин на основі гіберелінів // Український журнал з проблем медицини праці. – 2016. – Т. 3, № 48. – С. 20 - 29.
4. Gibberellic acid. "PubChem" [Електронний ресурс] Режим доступу:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gibberellin#section=Top>.
5. Гіберелін: спектр застосування [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://novsad.com/?tag=%D0%B0%D0%B3%D1%80%D0%BE%D1%82%D0%B5%D1%85%D0%BD%D1%96%D0%BA%D0%B0&paged=9&lang=RU>.
6. Инструкция по применению «Гиббереллина» для обработки винограда. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://fermer.blog/bok/sad/vinograd/vyraschivanie-vinograda/uhod-za-vinogradom/opryskivanie-vinograda/4452-gibberellin-dlja-vinograd.html>.
7. Ковтун Т.І., Перепелиця Л.О. Застосування екологічно чистих рістрегулюючих речовин // Вісник ДААУ. Агроєкологія. – 2000. – Т. 1, № 2. – С. 84 - 89.
8. Копилов Є.П. Ґрунтові гриби як біотичний чинник впливу на рослини // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2012. –Т. 1, № 15-16. – С. 7 - 28.
- 9 Pirog T.P., Iutunskaja G.O., Leonova N.O., Beregova K.A., Shevchuk T.A. Microbial synthesis of phytohormones // Biotechnol. Acta. – 2018. – Vol. 11, № 1. – P. 5 – 24.
10. Patricia F Omojasola, Damola O. Adejoro. Submerged fermentation of orange albedo to produce gibberellic acid using *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus niger* // Jordan Journal of Biological Sciences. – 2018. – Vol. 11, № 2. – P. 187-194.

-
11. Corona A., Sa'ez D., Agosin E. Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions // Process Biochemistry. – 2005. – Vol. 1, № 40. – P. 2655-2658.
 12. Rangaswamy V. Improved production of gibberellic acid by *Fusarium moniliforme* // J. of Microbiol. Res. – 2012. – Vol. 2, № 3. – P. 51-56.
 13. Пат. № 186938, СРСР, МПК С12k, А01п. Способ получения гиббереллина. / Муромцев Г. С., Раковский Ю. С., Дубовая Л. П. Опубл. 15. 11. 1966.
 14. Пат. № 2084531, CNC12P27/00. Штам микромицета *Fusarium moniliforme* ВКПМ F-446 – продуцент фитогормонов гиббереллинов А₄, А₇/ Муромцев Г.С.; Краснопольская Л.М. – Опубл. 20.07.1997.
 15. Karov I.K., Mitrev S.K., Kostadinovska E.D. *Gibberella fujikuroi* (Sawada) wollenweber, the new parasitical fungus on rice in the republic of Macedonia // Proc. Nat. Sci. Matica. Srpska. Novi. Sad. – 2009. – Vol. 1, № 116. – P. 175 – 182.
 16. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
 17. Таксономічний статус *Gibberella fujikuroi*. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.speciesfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=613705>.
 18. Річний галузевий звіт «Садівництво та ягідництво в Україні – 2017». – К., 2018. – 17 с.
 19. Чайхалян М. Х. Инструкция по испытанию и применению гиббереллинов на виноградной лозе // Союзсельгостехника. – 1962.
 20. Starch and sucrose metabolism. *Fusarium graminearum*. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?fgr00500.
 21. Glycolysis / Gluconeogenesis. *Fusarium graminearum*. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?fgr00010.
 22. Terpenoid backbone biosynthesis. *Fusarium graminearum*. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?fgr009006

-
23. Diterpenoid biosynthesis. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00904.
24. Ткаленко Г.М., Готель С.В. Оптимізація параметрів глибинного культивування гриба роду *Trichoderma* // Захист і карантин рослин. – 2013. – Т. 1, № 59. – С. 311 – 318.
25. Промышленный ферментер BIORUS 1000L [Електронний ресурс] Режим доступу: [http://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-\(laboratornyie-i-promyishlennyye\)/promyishlennyij-fermenteryi-i-bioreaktoryi-\(rossiya-,biorus%C2%AE-\)/promyishlennyij-fermenter-biorus-1000l.html](http://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-(laboratornyie-i-promyishlennyye)/promyishlennyij-fermenteryi-i-bioreaktoryi-(rossiya-,biorus%C2%AE-)/promyishlennyij-fermenter-biorus-1000l.html).
26. Alles-reiniger. Інструкція з використання. – 1 с.
27. Методичні вказівки щодо застосування засобу "Полідез" з метою дезінфекції та передстерилізаційного очищення. – 18 с.
28. Методичні вказівки із застосування дезінфікуючого засобу з мийною властивістю "БіоЛонг" виробництва ТОВ "Інфокс", Україна. – 20 с.
29. Vandamme E. J. Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors. – London, 1989. – 439 p.
30. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 252с.
31. Данилов І. П. Апарати мікробіологічної промисловості: Навч. посібник. – Харків, 2008. – 272 с.
32. Фильтр-прессы камерные автоматические. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://ence.ch/ru/equipment/equipment_for_metallurgy/automatic_chamber_filter-press/.

33. *Опарін С.О., Смірнова О.С.* Конспект лекцій до розділу «Екстракція» з курсу “Процеси та апарати хімічних виробництв” для студентів III-IV курсів усіх спеціальностей. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2011. – 32 с.

34. *Попович Т.А., Вишнеvsька Л.В., Іванищук С.М.* Дослідження можливості очищення стічних вод від синтетичних поверхнво-активних речовин адсорбційним методом // Вестник ХНТУ. – 2014. – Т. 51, № 4. – С. 105 - 110.

35. *Гіріч Т.Ю., Єльцова Т.П., Рябік П.В.* Конспект лекцій з курсу "Основні процеси та апарати хімічної технології". Розділ “Кристалізація” для студентів усіх спеціальностей / Укл.: Т.Ю. Гіріч, Т.П. Єльцова, П.В. Рябік. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2010. – 26 с.

36. Процеси та апарати хімічних виробництв. Адсорбція і десорбція в системі газ (пара) – тверде тіло. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dl.sumdu.edu.ua/textbooks/22852/266167/index.html>.

37. *Чернишев В.М.* Конспект лекцій з дисципліни "Водовідведення промислових підприємств" для студентів спеціальності «Водопостачання і водовідведення» – Макіївка, 2009.

38. *Давидюк Ю. М.* Процеси, апарати та устаткування виробництв галузі: Конспект лекцій. – Чернівці, 2013. – Ч. II. Теплові процеси. – 128 с.

39. *Сидоров Ю. І., Чуєшов В. І.* та ін. Процеси і апарати хіміко-фармацевтичної промисловості. – Вінниця, 2010. – 816 с.

40. Фільтри сталіні емальовані під тиском (ДРУК-фільтри). [Електронний ресурс] Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/druk_filtr_ua.php.

41. *Погожих М. І., Потапов В. О., Пак А. О., Жеребкін М. В.* Енергоефективні технології та техніка сушіння харчової сировини :навч. посібник – Х. : ХДУХТ, 2016. – 234 с.

42. Сушарка з рідким ліжком СJM-5. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://minipress.ru/pharma/ukrainian/new-equipment-2019/dryers/>.

43. Ваги-дозатор (електронні ваги с функцією дозування) з одноканальним релейним каналом ВТА-60/3-7-1R. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://unipro.com.ua/ua/ваги-дозатор--електронні-ваги-с-функцією-дозування--з-одноканальним-релейним-каналом-вта-60-3-7-1r--нгз--3-кг--d-0-1-0-2-0-5-г-/>.

44. СІР-станція для ємкостей до 4000 літрів. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://bio-rus.ru/oborudovanie/mobilnyie-sip-mojki-i-sip-stanczii/mobilnaya-sip-mojka-biorus-1501.html>.

45. Масовий рідинний дозатор ДЖ-100. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://packtech.com.ua/uk/obladnannya/dozuvalne/dozatory-ridkykh-produktiv/dzhm-1>.

46. Фільтри для харчової промисловості. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/harchovi/filtri-dlya-harchovoyi-promislovosti.html>.

47. Повітрязабірник круглий. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://hit-kamin.com.ua/povitriazabirnik-kruglii-150>.

48. Фильтр воздушный кассетный грубой очистки. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://vozfilter.ru/kassetnyi-filtr-gruboy-ochistki/>.

49. SF и SF+ – безмасляные спиральные компрессоры. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.atlascopco.com/ru-ua/compressors/products/Air-compressor/oil-free-air-compressors/SF-and-SFplus-oil-free-scroll-compressors>.

50. Теплообменник WHE 2015. [Електронний ресурс] Режим доступу: http://paskal.ua/product/teploobmennik-whe_2015_16.html.

51. Ресивер AirCast PB500,11,00 з арматурою. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://27.ua/ua/shop/resiveraircast-rv500-11-00-s-armaturoy.html?gclid=EAIaIQobChMI6py4yLPW5QIVQrYYCh3i5gZKEAQYAuA BEgLKxvD_BwE.

52. Канальні нагрівачі Systemair: електричні і водяні. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.systemair-ukraine.com/ua/air-heaters.html>.

53. Фильтр сжатого воздуха ФПП-F5000-1. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://prom.ua/p1027881235-filtr-szhatogo-vozduha.html>.

54. Дозатор весовой мультиголовочный ВД-10. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://packtech.com.ua/oborudovanie/doziruyushchie/dozatory-sypuchih-produktov/vd-10>.

55. Ваговий дозатор зі шнеком ШД-8. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://packtech.com.ua/oborudovanie/doziruyushchie/dozatory-sypuchih-produktov/shd-8m10>.

56. Відцентровий насос з магнітною муфтою DM 10. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/nasosy_s_magnitnoj_muftoj/dm10/.

57. Емкости из нержавеющей стали от 30 до 20000 литров. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://stprom.com.ua/p15745045-emkosti-nerzhaveyuschej-stali.html>.

58. Фильтр Вонесо А501. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://med-magazin.ua/kharkov/item_n11677.htm.

59. Пилотные биореакторы. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/pilotnyie-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus%C2%AE/pilotnyie-bioreaktoryi.html>.

60. Промышленные биореакторы. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/promyishlennyie-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus%C2%AE/promyishlennyie-bioreaktoryi.html>.

61. Відцентровий насос з магнітною муфтою DM 06. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/nasosy_s_magnitnoj_muftoj/dm06/.

62. Дозатор весовой мультиголовочный ВД-10. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://packtech.com.ua/oborudovanie/doziruyushchie/dozatory-sypuchih-produktov/vd-10>.

-
63. Адсорбер. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.directindustry.com.ru/prod/bucher-unipektin-ag/product-89865-2188255.html>.
64. Испарительные кристаллизаторы. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.bma-worldwide.com/ru/kristallizacija/isparitelnye-vakuum-apparaty-periodicheskogo-deistvija.html>.
65. Теплообменник ONDA MPE 55/1. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://eurocool.dp.ua/p776796035-teploobmennik-onda-mpe.html?gclid=EAIaIQobChMIouncoLjM6AIVSYuyCh1MewJfEAYYASABEgLR_D_BwE.
66. Циркуляционный насос Grundfos 25-6-130 для системы отопления. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://rozetka.com.ua/70776230/p70776230/characteristics/>.
67. Промысловый вентилятор ВР 287-46 (ВЦ 14-46). [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.vent.com.ua/ventilyator-vr-287-46-vc-14-46-5-ehldv-11-1000/>.
68. Калориферы КПСк. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://zaotst.ru/kalorifery-kpsk.html>.
69. Циклон ЖЕТ JCDC-3. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://jet-ua.com/goods/wood_vityagki.
70. Стіл виробничий з нержавійки з бортом і полицею [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.enjoy-trade.com.ua/ua/stol-proizvodstvenij-iz-nerzavejki-s-bortom-i-polkoj-600-600-850>.
71. Утилизация. Тара и упаковка. Крамар Рисайклинг. [Электронный ресурс] Режим доступа: http://www.kramar.com.ua/util_915.html.
72. *Слюсаренко Т.П.* Лабораторний практикум по мікробіології пищевих производств. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984 – 208 с.

73. *Berrios J., Illanes A., Aroca G.* Spectrophotometric method for determining gibberellic acid in fermentation broths // *Biotechnol. Letters.* – 2004. – Vol. 1, № 26. – P. 67 – 70.

74. *Sharma R., Iyer J. P., Chakraborti A. K., Banerjee U. C.* Determination of gibberellins in fermentation broth produced by *Fusarium verticillioides* MTCC 156 by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2004. – Vol. 1, № 39. – P. 83 – 88.

75. *K. Kim, B. Choi, I. Lee, H. Lee, S. Kwon, K. Oh, A. Y. Kim.* Bioproduction of mushroom mycelium of *Agaricus bisporus* by commercial submerged fermentation for the production of meatanalogue // *J Sci Food Agric.* – 2011. – Vol. 1, № 91. – P. 1561 – 1568.

76 YSI 2900 Series Biochemistry Analyzers. Operations and Maintenance Manual, 2016. – 166 с.

77. *Перетятко Т. Б., Гудзь С. П.* Здатність сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 і *Desulfobacter* sp. використовувати нітрат як акцептор електронів // *Біологічні Студії.* – 2011. – Т. 5, № 2. – С. 51-60.

78. Влагомер сыпучих пиломатериалов ТК-100W. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://ozonet.com.ua/vologomir-sipuchih-pilomaterialiv-tk-100w?gclid=EAIaIQobChMI8O_ryoTP6AIVxrYYCh0qzg3oEAQYBSABEGKTePD_BwE.

79. Сушарка аеродинамічна. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ua.all.biz/uk/susharka-aerodynamichna-g8161970>.

80. *Ткаченко С.Й., Снівак О.Ю.* Сушильні процеси та установки. Навчальний посібник. - Вінниця: ВНТУ, 2007. - 76 с.

81. Р. № 3118909. Purification of gibberellins/ *Louis Roux.* – Patented. 21.01.1964.

ДОДАТКИ

Додаток 1

Основні першоджерела

Improved Production of Gibberellic Acid by *Fusarium moniliforme*

Vidhya Rangaswamy

Industrial Biotechnology Group, Reliance Life Sciences Pvt. Ltd.
vidhya_rangaswamy@relbio.com, vlrang@yahoo.com

Abstract Optimization studies for improvement in the yield of gibberellic acid production by *Fusarium moniliforme* in submerged and solid-state fermentation is the focus of this paper. In the current study, use of jatropha seed cake as substrate for solid-state fermentation resulted in an unprecedented gibberellic acid yield of 105 mg/g of moldy bran. A 2.5 fold increase in the titre resulting in 15 g gibberellic acid /L could also be obtained by optimization of physiological parameters in submerged fermentation. This is the first study reporting such high yield of gibberellic acid and presenting a commercially viable production process using cheap substrates.

Keywords Process Optimization, Submerged Fermentation, Solid-State Fermentation

1. Introduction

Gibberellic acid (GA₃), the most important gibberellin, is a class of diterpenoid that functions as plant growth regulator [1]. It affects stem elongation, elimination of dormancy, flowering, sex expression, enzyme induction and leaf and fruit senescence. GA₃ is a high valued industrially important biochemical with various applications in agriculture with price ranging around \$ 25/g in the international market[1-3].

GA₃ is presently produced largely by submerged fermentation techniques using *Fusarium moniliforme* or *Gibberella fujikuroi*[4]. Other bacteria that belong to the genus *Azotobacter* and *Azospirillum*[5] also synthesize GA₃. Recently, a *Pseudomonas* sp. isolated from wastes of processed olive has also been shown to produce GA₃ (285 mg/L)[6]. The factors that account for high cost of GA₃ in present market scenario are the low yield of GA₃ produced and its presence in dilute form in submerged fermentation; leading to higher costs of downstream processing and disposal of waste water.

GA₃ can also be produced by the solid-state fermentation (SSF), which has got a tremendous potential for production of secondary metabolites. There are many advantages that make the SSF process commercially viable such as greater yields, lower energy consumption, a lesser environmental impact of the process, and differential expression of metabolites. The yields obtained from SSF are decent enough to offset the higher costs of downstream processing, thereby lowering the cost of gibberellic acid

In the present study, optimization of production of GA₃ by SSF and submerged fermentation, using *Fusarium moniliforme* has been investigated. An economically viable process for commercial production of GA₃ is described.

2. Materials and Methods

2.1. Organism and Growth Conditions

Fusarium moniliforme NCIM 1100 was obtained from National Collection of Industrial Microorganisms, Pune, India. The strain was cultured and maintained on Potato dextrose agar (PDA) slants.

2.2. Submerged Fermentation

F. moniliforme culture was inoculated from the PDA slants into 250 ml of CD broth (composed of (g/L) sucrose, 30; NaNO₃, 3; K₂HPO₄, 1; MgSO₄·7H₂O, 0.5; KCl, 0.5 and FeSO₄, 0.01, pH 6.0) and incubated at 30°C for 10 days at 150 rpm. Cell growth was monitored every 24 h and GA₃ was estimated in the supernatant. All optimization experiments including effect of varying pH (5, 7 and 8) and temperature (23, 25, 30 and 37°C) were carried out in CD broth. Effect of carbon source was evaluated by replacing sucrose with either glucose, galactose, xylose, glacial acetic acid or methanol at a final concentration of 20 g/L in CD broth. All experiments were carried out at least in triplicates to ensure reproducibility.

to 10 days.

2.4. Analytical procedures

GA₃ was estimated spectrophotometrically by the method described by Berriso et al[7] at 254 nm. GA₃ was also detected by HPLC method at 206 nm on a C18 column using methanol: water (3:1) as the mobile phase at 1 ml/min flow rate[8]. The GA₃ elutes in 3 min under these conditions. Qualitative determination of GA₃ was done by TLC as described by Puchooa et al[9]. The GA₃ extracted from the fermentation was dissolved in ethanol and separated by TLC using isopropanol – ammonia - water (10:1:1, v/v/v) as mobile phase. The plates were sprayed with 3 % (v/v) H₂SO₄ in methanol containing 50 mg FeCl₃ and heated in oven at 80°C for 10 min. GAs fluoresce and appear as greenish spot under UV light.

2.5. Extraction of GA₃ from the SSF

Gibberellins were extracted from SSF by adding 100ml of distilled water to moldy bran in each flask. The mixture was kept on shaking incubator at 150 rpm for 2 h. The slurry from each flask was filtered through muslin cloth and the volume of the filtrate was made to 100 ml. Filtrate was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 28°C. Supernatant was collected and analyzed for GA₃ concentration spectrophotometrically. All experiments were performed in triplicate.

2.6. Purification of GA₃ from the SSF extract

Isolation of GA₃ from the SSF extract was done by the method described by Ergun et al[10]. Briefly, to 5 ml of extract, 60 ml of solvent consisting of methanol, chloroform, and 2 N ammonium hydroxide (12:5:3 v/v) and 25 ml of distilled water was added. The mixture was shaken well in a separating funnel. After removal of the bottom chloroform layer, the methanol in the upper aqueous layer was evaporated. The pH of the remaining solution was adjusted to 2.5 and extracted thrice with 15 ml of ethyl acetate per cycle. The ethyl acetate phase was collected and evaporated to dryness. The dried material was dissolved in 5 ml of ethanol and GA₃ was estimated.

3. Results and Discussion

The present study is aimed at improvising the production of the agriculturally important growth hormone, GA₃, using submerged and solid-state fermentation strategies.

3.2. Physiological optimization

It is known that physiological factors considerably influence the GA₃ production in submerged fermentation[3,6]. To improve the yield of GA₃ in the production medium, growth parameters including pH, temperature, incubation time and media were optimized.

3.2.1. Optimization of pH in Submerged Fermentation

Effect of initial pH of the medium on GA₃ production was investigated (Figure. 1A). It was noted that initial pH of the medium did not greatly influence the production of GA₃, although highest yield of 6.5 g/L was obtained on the 8th day when the initial pH was adjusted to 7.0. Similar profile was reported for GA₃ production in *Pseudomonas* wherein a maximum yield of 0.3 g/L was obtained at pH 7.0[6]. However, Borrow et al[11] reported that GA₃ production decreases when the pH was outside the range of 3.0-5.5 in a stirred culture. The growth of the fungi was however better at pH 8.0 (data not shown).

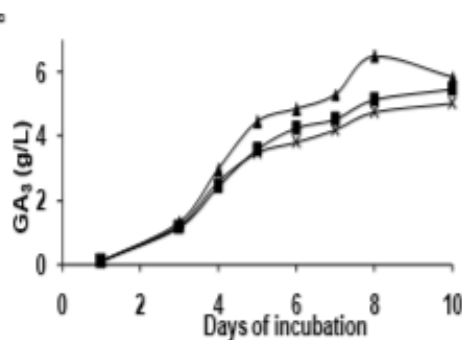


Figure 1A. Effect of pH on GA₃ production in submerged fermentation at pH 5 (■), pH 7 (▲) and pH 8 (×)

3.2.2. Optimization of Temperature in Submerged Fermentation

Role of temperature on growth of *F. moniliforme* and production of GA₃ was evaluated. Incubation at 30°C was optimum for GA₃ as the yield increased to 5.8 g/L which corroborates well with the production profile in published reports[1,6] (Figure. 1B). The growth was however better at 23 and 25°C as compared to 30°C indicating a distinct difference in conditions for growth and production of GA₃.

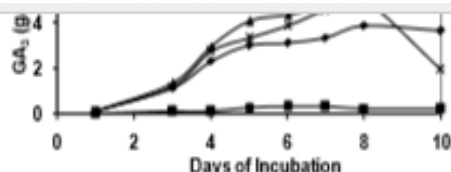


Figure 1B. Effect of temperature on GA₃ production by *F. moniliforme* in submerged fermentation at 23°C (•-•-), 25°C (•+•+), 30°C (•▲•▲) and 37°C (•◆•◆)

3.2.3. Optimization of Carbon Source in Submerged Fermentation

To determine the role of individual carbon source favoring high yields of GA₃ production, sucrose in the CD medium was replaced with glucose, galactose, xylose, glacial acetic acid or methanol at a final concentration of 20 g/L. Of all the carbon sources, sucrose was the best giving a yield of 15 g/L under optimized conditions. Glucose was found to be equally effective whereas all other carbon sources gave lower or no GA₃ production (Figure. 2) in 10 days. This is by far the highest yield reported through submerged fermentation.

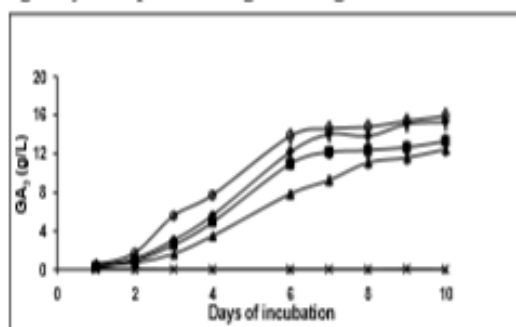


Figure 2. Effect of various carbon sources on GA₃ production in submerged fermentation by *Fusarium moniliforme*. Glucose (•+•+), Sucrose (•-•-), Galactose (•◆•◆), Xylose (•▲•▲), and Methanol (•X•X) were supplied as carbon sources for the fermentation. Glacial acetic acid did not support any growth

GA₃ levels reported in literature are significantly lower as reviewed by Kumar and Lonsane[12]. A recent study on morphological mutants of *G. fujikuroi* has reported only 0.7 g/L of GA₃[13]. Highest yield reported in the literature is 5 g/L by submerged fermentation[14] using a fed-batch cultivation mode under conditions of nitrogen limitation using genetically improved strains. The yields have been significantly lower in all other studies. Duran-Paramo et al[15] have reported a yield of 0.12 g/L whereas another report wherein dairy waste has been used as basal medium, a yield of 0.7 g/L was obtained. Eleazar et al[16] reported a yield of 2.862 g/L using immobilized *G. fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors.

using jatropha seed cake as a substrate. Jatropha seed cake is a readily available waste product from biodiesel plant wherein oil extracted from seeds of *Jatropha curcas* is transesterified into biodiesel. Jatropha seed cake is a relatively recalcitrant lignocellulosic substrate having a cellulose content of 15 % and lignin content of 30 %.

In the present report, jatropha seed cake was used as a substrate for SSF. Interestingly, an unprecedented yield of 105 mg GA₃/g of substrate was obtained by 4th day and remained constant thereafter (Figure. 3). This is so far the best reported yield of GA₃ obtained by SSF. This is the first report where the feasibility of using jatropha seed cake as a substrate for SSF has been investigated. The 5-fold improvement in the yield in our studies compared to that reported in the literature is unarguably contributed by the substrate jatropha seed cake. The seed cake may be providing the right combination of carbon and nitrogen to the fungus for production of GA₃. Several fungi are known to be cellulolytic in nature and most commonly used cellulases that have been used in biomass pretreatment process are from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*[17]. The GA₃ producer, *F. moniliforme* is also known to be cellulolytic in nature[18]. This attribute of the fungi may be enabling it to utilize the cellulosic sugars from the substrate more effectively thereby resulting in high yield of GA₃. Detailed analysis of the factor(s) responsible for promoting such high yields of GA₃ is warranted. The jatropha seed cake is a waste from the biomass industry is toxic due to the presence of phorbol esters and may need detoxification prior to being used as land feed or animal feed. However, they can be used 'as is' as substrate for production of this valuable phytohormone.

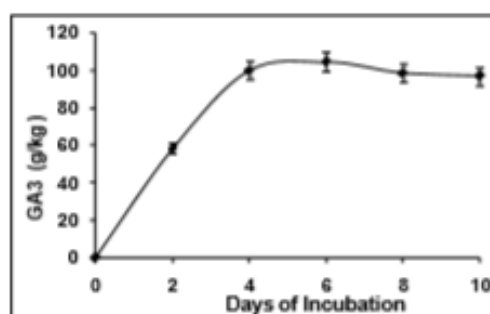


Figure 3. Solid-state fermentation for production of GA₃ using jatropha seed cake as substrate

Use of variety of substrates for SSF has been cited in the literature. Machado et al[19], have reported a yield of 0.925 mg of GA₃/g of biomass using coffee husk and, cassava bagasse as a medium substrate whereas, after 18 days of cultivation, Qian et al[20], reported a yield of 19.3 mg GA₃/g

Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions

Andrés Corona^a, Doris Sáez^b, Eduardo Agosin^{a,*}

^a Department of Chemical and Bioprocess Engineering, Pontificia Universidad Católica de Chile, Casilla 306, Correo 22, Santiago, Chile

^b Department of Electric Engineering, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Received 29 September 2003; received in revised form 15 October 2004; accepted 29 November 2004

Abstract

The evolution of water activity during solid-state cultivation of *Gibberella fujikuroi* was followed. A typical organic substrate, wheat bran and soluble starch, was used. Culture sorption isotherms were determined verifying that, as culture evolves, higher moisture contents were necessary to maintain the same water activity level. Optimal values for *Gibberella fujikuroi* growth and gibberellic acid production rates and yields were established, around a_w 0.99. A non-linear model, based on neural networks, is proposed to represent the sorption curves of the substrate during the fermentation process.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Gibberella fujikuroi*; Gibberellic acid; Neural network; Solid state fermentation; Water activity

1. Introduction

The filamentous fungus *Gibberella fujikuroi* is the main producer of gibberellins. These hormones are widely used to optimise growth in several products, particularly seedless grapes [1]. Among the gibberellins, the most important from an industrial perspective is gibberellic acid (GA₃), which can be produced by fermentation at relatively high concentrations [2].

Solid-state fermentation (SSF) has been traditionally employed to produce a broad range of microbial products [3]. SSF technology is not widely used, however, because of the need for accurate know-how and control of process variables that determine microbial growth and metabolite production ratios [4,5]. Also, given the complexity and heterogeneity of the solid medium, environmental parameters are not easily accessible and measurable [6].

In general, ad hoc SSF reactors have been developed and operational conditions are determined empirically for a specific product [7,8], while some other studies have attempted new ways to determine optimum culture

conditions in these complex media [9]. Besides, scale-up of the process requires accurate modelling [10–12]. Predictive modelling techniques, such as neural networks, are currently being used for obtaining those models [13, 14].

Several papers describe moisture content and water activity (a_w), for both SSF and submerged culture, as critical variables that limit microbial growth, metabolite production and product efficacy [15–17]. Moreover, the effect of a_w on metabolite production and growth can differ [18]. For example, in *Penicillium roqueforti* a_w is a critical variable for growth and spore production in SSF [19,20]. Some studies report that the optimum a_w for growth of *Trichoderma viride* ranges between 0.99 and 0.992, while spore production is maximised at a_w 0.98 [21,22]. On the other hand, optimum a_w for cyclopeptide production in *Metarhizium anisopliae* is 0.921, although variations according to media composition were observed [23].

In this work, humidity and water activity are studied to assess their importance, for both growth and GA₃ production, in *Gibberella fujikuroi* grown on wheat bran/starch solid culture medium. Non-linear modelling is used for determining the complex substrate sorption curves during the SSF process.

* Corresponding author. Fax: +56 2 6865803.

E-mail address: agosin@ing.puc.cl (E. Agosin).

2. Material and methods

2.1. Microorganism and growth

Gibberella fujikuroi ATCC 12616, an asporogenic and hyperproducing strain of gibberellic acid, was maintained at 4 °C and periodically subcultured on malt-yeast extract agar slant tubes at 28 °C.

A propagation medium consisted of 80 g/l anhydrous glucose, 0.45 g/l magnesium sulphate, 5 g/l KH_2PO_4 , 1.85 g/l NH_4NO_3 , and 10 ml/l salt solution (in g/l: 0.2 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.02 CoCl_2 , 0.02 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0.02 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and 0.6 EDTA). Two milliliter of homogenised hyphae were used to inoculate 50 ml of the propagation medium, and culture flasks were incubated on a shaker at 180 rpm, 30 °C, for 64 h.

For solid-state cultures, two laboratory systems were used: 10 g columns and scaled up 100 g columns. Small columns were prepared by mixing 8 g wheat bran and 2 g soluble starch on a dry basis [24]. The substrate was complemented with 0.5 ml linseed oil, 1.3 ml urea solution (2.5 g/l), and 3 ml of a 1:10 solution, containing 1.49 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.49 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.49 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 169 ml/l HCl. When 100 g columns were used, the mixture consisted of 80 g wheat bran, 20 g soluble starch (dry basis), 13 ml urea solution (2.5 g/l), 5 ml linseed oil and 15.7 ml of the 1:10 salt solution described above.

2.2. a_w Regulation

To obtain constant a_w levels, water–glycerol solutions were prepared to generate known and fixed relative humidity conditions. Concentrations were calculated according to UNIFAC [25].

2.3. Sorption curves

Sorption curves were obtained by gravimetric methods. A 10 g column system was used for this purpose [26]. Four cultures were run in duplicate, samples were harvested every 24 h. All samples were irradiated for 15 min using a Mineralight UVG-11 UV lamp (UV 254 nm), to eliminate fungal growth during the study. Samples were left overnight at 30 °C and then introduced in dessicators, containing defined a_w obtained by placing beakers with the water–glycerol solutions, described above. Samples were weighed every 12 h, until the weight remained constant. Constant weight indicates chemical equilibrium between relative humidity in the system and the sample, i.e. an equal a_w . Equilibrium was generally reached after three or four days.

The same protocol was employed to determine sorption curves from the pilot plant. For this purpose, samples were taken at 0, 50 and 120 h of cultivation. As described before, for each sampling point four values were obtained and a linear average and standard deviation was calculated.

2.4. Effect of a_w on fungal growth and GA_3 production

The effect of a_w on *Gibberella fujikuroi* growth was studied in malt-yeast Petri dish cultures. The initial a_w level was set using glycerol water solution, instead of pure water, for the preparation of the agar medium. The inoculated Petri dishes were introduced in sealed containers with controlled gaseous atmosphere, using the same glycerol–water solution, at 28 °C. Growth rate was determined by periodically linear measurements in three axes of the dish. Four samples were run for each condition.

For studying GA_3 generation at different a_w levels, three ranges (“high” 1–0.98, “medium” 0.98–0.96 and “low” 0.96–0.94) and three sampling times (24, 72 and 144 h) were used. A 100 g column system was set, where a_w range was indirectly controlled using humidity level as the manipulated variable. Humidity values were obtained using the sorption curves from the initial experiments. Every twelve hours, and in a sterile environment, columns were agitated, samples taken and a_w determined. Humidity level was adjusted by addition of the appropriate amount of water. GA_3 concentration was determined fluorometrically [27].

2.5. Data modelling

Sorption curves in complex substrates generally show non-linear behaviour; therefore, a single pattern to describe any curve for any culture could not be stated. Neural network models are universal approximators of non-linear functions and they are being used for modelling non-linear biotechnology processes [28]. In this work, they were used for fitting the sorption curves of substrate–microorganism complexes during the fermentation process of *Gibberella fujikuroi*. The artificial neural networks were implemented using MATLAB® software.

Humidity was represented as a non-linear function of a_w and time. Fifty-four experimental data were used to adjust the neural network parameters. A neural network with five hidden neurons was chosen after structural optimisation. A hyperbolic tangent sigmoid transfer function is used at the hidden layer and a linear transfer function for the output layer. The neural net model obtained, is described in Fig. 1, where w_{ij} is the weight from i th input to j th hidden neuron, b_j the bias of j th hidden neuron, v_j the weight from j th hidden neuron to the output neuron and b_o is the bias of the

3. Results and discussion

3.1. Laboratory and pilot plant results

Laboratory level sorption results of *Gibberella fujikuroi* fermented samples show that water availability strongly decreases as the process advances, reaching a constant level after 144 h (Fig. 2). Therefore, as the microorganism grows on the culture medium, an increasingly higher humidity of the substrate is required to achieve a similar a_w . The standard deviation of each sampling data (four experimental values each) is negligible.

Results for *Gibberella fujikuroi* growth rates at different a_w levels are indicated in Fig. 3. Minimal a_w values that support growth was approximately 0.9. Growth rate increased continuously until a_w 0.995, and then decreases slowly. Optimum growth for *Gibberella fujikuroi* was obtained between a_w 0.985 and a_w 0.995.

GA₃ production yields are also very sensitive to water activity levels (Fig. 4). For “high” a_w levels (1 to 0.98), maximum GA₃ production yield was obtained; almost no GA₃ production was found for “low” a_w levels (0.96–0.94) (data not shown).

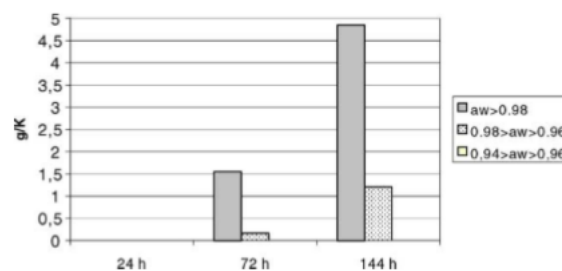


Fig. 4. GA₃ production yield (g/kg dry basis) during solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* ATCC 12616 at different a_w levels.

3.2. Sorption curve modelling

The non-linearity of experimental points was clearly shown in Fig. 1. The neural network fitting is shown in Fig. 5. Using Eq. (2), the mean error calculated for the model was 0.0114%.

Table 1 shows the parameters of the selected neural net. This table can be used to reproduce the behaviour of the sorption curves according to the neural network modelling previously defined.

Активация Windows
Чтобы активировать Wind
раздел "Параметры".

Submerged Fermentation of Orange Albedo to Produce Gibberellic Acid Using *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus niger*

Patricia F. Omojasola* and Damola O. Adejoro

Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, University of Ilorin, P.M.B. 1515, Ilorin, Kwara State, Nigeria.

Received October 7, 2017; Revised November 11, 2017; Accepted November 17, 2017

Abstract

This study investigated the potential of orange albedo, an agro-industrial waste, as a suitable substrate for the production of gibberellic acid (GA) through submerged fermentation using *Fusarium moniliforme* ATCC 10052 and *Aspergillus niger* CBS 513.88 due to the high cost of synthetic and plant-extracted GA. The orange fruits were washed and the albedo removed. The albedo was dried, ground, and its proximate composition was determined. The ground orange albedo was incorporated into a modified CzapekDox medium and was fermented using the test fungi. Carboxymethyl cellulose (CMC) served as control. Fermentation conditions were: pH 5.5; inoculum size, 1 mL (5×10^7 CFU/mL *F. moniliforme*) (2×10^7 CFU/mL *A. niger*); substrate concentration 2 g; temperature 25 ± 2 °C for seven days. Fermentation was optimized by supplementation with copper sulphate and variation of fermentation conditions. Results of proximate analysis were: moisture 7.46%; crude protein 4.69%; lipids 0.62%; ash 2.41%; crude fibre 27.67%; and carbohydrate 57.15%. GA yield by *F. moniliforme* and *A. niger* on the orange albedo substrate was 5.53 g/L and 6.33 g/L respectively. This increased to 9.39 g/L by *F. moniliforme* and 7.42 g/L by *A. niger* after optimization. These results support the suitability of orange albedo as a promising cheap substrate production of GA.

Keywords: Orange albedo, gibberellic acid, fermentation, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, fruit waste

1. Introduction

Gibberellins are isoprenoid phytohormones which play important roles in early germination processes of plants by activating enzyme production and mobilizing storage reserves (Rademacher, 2016). Gibberellic acid (GA) is one of the most important members of the gibberellins due to its industrial and agricultural applications (Rodrigues *et al.*, 2009). Over 120 members of this group of phytohormones have been identified and structurally characterized using chemical and spectroscopic methods (Macmillan, 2002). Among the gibberellins, the ones that have been reported as bioactive are GA₁, GA₃, GA₄, and GA₇. The biologically-inactive gibberellins occur in plants as precursors for the synthesis of the bioactive ones (Yamaguchi, 2008). Gibberellic acid (gibberellin A, or GA₃) is one of the most important members of the bioactive gibberellins due to its industrial and agricultural applications (Ates *et al.*, 2006).

Gibberellic and abscisic acids are endogenous growth-regulating hormones which control the breaking of seed dormancy to germination alongside other factors such as light, temperature, moisture, and nutrients (Gupta and Chakrabarty, 2013). While GA stimulates seed

germination, abscisic acid on the other hand, is concerned with the establishment and maintenance of dormancy. GA has been used extensively for the promotion of crop yields, resistance to pest, alleviation of plant stress, reduction in fruit spoilage and the reduction in flowering times of ornamental plants (Bazani *et al.*, 2013; Akter *et al.*, 2014; Alrashdi *et al.*, 2017; Alvarenga *et al.*, 2017). However, its high cost has restricted its application to the growth-promotion of plants with high economic values. While GA can be isolated from some tissues in plants, it is a difficult process often marked by poor yields which may be as low as 38 mg/tonne of plant tissue (Mander, 2003). In a similar manner, the production of gibberellins through chemical synthesis is very complicated and unprofitable for industrial applications (Rademacher, 2016). Research has been geared to finding wider GA applications in agriculture and plant biotechnology (Shukla *et al.*, 2005; Da Silva *et al.*, 2013). Hence, there is a need to utilize cheap substrates for the production of GA.

Oranges (*Citrus sinensis*) are grown in more than 125 countries, and the worldwide production for 2016/17 was estimated at 50.2 million tonnes (USDA, 2017). Apart from fruit-processing industries, oranges are also consumed for their fleshy fruit and juice, after which the peel and albedo are discarded into the environment. Citrus

peel waste comprises about 50% of the fresh weight of the fruit (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2011). The orange-juice processing industries produce significant volumes of wastes made up of soluble and insoluble carbohydrates (Zhou *et al.*, 2011). The disposal of fruit wastes poses considerable environmental and economic problems (Bezalwar *et al.*, 2013). However, the utilization of these wastes for fermentation purposes will not only reduce their potentially deleterious effects on the environment, but will also serve as cheap carbon sources for the industrial production of value-added products (Rivas *et al.*, 2008; Torrado *et al.*, 2011; Omojasola and Benu, 2016).

Industrially, GA is produced largely by a submerged fermentation technique using *Gibberella fujikuroi* (renamed *Fusarium fujikuroi*), the perfect stage of *Fusarium moniliforme* (Bruckner and Blechschmidt, 1991; O'Donnell *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2003). Other methods of GA production, which include the chemical synthesis and extraction from plants, are not economically feasible (Sleem, 2013). While solid-state fermentation has been reported to have a potential for higher yields, lower energy consumption, reduced risk of bacterial contamination, lower catabolic repression, and lesser environmental impacts (Viniestra-González *et al.*, 2003; Torrado *et al.*, 2011; Rangaswamy, 2012; Zhang *et al.*, 2015), however, it is difficult to monitor the fermentation parameters such as pH, inoculum concentration, nutrient composition, dissolved oxygen composition and fermentation time, and to optimize them using solid-state fermentation (Kumar *et al.*, 2011). In addition, submerged fermentation allows an easier purification of the product (Subramaniam and Vimala, 2012). Some other microorganisms that have been found to produce GA include: *Aspergillus niger*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. (Rademacher, 1994; Cihangir, 2002; Ates *et al.*, 2006; Karacoç and Aksöz, 2006; Ambawade and Pathade, 2015). A variety of agro and fruit wastes have been utilized in the production of organic acids using submerged and solid-state fermentation such as pineapple peel, sugarcane bagasse, banana peel to produce citric acid (Kareem and Rahman, 2013; Omojasola *et al.*, 2014), cashew apple juice and corn cob to produce oxalic acid (Betiku *et al.*, 2016; Mai *et al.*, 2016), *Jatropha* seedcake, sweet potato peel to produce itaconic acid (El Imam *et al.*, 2013; Omojasola and Adeniran, 2014) Shea nut shell, citric pulp, soy bran, soy husk, cassava bagasse and coffee husk to produce GA (Rodrigues *et al.*, 2009; Kobomoje *et al.*, 2013).

To our knowledge, there is a dearth of data on the suitability of orange peel wastes for the production of GA. Hence, the primary aim of the current work was to study the suitability of orange albedo as a substrate for the production of GA by *F. moniliforme* and *A. niger*.

2. Materials and Methods

Ilorin, with voucher specimen number UILH/001/996. The microorganisms used for the fermentation were *Fusarium moniliforme* ATCC 10052 and *Aspergillus niger* CBS 513.88 obtained from the Microbial Culture Collection of the Department of Microbiology at the University of Ilorin in Nigeria. They were maintained on PDA slants at 4 °C to be used later.

2.2. Substrate Preparation

The orange fruits were washed with clean water to remove dirt, after which they were peeled, taking care while separating the peel from the albedo. The albedo was then air-dried for seven days. It was thereafter ground into fine particles (1 mm particle size) by an electric blender (Binatone BLG 699). Then it was stored in a cool and dry place to avoid moisture uptake (Nandini *et al.*, 2014).

2.3. Proximate Analysis

The proximate analysis of the substrate was carried out using standard procedures. The parameters investigated were moisture content (Bradley, 2010), lipid, crude fibre, ash, crude protein and carbohydrate contents (AOAC, 1990, 2002).

2.4. Spore Suspension

Fungal spore inoculum was produced by washing spores of a fully-sporulated (7-day old) Potato Dextrose Agar (Difco) slant of each test fungus with 10 mL of sterile distilled water in sterile 250 ml Erlenmeyer flasks. The flasks were then agitated at 150 rpm for thirty minutes for uniform dispersal of spores (Omojasola and Benu, 2016) and adjusted approximately to 5.0×10^7 CFU/mL and 2.0×10^7 CFU/mL for *F. moniliforme* and *A. niger* respectively. The size of the inoculum was determined by counting using the improved Neubauer haemocytometer.

2.5. Fermentation Media

The fermentation medium was a modified CzapekDox broth using the method of Rangaswamy (2012) with replacement of sucrose with orange albedo substrate. The fermentation medium was compounded by adding 2 g of substrate to 100 mL of mineral salts medium. The composition of the mineral salts in 1 litre of water was NaNO₃ (3g), K₂HPO₄ (1g), MgSO₄·7H₂O (0.5g), KCl (0.5g), and FeSO₄ (0.01g). The fermentation medium was sterilized by autoclaving at 121 °C before use.

2.6. Submerged Fermentation

The test organisms were drawn separately from the spore suspension, and each was inoculated into 100 mL of sterile fermenting medium. The fermentation was carried out at 25±2 °C on a rotary shaker (LH Fermentation, Model Mk V orbital shaker) at 150 rpm for seven days. The final pH was adjusted using 2M NaOH or 1M HCl. The GA production was monitored every twenty-four hours.

2.6.1. Optimization of GA Production

The optimization experiments were conducted using

activities of both *F. moniliforme* and *A. niger*, especially with respect to the production of GA.

After the optimization experiment, the peak production of GA by *F. moniliforme* and *A. niger*, was observed on day six of the fermentation (Table 4). This is in tandem with Meleigy and Khalaf (2009) and Omojasola and Benu (2016) who reported GA production by *F. moniliforme* and *A. niger* respectively to be optimum on day six of the fermentation. In contrast to the pre-optimized fermentations, *F. moniliforme* showed higher productivity. Generally, the optimization of fermentation conditions provided significantly ($p < 0.05$) higher yields compared to pre-optimization. The optimized yields obtained on OA by *F. moniliforme* and *A. niger* were 9.39 g/L and 7.42 g/L respectively; corresponding to a 69.8% and 17.78% increase respectively. These results are consistent favorably with those of Ates *et al.* (2006) who reported GA yields 13.0 mg/100 mL and 16.0 mg/100 mL by *G. fujikuroi* and *A. niger* respectively, which increased to 17.5 mg/100 mL and 20.5 mg/100 mL respectively after the optimization using silicone oil. The % GA recovery from the fermentation medium was 5.6% equating 56.0 mg of GA per g of OA substrate fermented.

5. Conclusion

The production of GA through submerged fermentation of OA by *Fusarium moniliforme* ATCC 10052 and *Aspergillus niger* CBS 513.88 is described in this study. The results indicate that orange albedo (OA) is a cheap and readily available substrate for the production of GA. Yields of GA produced by *F. moniliforme* and *A. niger* were 9.39 g/L and 7.42 g/L respectively. However, in the optimization experiments, yields of 15.97 g/L and 10.74 g/L were produced by *F. moniliforme* and *A. niger*

acid by *Gibberella fujikuroi* and *Aspergillus niger* (Musa spp). *Int J Sci Res*, **4(7)**: 394 – 398.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15thed.). Arlington, Virginia.

AOAC. 2002. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (17thed.) Volume I and II. Maryland.

Arakaki AH, Vandenberghe LP, Soccol VT, Masaki R, Filho EF, Gregório A and Soccol CR. 2011. Optimization of biomass production with copper bioaccumulation by yeasts in submerged fermentation. *Braz Arch Biol Technol*, **54(5)**: 1027-1034.

Ates S, Ozenir S and Gökdere M. 2006. Effect of silicone oil on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* and *Aspergillus niger*. *Appl Biochem Microbiol*, **42(5)**: 500–501.

Barani M, Akbari N and Ahmadi H. 2013. The effect of gibberellic acid (GA₃) on seed size and sprouting of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Afr J Agric Res*, **8(29)**: 3898-3903.

Berrios J, Illanes A and Aroca G. 2004. Spectrophotometric method for determining gibberellic acid in fermentation broths. *Biotechnol Lett*, **26(1)**: 67 – 70.

Betiku E, Emeko HA and Solomon BO. 2016. Fermentation parameter optimization of microbial oxalic acid production from cashew apple juice. *Helvion*, **2(2)**:e00082.

Bezalwar P, Ashok VG, Harshal MS and Pranita AG. 2013. Production and optimization of citric acid by *Aspergillus niger* using fruit pulp waste. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, **2(10)**: 347-352.

Bilkay IS, Karakoc S, Aksoz N. 2010. Indole-3-acetic acid and gibberellic acid production in *Aspergillus niger*. *Turk J Biol*, **34**: 313-318.

Borrow A, Brown S, Jefferys EG, Kessell RHJ, Lloyd EC, Lloyd PB, Rothwell A, Rothwell B and Swait JC. 1964. The effect of varied temperature on the kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Can J Microbiol*, **10**: 445 – 466.

А. И. Дерендовская,
Н. Д. Парстнев,
Г. И. Николаеску,
Д. П. Михов,
С. А. Секриеру

Государственный аграрный университет Молдовы,
Республика Молдова

А. В. Штирбу
Национальный научный центр «ИВиВ им. В. Е. Ташрова»,

С. В. Кара
Комратский Государственный Университет,
Республика Молдова

ПРИМЕНЕНИЕ ГИББЕРЕЛЛИНА В ТЕХНОЛОГИИ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ СТОЛОВЫХ БЕССЕМЯНЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА

Исследование было проведено в центральной и южной зонах виноградарства Республики Молдова для оценки влияния биологически активных веществ на продуктивность и качество лозы винограда. Мы установили, что для сортов винограда без косточек оптимальная концентрация гиббереллина в фазе постплодоотворения (через 3-5 дней после цветения) является ГК-100 мг/л. Продуктивность виноградников возрастает на 10,1-92,3 %, зависит от биологических особенностей сорта винограда, концентрации регуляторов роста и условий их применения.

Ключевые слова: гиббереллин, продуктивность, таблица бессемянных сортов винограда.

В мировой практике сельского хозяйства, в том числе и виноградарства, на современном этапе её развития широко применяются регуляторы роста - физиологически активные соединения природного или синтетического происхождения, способные в малых дозах вызывать различные изменения в процессах роста и развития растений. Многие экзогенные регуляторы роста являются аналогами фитогормонов. С их помощью можно вмешиваться во многие процессы жизнедеятельности растений: регулировать процессы цветения, плодообразования и созревания, создавать бессемянные (партиенокарпические) плоды, тормозить (или стимулировать) рост стеблей, ускорять прорастание семян, клубней, стимулировать корнеобразование черенков и др. (Чайлахян и др., 1980; Манянков, 1981; Шерер, Гаднев, 1991; Перстнев и др., 2002).

Применение регуляторов роста в технологии производства столовых сортов винограда производится с целью: значительного увеличения размеров и массы гроздей и ягод винограда и повышения урожайности насаждений, улучшения процесса сахаронакопления в ягодах винограда и ускорения их созревания; изменения структуры грозди (сделать ее более плотной или рыхлой) и формы ягод; получения бессемянных ягод у облигатно семенных сортов винограда, улучшения внешнего вида гроздей и ягод и повышения их товарных качеств и др. (Смирнов и др., 1987; Батукаев и др., 1996; Казахмадов, 1997; Агафонов, 2007; Дерендовская и др., 2009, 2010).

В практике виноградарства на плодоносящих виноградных насаждениях столовых сортов используют следующие биологически активные вещества (БАВ): гиббереллин (ГК), гибберсиб (смесь ГК3+ГК7+ ГК11), α -НУК (α -нафтилуксусная кислота), смеси ГК3 + α -НУК и др., в основном, на сортах бессемянных, с функционально-женским типом цветка и на семенных, склонных к горошению ягод (Перстнев и др., 2002).

Исследования по применению гиббереллина на столовых сортах винограда начаты в начале 60-х годов прошлого столетия и проводятся в США, Японии, Италии, Болгарии, а также в странах СНГ - Украине, Армении, России, Узбекистане. В Республике Молдова (РМ) исследования по регулированию величины и качества урожая столовых сортов винограда с помощью БАВ начато в 90-х годах С. Каббани (2002) на столовых сортах винограда, склонных к горошению: Коарне нагрэ, Мускат гамбургский. Исследования по применению регуляторов роста в технологии возделывания столовых сортов винограда продолжены в рамках проекта «Optimizarea productivității și calității recoltei soiurilor de struguri pentru masă în baza aplicării bioregulatorilor de creștere» (2007-2010 гг.) коллективами кафедр виноградарства, биологии растений ГАУМ.

Изучено влияние ГК, α -НУК, смесей ГК + α -НУК и др. на рост гроздей и ягод у бессемянных

кустов возрастает в 1,3 раза. Повышается массовая концентрация сахаров и снижается уровень титруемой кислотности (рис. 2, *з*).

Мечта – столовый бессемянный сорт винограда, среднепозднего периода созревания. Выведен в Одесском сельскохозяйственном институте. Под действием ГК масса грозди увеличивается в 1,2 раза, масса 100 ягод – в 1,3 раза. Возрастает прочность ягод на раздавливание. Ягоды приобретают удлинненно-овальную форму. Урожайность кустов увеличивается в 1,3 раза. Обработка соцветий ГК способствует удлинению периода сахаронакопления (на 2-4 дня) (рис. 2, *д*).

Заключение: Реакция столовых бессемянных сортов винограда на обработку регуляторами роста зависит от их биологических особенностей, доз препарата и сроков применения. Применение гиббереллина в технологии возделывания столовых бессемянных сортов винограда позволяет повысить качество урожая (увеличить массу грозди, массу ягод в грозди) и продуктивность кустов. Наблюдается изменение показателей строения грозди и сложения ягод. Оптимальной концентрацией препарата является ГК-100 мг/л, урожайность кустов возрастает на 42,0-92,3%.

Рекомендации производству: а) обработку соцветий бессемянных сортов винограда ГК следует проводить на этапе постоплодотворения (3-5 дни после цветения); б) использовать концентрацию ГК-100 мг/л; в) обрабатывать соцветия следует локально, не затрагивая вегетативную часть растений.

Литература

1. Агафонов А. Х. Обработка регуляторами роста перспективных семенных сортов для получения бессемянных ягод винограда / А. Х. Агафонов, Р. Э. Казахмедов // Виноделие и виноградарство. – 2007. - № 3. - С. 38-39.
2. Батукаев А. А. Реакция семенных сортов винограда различных эколого-географических групп на применение гиббереллина / А. А. Батукаева. - Москва: Изд-во МСХА, 1996. - 139с.
3. Реакция столовых сортов винограда на обработку соцветий гиббереллином / А. И. Дерендовская, Г. И. Николаеску, А. В. Штирбу [и др.] // În: Știința agricolă, UASM, Chișinău, 2010. - nr. 2. - p. 12-16.
4. Влияние гиббереллина на продуктивность и качество ягод бессемянных и семенных сортов винограда / А. И. Дерендовская, Г. И. Николаеску, А. В. Штирбу [и др.] // Регуляция роста, развития и продуктивности растений. - Минск, 2009. - С. 43.
5. Каббани С. Регулирование величины и качества урожая столовых сортов винограда с помощью биологически активных веществ: диссертация на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук. - Кишинев, 2001, 139с.
6. Казахмедов Р. Э. Биологические основы формирования бессемянных ягод у семенных сортов винограда и способы их получения с использованием регуляторов роста / Р. Э. Казахмедов. - Москва: МСХА, 1996. - 140 с.



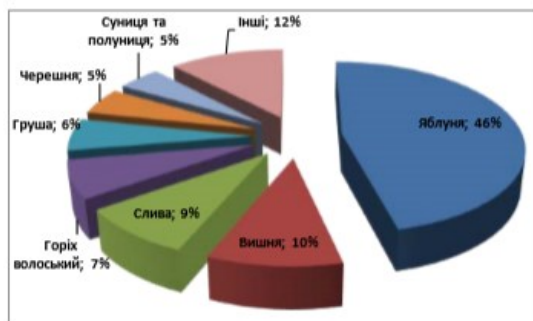
**РІЧНИЙ ГАЛУЗЕВИЙ ЗВІТ
«САДІВНИЦТВО ТА ЯГІДНИЦТВО
В УКРАЇНІ – 2017»**

КИЇВ

компанія»), а також Інститут зрошуваного садівництва і Мелітопольська дослідна станція садівництва. Тобто, за минулий рік в Україні стало майже на 100 менше офіційно дозволених сортів плодово-ягідних культур.

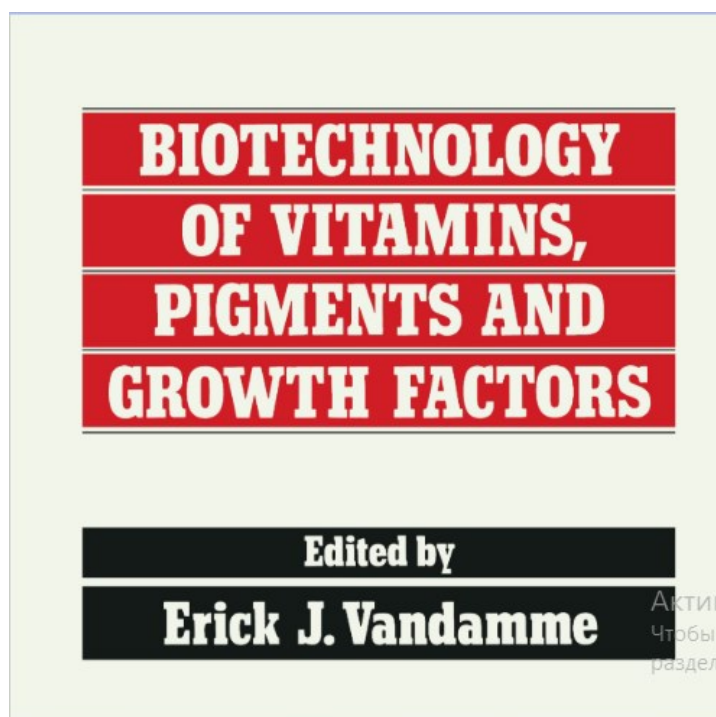
Загальні площі під плодовими та ягідними культурами у плодоносному віці, за нашими оцінками, сягають близько 200 тис. га. В цілому, якщо дивитись на динаміку по роках, фіксується їх стабільне скорочення. Більшість площ багаторічних насаджень знаходиться під зернятковими культурами, які у минулому році займали площу у 105 тис. га. Кісточкові культури приносили урожай на 61 тис. га, ягоди вирощувались на 22 тис. га, а горіхи – на 14 тис. га.

Структура площ плодово-ягідних насаджень у плодоносному віці за 2017 рік



Джерело: Державна служба статистики України, Асоціація «Укрсадпром»

Середня врожайність плодів і ягід в Україні в усіх категоріях



Therefore, subsequent purification processes with buffer-ethyl acetate systems proved to be necessary.

Another possibility for fermentation recovery is the application of ion-exchange resins. A patent filed by the Société d'Etudes et d'Applications Biochimiques (Brit. Patent 936 548) describes the isolation of the gibberellins and their purification by means of ion-exchange resins. The pre-treatment of the culture filtrate is carried out by additive of alkaline-earth metal hydroxides (e.g. $\text{Ba}(\text{OH})_2$). This treatment effects the precipitation of impurities such as organic acids, proteins, pigments and others. Moreover, the volume of the resins needed for the ion-exchange processes is reduced to a half or to a fifth of the original amount without pre-treatment (FRG Patent 1 288 044). After a further purification on a weak cation-exchange resin (e.g. Amberlite IRC 50, H. form) the culture filtrate passes a column of a weak anion-exchange resin (e.g. Amberlite IR 4 B, acetate or formate form). Also the use of strongly alkaline resins (e.g. Amberlite IRA 401, Dowex 1 \times 2, chloride form) is described.

The gibberellins are eluted from the resins by slow percolation with 1 N ammonia or with buffered alkaline solutions of ammonia salts (e.g. ammonium diphosphate). Also the elution is possible with methanol acidified with H_2SO_4 or HCl (Jefferys, 1970).

The first fractions of the ammoniacal eluate obtained are sufficiently pure to make possible the direct production of raw crystals by mere extraction of the gibberellins from those fractions of the eluate with ethyl acetate and concentration of the extract, without recourse to other purifying steps (US Patent 3 118 909). The obtaining of such fractions represents a characteristic feature and an important advantage of the extraction of gibberellins from a culture broth by means of weak anion-exchange resins. Therefore, in commercial processes employing this method it suffices to segregate these fractions to produce crystallized gibberellins. The raw crystals prepared in such a manner contained about 77% gibberellins. The extraction efficiency achieved with this method was near to 100%.

The further purification of these raw products is possible by a second purification step. It is carried out by the adsorption of the products obtained in the first stage onto active carbon and the desorption of the gibberellins by means of a solvent such as ethyl acetate. Evaporation, crystallization of the gibberellins in pure ethyl acetate, and subsequent washing and drying resulted in crystals with a purity of the order of 95% (US Patent 3 118 909).

АКТИВ
Чтобы
раздел

United States Patent Office

3,118,909

Patented Jan. 21, 1964

1

3,118,909

PURIFICATION OF GIBBERELLINS

Louis Roux, Le Mesnil-Saint-Denis, Seine-et-Oise, France, assignor to Societe d'Etudes et d'Applications Biochimique, Jouy-en-Josas, France, a French company
 No Drawing. Filed Nov. 14, 1961, Ser. No. 152,166
 Claims priority, application France Nov. 17, 1960
 8 Claims. (Cl. 260-343.3)

The present invention relates to the purification of gibberellins, and provides a process which produces crystallized gibberellins of a purity of the order of 95%. The word "purity" is here used to mean not that the product is necessarily composed of a single chemical species, but rather that it contains by weight in the stated percentage substances belonging to the class of gibberellins, and of which the quantities present can be determined by chemical methods and also by the measure of their biological activity. Percentage figures on gibberellin content or purity hereinafter given are to be understood in this sense.

The process of the invention comprises two stages. The first produces raw crystals which may contain from 70% to 85% of gibberellins, and the second comprises the purification of these raw crystals to a purity of the order of 95%.

First stage.—The first stage comprises, broadly speaking, two methods for the production of the raw crystals. The first of these is based on the fact that upon percolation of ammonia liquor through a column of weak anion exchange resin charged with gibberellins from a culture broth, the first fractions of the ammoniacal eluate obtained are sufficiently pure to make possible the direct production of raw crystals by mere extraction of the gibberellins from those fractions of the eluate with ethyl acetate and concentration of the extract, without recourse to other purifying steps.

These first fractions, eluted from a column of resin onto which the gibberellins have been adsorbed from a culture broth, are thus useable for the production of the raw crystals of stage one of the invention. These frac-

the purification of these raw crystals to a purity of the order of 95%.

First stage.—The first stage comprises, broadly speaking, two methods for the production of the raw crystals. The first of these is based on the fact that upon percolation of ammonia liquor through a column of weak anion exchange resin charged with gibberellins from a culture broth, the first fractions of the ammoniacal eluate obtained are sufficiently pure to make possible the direct production of raw crystals by mere extraction of the gibberellins from those fractions of the eluate with ethyl acetate and concentration of the extract, without recourse to other purifying steps.

These first fractions, eluted from a column of resin onto which the gibberellins have been adsorbed from a culture broth, are thus useable for the production of the raw crystals of stage one of the invention. These fractions, having a pH between 5 and 8, comprise about one-half of the total gibberellins in the column.

The novelty of the process does not reside in the use of ethyl acetate, or of any other solvent immiscible in water, for the use of such solvents has been known since the first work on gibberellins. Rather it resides in the simplification resulting from operation on relatively pure fractions.

The obtaining of such fractions represents a characteristic feature and an important advantage of the extraction of gibberellins from a culture broth by means of weak anion exchange resin.

In industrial operations employing this method of extracting gibberellins from the culture broth it therefore suffices to segregate these fractions to produce crystallized gibberellins.

The second method for deriving the raw crystals of the first stage of the invention starts with the later, impure fractions of the ammoniacal eluate above referred to, or with the product residues of other processes for gibberellin manufacture, or with the mother liquors of gibberellin crystallization, or with solvents which have been used in washing gibberellin crystals, or with impure gibberellins containing extracts obtained by other methods of gibberellin production, such as for example concentrates in acetone of gibberellins derived from adsorption onto activated carbon. The second method for deriving the raw crystals of the first stage of the invention requires however that these fractions be subjected to a preliminary purification. This preliminary purification comprises a chromatographic purification on a weak anion exchange

2

resin, for example of the type IR-4B. This pre-purification process may include the following steps:

(1) Dilution of the solution of impure fractions in about ten times its own volume of ordinary water.

(2) Acidification of the diluted solution by removal of cations upon passage through a column of weak cation exchange resin, for example of the type IRC50, form H, if the starting material for the pre-purification process comprises an eluate rich in cations such as the impure fractions of the ammoniacal eluate above mentioned. If instead the solution contains few cations, in the case for example of starting materials such as acetic eluates or product residues of gibberellin manufacture, the acidification may be effected simply by addition of a little hydrochloric acid to bring the pH down to 4.5.

(3) Fixing the gibberellins onto a column of weak anion exchange resin, for example of type IR-4B employed as its formate, by percolation of the diluted solution there-through at the rate of one milliliter of resin for about 80 milligrams of gibberellins.

(4) Elution of the gibberellins from the resin by percolation of ammonia therethrough, the percolation being carried out very slowly at a rate of about 0.1 milliliter per square centimeter per minute.

Experience has shown that by using the resin as its formate and by carrying out the elution slowly enough, about 80% of the gibberellins are obtained in the form of relatively pure fractions from which raw crystals can be obtained by application of the same process as that used in the first method for carrying out the first stage of the invention.

Second stage.—The method of the second stage of the invention comprises essentially purification of the products obtained in the first stage by adsorption onto activated carbon of the impurities which those products contain (the operation being carried out by means of an aqueous medium under such conditions that the quantity of gibberellins fixed on the carbon is negligible), extraction of the purified gibberellins by means of a solvent such as ethyl acetate which is subsequently evaporated off, crystallization of the gibberellins in pure ethyl ace-

Experience has shown that by using the resin as its formate and by carrying out the elution slowly enough, about 80% of the gibberellins are obtained in the form of relatively pure fractions from which raw crystals can be obtained by application of the same process as that used in the first method for carrying out the first stage of the invention.

Second stage.—The method of the second stage of the invention comprises essentially purification of the products obtained in the first stage by adsorption onto activated carbon of the impurities which those products contain (the operation being carried out by means of an aqueous medium under such conditions that the quantity of gibberellins fixed on the carbon is negligible), extraction of the purified gibberellins by means of a solvent such as ethyl acetate which is subsequently evaporated off, crystallization of the gibberellins in pure ethyl acetate, and subsequent washing and drying of the crystals. More specifically, the process of the second stage of the invention comprises the following steps:

(1) Dissolving in water to a concentration of from 15 to 20 grams per liter the raw crystals obtained in the first stage of the invention. For this purpose it is sufficient to place the crystals in suspension in the corresponding volume of water and to pour in slowly, with stirring, an alkaline solution of known composition such as NaOH, the alkali being added in an amount slightly less than that which would be necessary to completely neutralize the gibberellins, so that the final pH is in the vicinity of 5.

(2) Adding to the solution a small quantity of activated carbon, for example, that known as "Norit" in an amount of approximately of from 5% to 10% by weight of the gibberellins to be purified. This is followed by careful filtering after about a half-hour of contact with the activated carbon, so as to obtain a perfectly clear and practically colorless solution.

(3) Extraction of the gibberellins from this purified solution to obtain them in crystalline form, according to a known process which comprises acidifying the solution to a pH of 3, extracting the gibberellins therefrom with ethyl acetate and evaporating the solvent as a result of which crystallization occurs.

(4) Washing of the crystals several times, the crystals being placed in suspension in a little ethyl acetate which is preferably saturated with gibberellins. Each washing is followed by a draining after which the crystals are

Spectrophotometric method for determining gibberellic acid in fermentation broths

Julio Berríos**, Andrés Illanes & Germán Aroca*

Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, General Cruz 34, Valparaíso, Chile

***Present address: Escuela de Ingeniería en Biotecnología, Universidad San Sebastián, Cruz 1577, Concepción, Chile*

**Author for correspondence (Fax: +56 (32) 273803; E-mail: garoca@ucv.cl)*

Received 6 August 2003; Revisions requested 3 September 2003; Revisions received 3 November 2003; Accepted 4 November 2003

Key words: *Gibberella fujikuroi*, gibberellic acid, gibberellic acid

Abstract

A novel method for the quantitative determination of gibberellic acid in fermentation broths has been developed. It is based on the kinetic of the reaction of conversion of gibberellic acid to gibberellic acid. The method is simple, reliable, faster than most of methods known, and free of the interferences which commonly affect spectrophotometric methods currently in use. Its threshold sensitivity is 0.1 g and its accuracy is greater than 97% for concentrations of gibberellic acid ranging from 0.1 to 1 g l⁻¹.

Introduction

Gibberellic acid (GA₃) is a naturally occurring plant growth regulator which may cause a variety of effects including stem elongation. Methods for gibberellic acid (GA₃) quantification were initially based on the measurement of growth changes of different plant organs and parts promoted by GA₃. Bioassays are currently used when high levels of specificity and sensitivity are required, but they are not suitable for monitoring GA₃ during fermentation, where results are promptly required. For this purpose, simpler and faster methods, such as colourimetric, spectrophotometric, and fluorimetric are preferred. Nevertheless, these methods have the disadvantage that the sample requires pre-treatment for removing interfering substances present in the fermentation broth.

The spectrophotometric method proposed by Holbrook *et al.* (1961) is one of the simplest and most widely used methods for GA₃ determination in fermentation studies (Kahlon & Malhotra 1986, Hollmann *et al.* 1995, Tomasini *et al.* 1997). Briefly, this method consists in the addition of HCl to the sample to then measure the absorbance at 254 nm after

75 min. During this time, the absorbance rises up to a maximum value and then it falls slowly. This is explained by Holbrook *et al.* (1961) as the combined effect of two chemical reactions: (i) GA₃ conversion to gibberellic acid (GE) and (ii) GE decomposition to gibberic and allogibberic acids. These ones do not absorb in the UV range. The latter reaction is not pH-dependent and occurs spontaneously. Broth samples require pre-treatment and solvent extraction of GA₃.

The production of GA₃ by fermentation using *Gibberella fujikuroi* have been extensively studied; for comprehensive reviews see Jefferys (1970) and Kumar & Lonsane (1989). A high improvement in the yield of GA₃ is obtained by adding corn steep liquor to the culture medium, however, this media formulation contains several compounds that absorb strongly in the UV range, changing the absorbance continuously during the fermentation. For these reason, the use of non-defined media makes the application of the method proposed by Holbrook *et al.* almost impractical to follow a fermentation.

In this work we propose a method for the quantification of GA₃ in fermentation broths that avoids the sample pre-treatment procedure proposed by Hol-

at least up to 2 min of reaction when HCl is added to the sample, and the slope of the conversion line can be related to the initial concentration of GA₃ in the sample.

Materials and methods

GA₃ production by fermentation

GA₃ was produced by fed-batch fermentation using the fungus *Gibberella fujikuroi* ATCC 12616. The fermentation was carried out in a 3 l bioreactor (New Brunswick, NJ) at 30 °C, with 2 l culture medium in the batch stage of the following composition: glucose 20 g l⁻¹, corn steep liquor 25 g l⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 3.3 g l⁻¹, KH₂PO₄ 0.5 g l⁻¹, K₂SO₄ 0.2 g l⁻¹. After inoculation the fungus was allowed to grow for 24 h then the culture was fed at constant rate of 20 mg per h during the next 7 d where the concentration of GA₃ reached its maximum (0.66 g l⁻¹) under the given culture conditions. Aeration rate was 1 vvm and the agitator speed 400 rpm. Biomass of broth samples was measured by dry weight as described in Kahlon & Malhotra (1986).

Pre-treatment of samples

Broth samples were centrifuged to remove biomass. An aliquot expected to contain between 2 and 6 mg of GA₃ was transferred to a 100 ml separating funnel. Water was added to make 10 ml. The pH of the solution was adjusted between 1 and 2 using 0.1 M HCl. Twenty ml of ethyl acetate was added and vigorously shaken for 60 s. The aqueous phase was then transferred to a second separating funnel and the extraction procedure repeated by adding another 20 ml ethyl acetate. The aqueous phase was then discharged and the organic phase transferred to the first separating funnel. The GA₃ was re-extracted from ethyl acetate with successive portions of 20, 15 and 10 ml phosphate buffer (pH 7.4), shaking each time for 60 s, and combining each extraction in a 50 ml volumetric flask. The volume of this flask was made up with phosphate buffer.

Determination of GA₃

A sample of 1 ml and 1 ml absolute ethanol were placed in a 10 ml volumetric flask. HCl, 3.75 M,

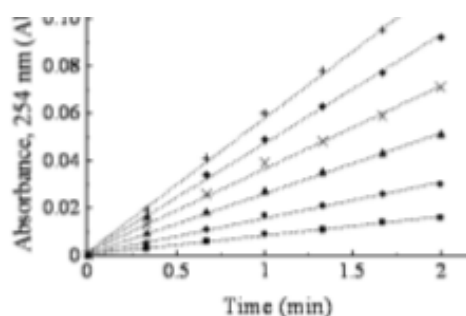


Fig. 1. Gibberellic acid formation from GA₃ by adding 3.75 M HCl. Absorbance in arbitrary units (AU). GA₃ initial concentration (g l⁻¹): (●) 0.1, (▲) 0.2; (×) 0.6; (◆) 0.8; (◊) 1.

was added to the flask up to make 10 ml and then vigorously mixed for 10 s. The absorbance of the resulting solution was measured at 254 nm and recorded at 20 s intervals for 2 min. Temperature was kept at 20 ± 0.5 °C during the process. A calibration graph was then obtained by using standard GA₃ solutions prepared by dissolving 0.04 g pure GA₃ in absolute alcohol and diluted to 100 ml in a volumetric flask with absolute alcohol.

Calculations

Each series of data obtained from spectrophotometric measurement were fitted by linear regression analysis using a computer software. The slopes obtained from each series of determinations were analysed by linear regression, generating a calibration graph for the determination of the concentration of GA₃.

Results and discussion

Figure 1 shows the linear response obtained when absorbance was plotted against time within 2 min after adding HCl to the standard solutions of GA₃. The linear regression coefficient (R) obtained was always higher than 0.998. The absorbance reached a maximum value at 60 min and then it falls slowly. The value of the slope of each line correlates with the initial concentration of GA₃ in the sample. Figure 2 shows the relation between those slopes and the initial concentration of GA₃. The values of r_i were obtained by linear regression of each series of measurement

Determination of gibberellins in fermentation broth produced by *Fusarium verticillioides* MTCC 156 by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

Rohit Sharma*, Jitesh P. Iyer*, Asit K. Chakraborti† and Uttam Chand Banerjee*¹

*Department of Biotechnology, National Institute of Pharmaceutical Education and Research (NIPER), Sector 67, SAS Nagar, Punjab 160062, India, and †Department of Medicinal Chemistry, NIPER, Sector 67, SAS Nagar, Punjab 160062, India

A method for the detection of gibberellins produced by *Fusarium verticillioides* is described using HPLCMS/MS (HPLC tandem MS). A Hypersil (5 μ m) octadecylsilane column with methanol/water as eluent in the ratio 3:1 at a flow rate of 0.5 ml/min was used. In the HPLCMS, GA₃ (gibberellic acid; *m/z* 346.3) eluted at retention time *t*_r = 3.08 min, with the corresponding mass chromatogram having peaks at *m/z* 346.7 and 328.8 corresponding to the *M*⁺ and *M*⁺ - H₂O ions respectively. The ethyl acetate extract from the broth, subjected to HPLCMS analysis under similar conditions, showed a constituent with *t*_r = 2.13 min, the mass chromatogram of which exhibited peaks at *m/z* 348.9 and 331.9 corresponding to the *MH*⁺ and *MH*⁺ - H₂O ions respectively. Comparison of the MS and MS/MS results (direct infusion) of an authentic sample of GA₃ and the ethyl acetate extract from the broth revealed the formation of reduced GA₃ in the broth. The present study, utilizing HPLCMS/MS, describes an improved methodology for the unambiguous determination and estimation of gibberellins from fermentation broth.

Introduction

Gibberellins are a group of diterpenoid acids that occur naturally as by-products of the metabolism of *Gibberella fujikuroi* and its asexual form *Fusarium verticillioides* (formerly known as *F. moniliforme*). They occur in almost all green plants and constitute the class of plant growth hormones. They stimulate growth and stem elongation, induce flowering and fruiting [1] and help to break seed dormancy. They are also known to affect sexual expression in some plants. Their role in stimulating the growth of plants led to their widespread use in agriculture [2], tea gardens, viticulture and horticulture. The existing methods for analysis of gibberellins are UV [3], HPLC [4,5], fluorescence [6] and spectrofluorodensitometry [7]. Certain drawbacks in the currently used methods for analysis of GA₃ (gibberellic acid) prompted us to develop a more precise technique for

its detection and estimation. In the present study, we have used HPLCMS/MS (HPLC tandem MS) to detect gibberellins from the fermentation broth. The advantage of this method is that it is less time consuming, involves very simple steps for sample preparation, is more sensitive and can unambiguously identify major gibberellins on the basis of retention time (*t*_r), by UV absorption and the MS and tandem MS analyses.

Materials and methods

Cultivation of *F. verticillioides*

The fungal strain used in the present study was obtained from the Microbial Type Culture Collection [Institute of Microbial Technology (IMTECH), Chandigarh, India]. *F. verticillioides* was maintained in potato dextrose agar at pH 4 and 30 °C and was subcultured every 30 days. Seed medium was generated by inoculating a loop of the above culture into 100 ml of potato dextrose broth at pH 5 in 500 ml Erlenmeyer flasks and allowed to grow for a period of 80 h; 2% of this seed medium was used to inoculate the production medium. Samples (aliquots of 1.5 ml) were withdrawn after 12 days and analysed for gibberellins.

Analysis

Samples of fermentation broth were withdrawn aseptically and centrifuged at 21040 g for 5 min at room temperature. The pH of the supernatant was adjusted to 2 using 1 M HCl, and the supernatant was extracted with ethyl acetate (3 × 5 ml). The organic layer was washed with brine (5 ml), dried (using 1 g of Na₂SO₄) and evaporated to dryness on a rotavapor. The residue was re-dissolved in 1 ml

Key words: *Fusarium verticillioides*, gibberellic acid, ionization, mass spectrometry, molecular ion.

Abbreviations used: APCI, atmospheric pressure chemical ionization; ESI, electrospray ionization; GA₃, gibberellic acid; HPLCMS/MS, HPLC tandem MS.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail: uchanorj@nipera.ac.in).

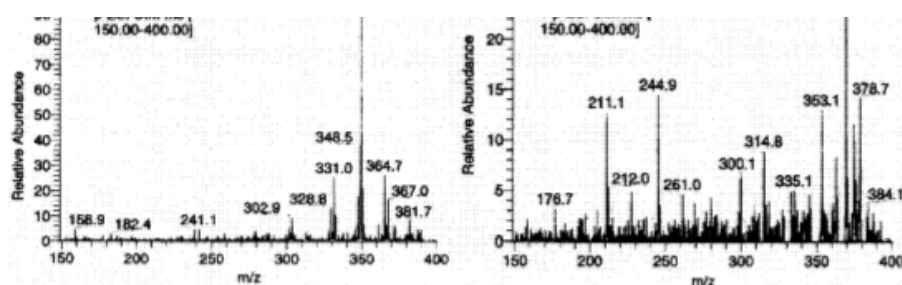


Figure 2 HPLCMS analysis of a sample of fermentation broth centrifugate

of methanol and filtered through a 0.22 μm membrane filter. An aliquot (10 μl), referred to as test sample hereafter, was injected into the HPLCMS set-up (Model-LCQ, Finnigan MAT; ThermoFinnigan, San José, CA, U.S.A.; positive ions, electrospray voltage 3.0 kV; sheath gas, nitrogen) using a Model-Spectra System (Thermo-Separation Products, Riviera Beach, FL, U.S.A.), HPLC instrument fitted with a Hypersil (5 μm) octadecylsilane column (4.6 mm \times 150 mm). Methanol/water in the ratio 3:1 was used as eluent at a flow rate of 0.5 ml/min. Mass and UV detectors were used simultaneously for the identification of the constituent gibberellins. The mass spectroscopic studies of the authentic and test samples were performed for positive and negative ions using ESI (electrospray ionization) and APCI (atmospheric pressure chemical ionization) modes of ionization. Authentic GA_3 was procured from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.) and used. Water was purified by reverse osmosis and filtered through a 0.22 μm membrane filter (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) before use.

Results and discussion

Authentic GA_3 when subjected to HPLCMS eluted at 3.08 and 3.1 min with m/z 346.7 (Figure 1) corresponding to the $[\text{MH}]^+$ ion of GA_3 . The base peak at m/z 328.8 arises due to loss of H_2O from the MH^+ ion and the peak at m/z 302.8 could be formed due to the loss of CO_2 from the MH^+ ion and may be considered as a diagnostic fragment ion for the carboxylic acid.

The reported method of estimation makes use of a UV detector at 202 and 206 nm for GA_3 and at 254 nm for gibberellenic acid (degradative product of GA_3). Accurate estimation of GA_3 becomes difficult owing to the interference of solvent absorption at 202 nm/206 nm. The fluorescence method makes use of the property of GA_3 to exhibit fluorescence on treatment with 85% (v/v) sulphuric acid. This method is sensitive, but the fluorescence profile of all the 126 gibberellins are not known, making it difficult to predict the actual concentration of GA_3 in the fermentation broth. It is known that the fluorescence

© 2004 Portland Press Ltd

Актив
Чтобы с
раздел'

УДК 579.[266.4:844.91]

ЗДАТНІСТЬ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ *DESULFOVIBRIO DESULFURICANS* YA-11 І *DESULFOBACTER* SP. ВИКОРИСТОВУВАТИ НІТРАТ ЯК АКЦЕПТОР ЕЛЕКТРОНІВ**Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь***Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: t_peretyatko@franko.lviv.ua*

Досліджено здатність бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 використовувати нітрат як кінцевий акцептор електронів. Рівень нагромадження біомаси у середовищі з нітратом змінювався залежно від вихідної концентрації NO_3^- . За концентрації нітрату 5 мМ біомаса бактерій була такою ж, як у середовищі з SO_4^{2-} . Проміжним продуктом відновлення нітрату у *D. desulfuricans* Ya-11 є нітрит, а кінцевим – амоній. Високі концентрації нітрату в середовищі пригнічують процес дисиміляційної сульфатредукції. Відмиті клітини *D. desulfuricans* Ya-11 повністю відновлювали нітрит середовища до амонію. Показана здатність психрофільної сульфатвідновлювальної бактерії *Desulfobacter* sp. відновлювати нітрат за низьких температур.

Ключові слова: сульфатвідновлювальні бактерії, нітрат, акцептор електронів.

ВСТУП

У кругообігу сполук Нітрогену відомі два різні шляхи дисиміляційного відновлення нітратів: відновлення нітрату до молекулярного азоту (денітрифікація) і відновлення нітрату до амонію (нітратамоніфікація). Денітрифікацію здійснюють багато різних факультативно анаеробних бактерій, які відновлюють нітрати за одними і тими самими біохімічними механізмами [12]. Нітратамоніфікація може відбуватися різними шляхами. У клостридій, наприклад, нітрат може забезпечити додатковий рівень субстратного фосфорилювання [8], сульфатвідновлювальні бактерії відновлюють нітрат до амонію у дихальному процесі, пов'язаному з транспортом електронів [18]. Серед сульфатвідновлювальних бактерій відновлювати нітрат можуть представники родів *Desulfovibrio* [11, 15, 16, 18], *Desulfobacterium* [20] і *Desulfobulbus* [21].

Умови культивування бактерій суттєво впливають на нітратредуктазну активність бактерій. За наявності у середовищі сульфату і нітрату бактерії *Desulfovibrio desulfuricans*, виділені з ґрунту рисових чеків, відновлювали тільки суль-

Кількість гідроген сульфід у культуральній рідині визначали фотометрично з використанням фотоелектроколориметра КФК-3 ($\lambda=665$ нм, кювета з оптичним шляхом 30 мм). Метод ґрунтується на взаємодії гідроген сульфід з *l*-амінодиметиланіліном з утворенням метиленої сині. Реакційна суміш мала такий склад: 0,16 мМ розчин цинк цитрату – 10 мл; дистильованої води – 1,98 мл; 4 мл розчину *l*-амінодиметиланіліну (1,15 г/л у 4 н розчині сульфатної кислоти) та 20 мкл досліджуваного розчину. Через 5 хв додавали 1 мл ферум (III) хлориду і фотометрували [19].

Сульфат у середовищі визначали турбідиметрично з використанням фотоелектроколориметра КФК-3 ($\lambda=520$ нм, кювета з оптичним шляхом 10 мм) після його осадження барій хлоридом. Для стабілізації суспензії використовували гліцерин [4].

Для визначення нітрату його попередньо відновлювали цинковим пилом до нітриту. З цією метою до проби додавали 0,3 г сухого відновника і 5 мл 12% розчину оцтової кислоти. Через 10 хв пробірки центрифугували; отриманий супернатант спектрофотометрували при $\lambda=540$ нм [5]. За калібрувальною кривою знаходили концентрацію нітриту.

Кількість амонію визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 640 нм. Для цього до 5 мл середовища додавали 5 мл фенольного реактиву (1,8% розчин фенолу), 5 мл 25%-ного розчину натрій гіпохлорату і 5 мл натрій нітропрусиду (5 мкг/мл) [7].

Для виявлення молекулярного азоту у пробірки зі середовищем з нітратом поміщали поплавки запаяним кінцем догори.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програм Microsoft Excel 2003, OriginPro 7.0 та як описано [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Для встановлення здатності бактерій *D. desulfuricans* Ya-11 використовувати нітрат як акцептор електронів попередньо вирощені у середовищі з сульфатом клітини культивували у середовищі без SO_4^{2-} з додаванням NO_3^- у концентраціях 1; 2,5; 5 і 10 мМ. Контролем слугувало середовище, в якому єдиним акцептором електронів був сульфат. За наявності у середовищі різних концентрацій нітрату бактерії *D. desulfuricans* Ya-11 росли, а рівень нагромадження біомаси був дещо нижчим, ніж у середовищі зі сульфатами (рис. 1, а–е). Протягом чотирьох діб культивування нітрат середовища повністю відновлювався клітинами *D. desulfuricans* Ya-11 (рис. 1, б–д). Рівень нагромадження біомаси бактеріями у середовищі з 1 мМ NO_3^- був приблизно на 30% нижчим порівняно з ростом бактерій у середовищі зі сульфатом (рис. 1, а), а у середовищах з 5–10 мМ нітрату – наближався до показників контролю і становив 3–3,2 г/л (рис. 1, а–д).

Клітини бактерій, попередньо вирощені у середовищі зі сульфатом, повністю відновлювали NO_3^- (рис. 2) подібно до клітин, попередньо вирощених у середовищі, в якому єдиним акцептором електронів був нітрат. Це свідчить про конститутивну природу нітраторедуктази в *D. desulfuricans* Ya-11. на відміну від штамів

Bioproduction of mushroom mycelium of *Agaricus bisporus* by commercial submerged fermentation for the production of meat analogue

Kyoungju Kim, Byungsun Choi, Inhee Lee, Hyeyoung Lee, Soonhyang Kwon, Kyoungyoung Oh and Augustine Yonghwi Kim⁴

Abstract

BACKGROUND: As worldwide interest in healthy and delicious meat analogues increases, the texture of these products has become an important indicator of quality. Mycoprotein as fungal mycelium could provide a distinctive chowing sensation; however, the unfavorable consumer perception of fungal mycelium demands the production of meat analogues with true mushroom mycelium.

RESULTS: The industrial and economical bioprocess was developed using an inexpensive medium (30 g L⁻¹ sugar cane extract (SCE), 10 g L⁻¹ NaNO₃ and 5 g L⁻¹ yeast extract) and *A. bisporus* Suksung. The SCE was maintained at around 10 g L⁻¹ to minimize osmotic shock. The maximum mycelium production of 15.0 g L⁻¹ (dry weight) was reached within 4 days. Scanning electron microscopic analysis showed fibrous and directional structure rather than a more typical pellet structure. Meat analogues with mushroom mycelium had better textural properties, being higher in hardness, springiness, and chewiness and with preferable umami characteristics compared to meat analogues utilizing soy protein. The overall acceptance of meat analogues prepared with mycelium and soy protein, and a ground beef patty, were 5, 2 and 10, respectively.

CONCLUSION: The development of an industrial bioprocess for *A. bisporus* mycelium allowed the production of a highly acceptable meat analogue having not only superior textural properties but also umami characteristics when compared to that of soy protein.

© 2011 Society of Chemical Industry

Keywords: *Agaricus bisporus*; meat analogue; mushroom mycelium; submerged fermentation

INTRODUCTION

There is worldwide interest in the production of healthy and delicious foods with high protein content that are also meat free. Such meat analogues not only satisfy vegetarians but also promote personal well-being. Furthermore, meat analogues have bypassed environmental concerns associated with meat and milk production (i.e. CO₂ emission) in recent years.¹ Recently an increasing number of non-vegetarians have been willing to pay more for safe and eco-friendly foods as growing health and nutrition concerns such as chronic disease prevention become increasingly common; thus the market for meat analogues is expected to continue to expand. Various meat analogues have been made, mostly using plant derived proteins such as soy, soya and wheat protein isolates with texturing agents and shearing processes to form the fibrous characteristics of meat analogues.² Unfortunately, such efforts have so far been largely unsuccessful as the texture of these products is very elastic, rubbery and tough, and result in a poor mouthfeel – an extremely important quality indicator of meat analogues. In order to solve this problem of textured plant protein-derived meat analogues, it has been suggested that products should be tenderized to enhance mouthfeel by using a matrix

of fibres having inclusion bodies.³ Furthermore, meat analogues produced using plant-derived proteins usually have an off-flavor originating from the plants and may cause allergic reactions due to wheat gluten added for texturing.

Alternatively, natural mycoprotein in the form of mushroom mycelia that have fibrous structures that produce a distinctive chowing sensation have been used.^{4,5} The first commercial meat analogues such as burger patties and sausages with mycelia were made from the edible filamentous fungi *Fusarium graminearum* and successfully passed safety evaluation by the UK Food Standard Committee in 1994. These meat analogues naturally had a meaty flavor since they possess high sulfur content amino acids and glutamic acid, suggesting the characteristic umami flavor.⁶ Although meat analogues derived from mycelium of *Fusarium*

⁴ Correspondence to: Augustine Yonghwi Kim, Department of Food Science and Technology, Sejong University, Seoul 143-747, South Korea.
E-mail: kiryh@sejong.ac.kr

Department of Food Science and Technology, Sejong University, Seoul 143-747, South Korea

Scanning electron microscopy (SEM)

To determine the structure of *A. bisporus* mycelium, a scanning electron microscope was used. A culture containing *A. bisporus* mycelium was quickly frozen at -80°C , dried in a freeze dryer, and cut into thin slices. The samples were attached to an SEM stub using double-sliced cellophane tape. The stub and sample were then coated with gold-palladium and examined and photographed under a scanning electron microscope (Philips SEM515, Eindhoven, Netherlands) at $600\times$ magnification.

Nutritional composition

All nutritional components of *A. bisporus* mycelium, such as lipid, crude protein, carbohydrate, salts and ash, were determined using standard methods described in the AOAC manual. Total carbohydrate was determined by the difference. For the analysis of β -glucan content, a mushroom and yeast β -glucan assay system (Megazyme Inc., Wicklow, Ireland) was used following AOAC methodology. Following hydrolysis of β -glucan with both lichenase and β -glucosidase, the concentration of released glucose was measured by biochemical analyzer (YSI Model 2700). The crude proteins as total nitrogen content of *A. bisporus* mycelium was determined by the Kjeldahl method¹³ using freeze-dried mycelium (protein constant was 6.25). For the determination of the total amino acid content of mycroprotein, *A. bisporus* mycelium, was hydrolyzed with 6 mol L^{-1} HCl at 110°C for 24 h and then was analyzed using a Waters AccQ tag system (Millipore Co., Billerica, MA, USA) and a high-performance liquid chromatographic system (Agilent 1200 detector, Agilent, Santa Clara, CA, USA). For the determination of free amino acid content, the same method was used following sonication for 60 min of *A. bisporus* mycelium without acid hydrolysis. If necessary, samples were prepared in duplicate and the data obtained were analyzed using a logistic curve model.

and the second time hardness were recorded. The parameters 'instrumental fracturability' and 'instrumental hardness' were calculated using Texture Lab Pro (version 1.13-002). If necessary, samples were prepared in duplicate and the data obtained were analyzed using a logistic curve model. Overall acceptance of meat analogues prepared with *A. bisporus* mycelium was evaluated by a sensory panel consisting of 10 trained graduate students at Sejong University. The relative acceptance was determined by comparison with ground patties using a 1-10 scale analysis (taking ground beef patty as 10).

RESULTS AND DISCUSSIONS

Screening of *A. bisporus* strains for commercial bioprocess development

A total of 10 commercially available *A. bisporus* mushrooms obtained from both Korea Agricultural University and the Suksung mushroom farm in Korea were screened for commercial bioprocess development. All mushrooms except *A. bisporus* Suksung required at least 15-30 days of incubation time to obtain sufficient mycelium masses in submerged flask cultures because of mycelial pellet formation (data not shown). *A. bisporus* Suksung, a variety of the commercially known 'white button' mushroom (i.e. Sylvan and Amycel), was the only economically feasible choice to develop a commercial bioprocess for mycelium production. The maximum mycelium production of 15.3 g L^{-1} (dry weight basis) was reached after 4 days' incubation using PDBYMS medium. Extended incubation time did not increase mycelium mass of *A. bisporus* Suksung, while using additional glucose for the production of extracellular biopolymers, such as β -glucans, was responsible for the viscosity of the cell cultures. It was expected that *A. bisporus* Suksung grew relatively fast in liquid culture since this strain is a main mushroom culture that has been extensively selected for higher productivity (i.e. total mushrooms and larger



YSI 2900 Series Biochemistry Analyzers

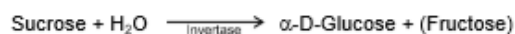
Operations and Maintenance Manual



a xylem brand

8.2.12 Sucrose

This is a direct reading of Sucrose in solution at the enzyme sensor. Three enzymes are co-immobilized in the YSI Sucrose Membrane: Invertase, Mutarotase, and Glucose Oxidase. Through this chain of reactions the moles of hydrogen peroxide liberated is directly proportional to the moles of sucrose.



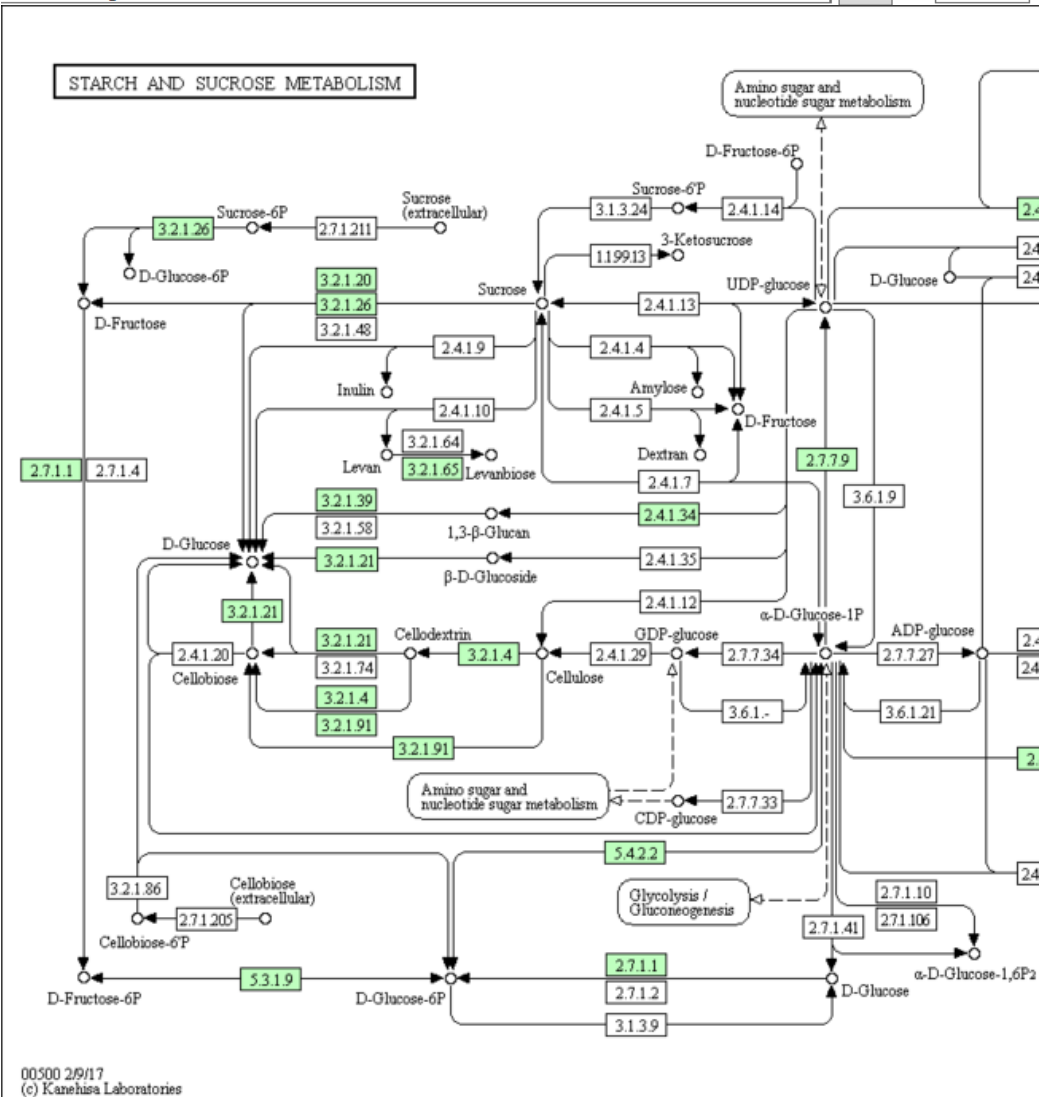
System Buffer	YSI 2357
Calibrator Std	YSI 2780
Linearity Std	YSI 2778
Membrane	YSI 2703
Membrane Color	Blue
Detection Range	0.1–25.0 g/L
Calibration Point	5.0 g/L
Linearity Check Point	25.0 g/L
Sample Size	25 μ L
End Point	30 sec
Precision (CV,n=10)	2% or 0.02 g/L, whichever is greater
Linearity	$\pm 2\%$ (0.1 to Cal Point) $\pm 5\%$ (Cal Point to Range Max)
Typical Working Life	10 days

Special Considerations:

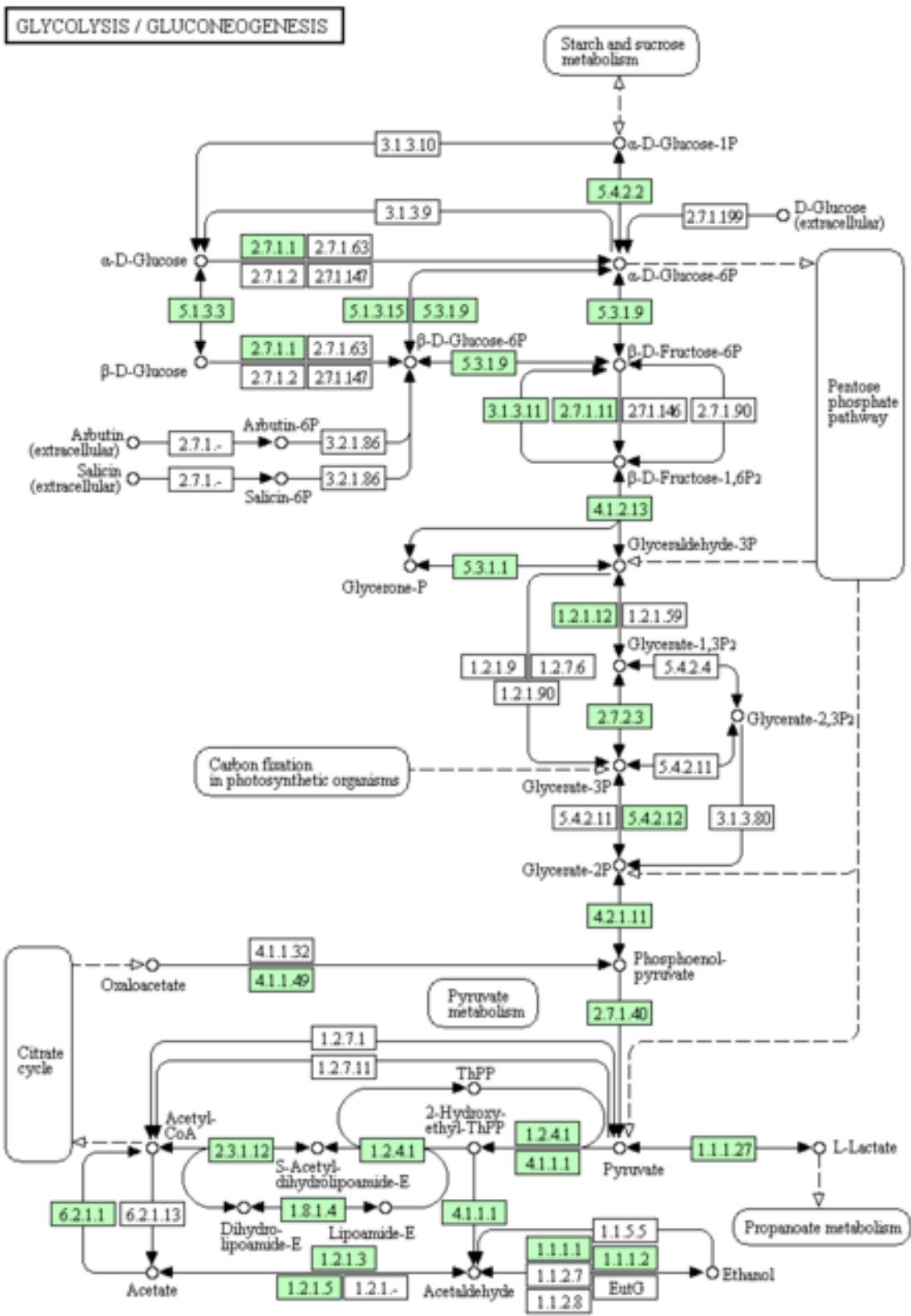
- If sample dilution is required, use reagent water or YSI buffer.
- **The sample must be glucose-free**, or at least contain levels low enough not to interfere with the sucrose reading. Since the sucrose membrane contains glucose oxidase, glucose will produce a probe signal.
- See 8.2.16 *Simultaneous Glucose and Sucrose* for sucrose specifications when measuring glucose and sucrose simultaneously.

Умовні позначення і схема біосинтезу цільового продукту

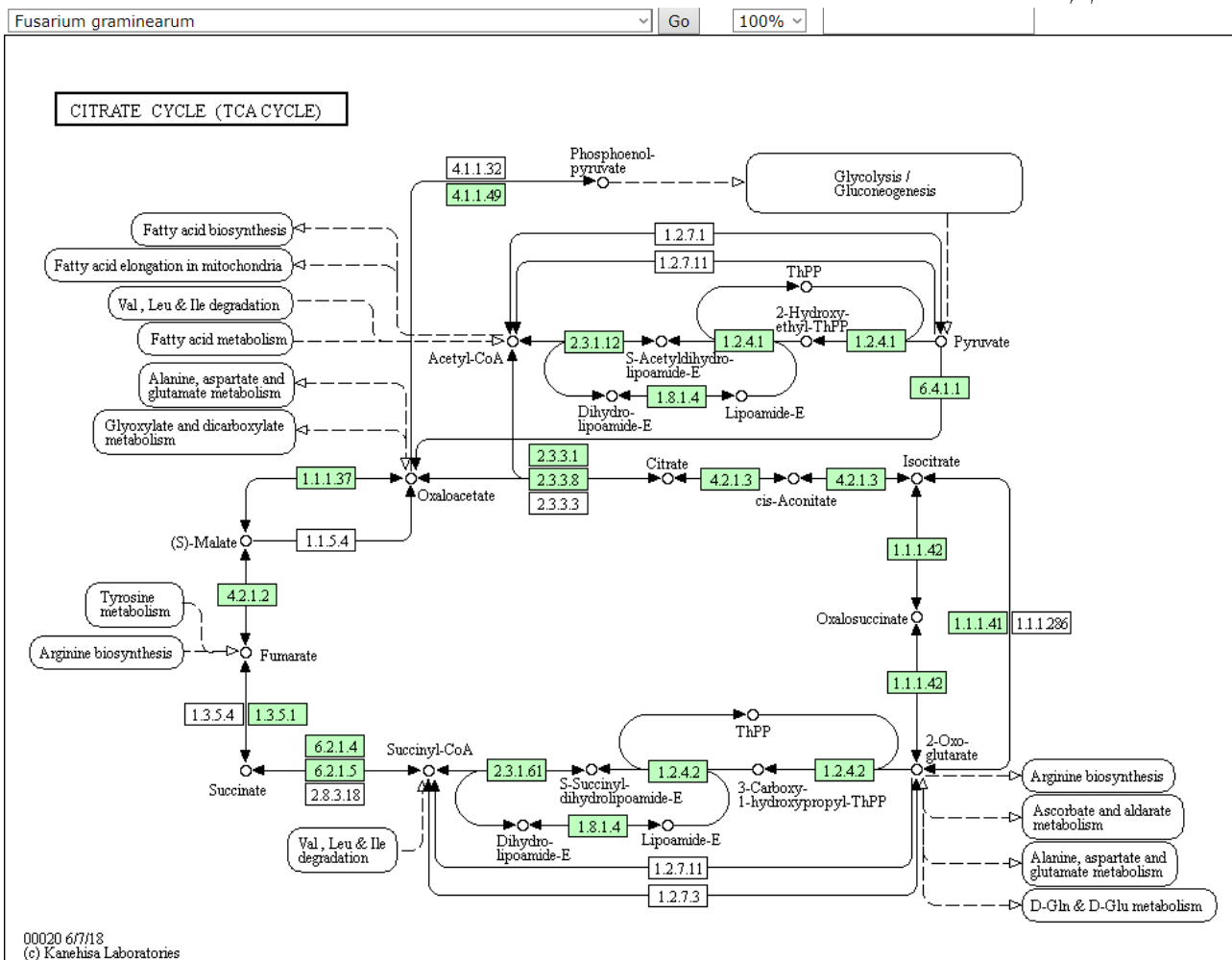
- 1) умовні позначення: – основний шлях біосинтезу; – анаплеротичні реакції;
- 2) ферменти: 1 – β -фруктофуранозидаза (КФ. 3.2.1.26); 2 – гексокіназа (КФ. 2.7.1.1); 3 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ. 5.3.1.9); 4 – 6-фосфофруктокіназа (КФ. 2.7.1.11); 5 – фруктозо-1,6-дифосфатази (КФ. 3.1.2.11); 6 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ. 4.1.2.13); 7 – тріозофосфатізомераза (КФ. 5.3.1.1); 8 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ. 1.2.1.12); 9 – фосфогліцераткіназа (КФ. 2.7.2.3); 10 – 2,3-дифосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ. 5.4.2.12); 11 – енолаза (КФ. 4.2.1.11); 12 – піруваткіназа (КФ. 2.7.1.40); 13 – піруватдекарбоксилаза (КФ. 4.1.1.1); 14 – піруватдегідрогеназа E1 (КФ. 1.2.4.1); 15 – піруватдегідрогеназа E2 (КФ. 2.3.1.12); 16 – цитратсинтаза (КФ. 2.3.3.1); 17 – аконітатгідратаза (КФ. 4.2.1.3); 18 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ. 1.1.1.41); 19 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа E1 (КФ. 1.2.4.2); 20 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа E1 (КФ. 1.2.4.2); 21 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа E2 (КФ. 2.3.1.61); 22 – сукциніл-КоАсинтаза (КФ. 6.2.1.4); 23 – сукцинатдегідрогеназа (КФ. 1.3.5.1); 24 – фумаратгідратаза (КФ. 4.2.1.2); 25 – малатдегідрогеназа (КФ. 1.1.1.37); 26 – фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ. 4.1.1.49); 27 – ацетил-КоАацетилтрансфераза (КФ. 2.3.1.9); 28 – гідроксиметилглутарил-КоАсинтаза (КФ. 2.3.3.10); 29 – гідроксиметилглутарил-КоАредуктаза (КФ. 1.1.1.34); 30 – мевалонаткіназа (КФ. 2.7.1.36); 31 – фосфомевалонаткіназа (КФ. 2.7.4.2); 32 – дифосфомевалонатдекарбоксилаза (КФ. 4.1.1.33); 33 – ізопентенілдифосфатдельтаізомераза (КФ. 5.3.3.2); 34 – геранілдифосфатсинтаза (КФ. 2.5.1.1); 35 – фарнезилдифосфатсинтаза (КФ. 2.5.1.10); 36 – геранілгеранілдифосфатсинтаза (КФ. 2.5.1.29); 37 – ент-Копалілдифосфатсинтаза (КФ. 5.5.1.13); 38 – ент-Кауренсинтаза (КФ. 4.2.1.19); 39 – ент-Кауреноксидаза (КФ. 1.14.14.86); 40 – ент-Кауренатмонооксигеназа (КФ. 1.14.14.107); 41 – P450-1; 42 – P450-2; 43 – ДЕС; 44 – P450-3.



Fusarium graminearum



00010 4/12/18
 (c) Kanehisa Laboratories

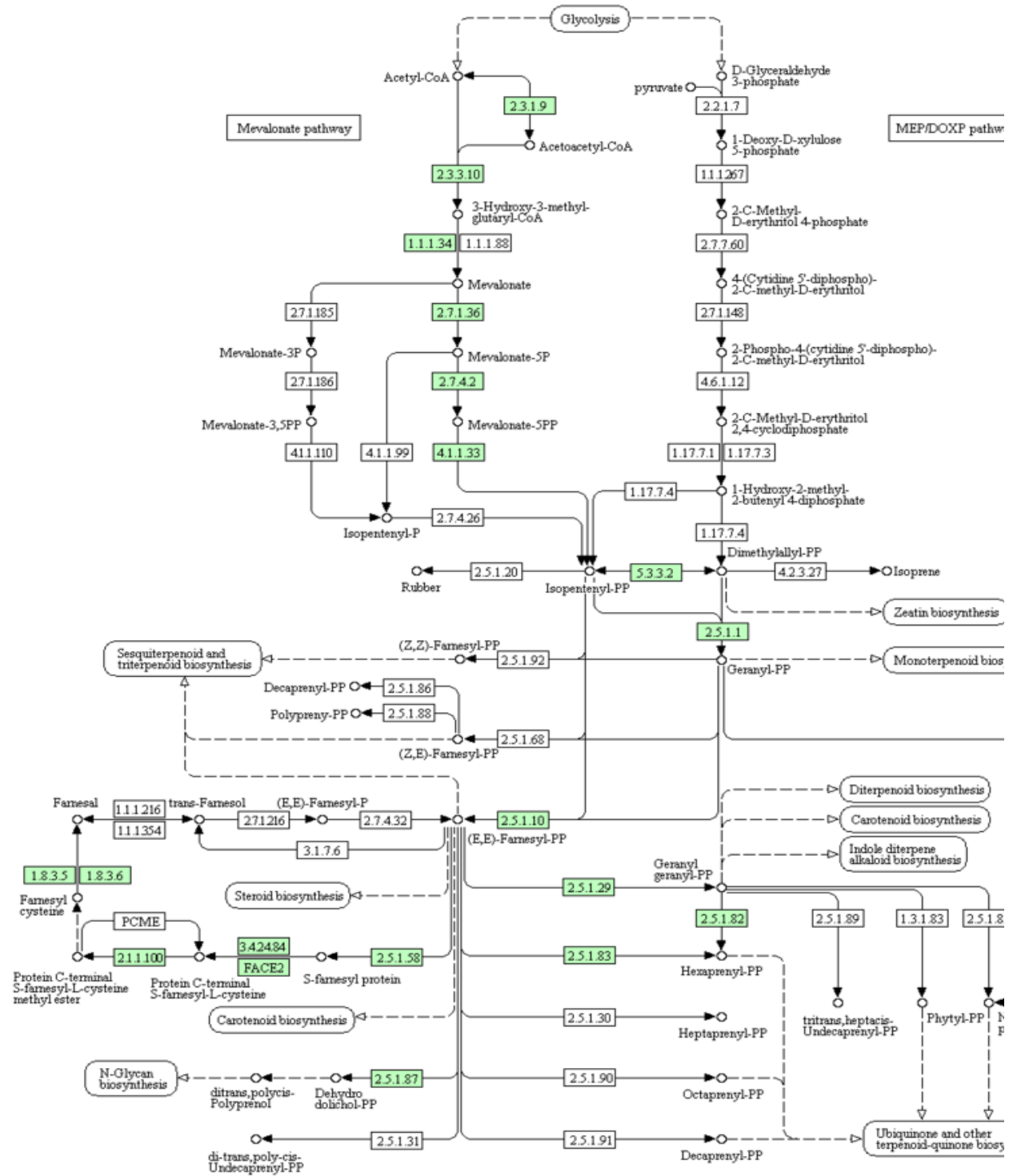


Fusarium graminearum

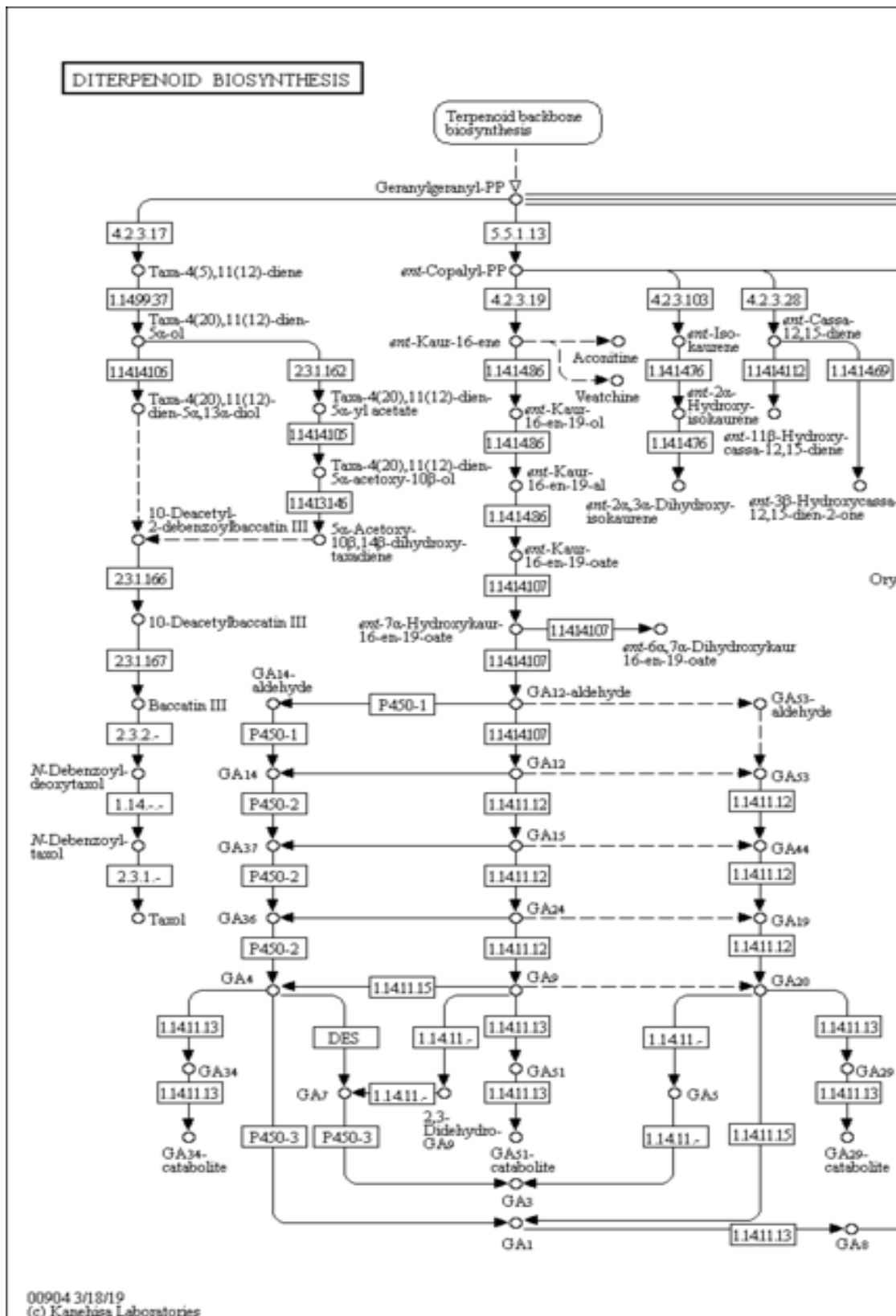
Go

82%

TERPENOID BACKBONE BIOSYNTHESIS



00900 3/27/19
 (c) Kanehisa Laboratories



Тези у збірниках міжнародних конференцій:

1. Лазюка Ю.В., Скроцька О.І. Біогенний синтез наночасток за допомогою рамноліпідів *Pseudomonas aeruginosa* // Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» (м. Київ, НУХТ, 2–3 квітня 2020 р.). – С. 392.

2. Лазюка Ю.В., Скроцька І.О. Біогенний синтез наночасток за допомогою міцеліальних грибів // Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю «Нанотехнології і наноматеріали у фармації та медицині» (м. Харків, 17 квітня 2020 р.). – С. 41-42.

3. Laziuka Y., Kharchenko Y., Skrotska O. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 cell-free supernatant // Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, 27–29 квітня 2020 р.). – С. 90-91.

4. Лазюка Ю.В., Скроцька О.І. Антимікробні властивості біогенних наночасток оксиду цинку // Тези доповідей II Науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (м. Харків, 15 травня 2020 р.). – С. 123.

5. Лазюка Ю.В., Харченко Є.В., Скроцька О.І. Можливість використання грибів та бактерій для біологічного синтезу наночасток срібла // Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія ХХІ століття» (м. Київ, КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2020 р.).

Подані до друку тези:

1. Харченко Є.В., Лазюка Ю.В., Скроцька О.І. Получение наночастиц серебра с использованием бесклеточного супернатанта *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 // Матеріали Международной научно-практической

конференции молодых ученых «Молодежь и инновации – 2020» (Республика Беларусь, 2020 г.).

2. Лазюка Ю.В., Харченко Є.В., Скроцька О.І. Перспективи використання *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 для отримання наночасток срібла // Матеріали Міжнародної научної конференції «Фізико-хімічна біологія як основа сучасної медицини» (г. Мінськ, Республіка Беларусь, 29 травня 2020 г.).

Ministry of Education and Science of Ukraine

National University of Food Technologies

86

**International scientific conference
of young scientist and students**

**"Youth scientific achievements
to the 21st century nutrition
problem solution"**

April 2–3, 2020

Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішення проблем харчування людства у XXI столітті", 2-3 квітня 2020 р. – Київ: НУХТ. – Ч 1.

25. Біогенний синтез наночастинок за допомогою рамноліпідів *Pseudomonas aeruginosa*

Юлія Лазюка, Оксана Скроцька

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Вступ. Для синтезу металевих наночастинок використовують різні хімічні методи. Більшість із цих методів становлять серйозний ризик для навколишнього середовища. Тому, актуальним є отримання наночастинок біогенним способом, зокрема за допомогою поверхнево активних речовин, а саме рамноліпідів.

Матеріали і методи. Здійснено аналіз літературних джерел з метою встановлення можливості біогенного синтезу наночастинок цинку, срібла та нікелю за допомогою рамноліпідів *Pseudomonas aeruginosa*.

Результати та обговорення. Singh зі співробітниками отримували та стабілізували наночастинки цинку за допомогою рамноліпідів, синтезованих *Pseudomonas aeruginosa* CEMS077. За наступних параметрів: концентрація рамноліпідів – 50 мг/л, 1 mM ZnNO₃, витримка 30 хв при 80°C за інтенсивного перемішування, вдалось отримати наночастинки цинку розміром 35-80 нм. Автори дослідили антиоксидантні властивості отриманих наночастинок та виявили інгібуючу дію на окислення β-каротину та перекисне окиснення ліпідів [1]. У праці Kumar зі співавт. було показано можливість синтезу наночастинок срібла за допомогою рамноліпідів *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. Реакцію синтезу здійснювали за кімнатної температури з використанням 0,01M водного розчину нітрату срібла, 3 г рамноліпідів та 1,5 г н-бутанолу і 0,5 г н-гептану. Автори отримали наночастинки розміром 40-120 нм та дослідили їх протимікробну активність з використанням наступних тест-культур: *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* [2]. У дослідженнях індійських вчених Palanisamy та Raichur була показана можливість синтезу наночастинок нікелю за допомогою рамноліпідів *Pseudomonas aeruginosa*. Наночастинки отримували шляхом змішування двох різних мікроемулсій. Першу мікроемулсію готували шляхом розчинення 0,1 г рамноліпідів в 17 г н-гептану і 10 мл розчину NiCl₂·6H₂O концентрацією 1 M. Другу мікроемулсію готували шляхом додавання NH₄OH концентрацією 10 M замість хлориду нікелю. У результаті було отримано наночастинки розміром 35-105 нм. Також було досліджено вплив pH на формування наночастинок нікелю. При підвищенні pH з 11,5 до 12,5 виявлено зменшення середнього розміру наночастинок майже у 2 рази [3].

Висновки. Отже залежно від типу металу, а також параметрів біогенного синтезу з використанням рамноліпідів *Pseudomonas aeruginosa* можна отримувати наночастинки різного розміру.

Література

1. Singh B.N., Rawat A.K., Khan W. et. al. (2014), Biosynthesis of stable antioxidant ZnO nanoparticles by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids, *PLoS One*, 9 (9): e106937.
2. Kumar C.G., Mamidyala S.K., Das B. et. al. (2010), Synthesis of biosurfactant-based silver nanoparticles with purified rhamnolipids isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20 (7), p. 1061-1068.
3. Palanisamy P., Raichur A.M. (2009), Synthesis of spherical NiO nanoparticles through a novel biosurfactant mediated emulsion technique, *Mater. Sci. Eng.: C*, 29 (1), p. 199-204.



Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет
Кафедра неорганічної хімії
Інститут підвищення кваліфікації
спеціалістів фармації НФаУ
Кафедра промислової фармації та економіки
Українська академія наук



Матеріали
IV Всеукраїнської науково-практичної
інтернет-конференції з міжнародною участю
НАНОТЕХНОЛОГІЇ І НАНОМАТЕРІАЛИ
У ФАРМАЦІЇ ТА МЕДИЦИНІ
(17 квітня 2020 року)

Materials of
IV Ukrainian Scientific-Practical Internet Conference
with International Participation
NANO-TECHNOLOGY AND NANOMATERIALS
IN PHARMACY AND MEDICINE
(April 17, 2020)

Материалы
IV Всеукраинской научно-практической интернет-
конференции с международным участием
НАНОТЕХНОЛОГИИ И НАНОМАТЕРИАЛЫ
В ФАРМАЦИИ И МЕДИЦИНЕ
(17 апреля 2020 года)

ЗБІРНИК НАУКОВИХ ПРАЦЬ

ХАРКІВ
2020

**БІОГЕННИЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТОК ЗА ДОПОМОГОЮ
МІЦЕЛІАЛЬНИХ ГРИБІВ**

Лазюка Ю.В., Скроцька І.О.

Національний університет харчових технологій, м. Київ, Україна

skrotska@nuft.edu.ua

Міцеліальні гриби продукують велику кількість первинних та вторинних метаболітів (білки, полімери, ферменти), які приймають участь у біосинтезі наночастинок різних елементів, зокрема металів. При цьому такі властивості наночастинок як велика площа поверхні, стабільність, механічна міцність і низькі температури плавлення, роблять можливим їх використання у медицині. Наприклад, для цільової доставки ліків, лікування раку, інгібування біоплівки, лікування мікробних інфекцій та ін. Також, слід наголосити, що на противагу фізичним та хімічним методам синтезу наночастинок, які, у свою чергу, є шкідливими для навколишнього середовища, а також є досить трудомісткими, технології отримання наночастинок біологічним способом є економічнішими, екологічно безпечнішими та менш трудомісткими [1].

Іракські вчені, використовуючи міцелій *Cladosporium cladosporioides*, здійснили синтез наночастинок срібла. Для цього до клітин додавали нітрат срібла до кінцевої концентрації 1 мМ. Синтез тривав 72 год при частоті перемішування 200 об/хв. Отримані наночастки мали різну форму з розмірами від 5 до 50 нм та проявили фунгіцидну дію на збудників онікомікозів [2]. Також є повідомлення про можливість отримання біогенних наночастинок срібла за допомогою безклітинного супернатанту *Fusarium scirpi*. Технологія отримання наночастинок передбачала внесення нітрату срібла до кінцевої концентрації 1 мМ, інкубацію впродовж 168 год при частоті перемішування 180 об/хв без доступу світла. Синтезовані наночастки срібла мали квазісферичну форму, а розміри були в межах 2-20 нм. Дані наночастки справляли антибактеріальну дію на антибіотикостійкі штами бактерій, а також на їх біоплівки [3].

Дослідження, проведені Clagance та іншими, показали можливість отримання наночастинок золота за допомогою *Fusarium solani*. До безклітинного екстракту грибів додавали нітрат срібла до кінцевої концентрації 1 мМ та тетрахлораурат водню. Біосинтез наночастинок здійснювали без доступу світла впродовж 48 год при рН 8,5. Розміри отриманих наночастинок становили 40-45 нм і вони мали голкоподібну структуру. Автори встановили протипухлинну активність отриманих наночастинок золота щодо перещеплюваних культур ракових клітин [4].

Позаклітинний синтез наночастинок оксиду цинку за допомогою *Aspergillus niger* був показаний Kalra та співоробітниками. Біосинтез передбачав внесення нітрату цинку до концентрації 5 мМ до безклітинного екстракту міцеліальних грибів. Отриманий розчин інкубували 48 год при температурі 37 °С та режимі перемішування 200 об/хв. У результаті було отримано сферичні наночастки розміром 53-69 нм. Наночастки оксиду цинку мали антимікробну дію на бактерії, що здатні викликати захворювання шкіри, ендокардит, остеомієліт, пневмонію, менінгіт та інфекційні захворювання кишківника [5].

Також є данні про біосинтез наночастинок оксиду цинку за допомогою безклітинного супернатанту *Aspergillus niger* шляхом додавання до нього ацетату цинку до кінцевої концентрації 1 мМ. Біосинтез тривав 24 год при постійному перемішуванні. Синтезовані наночастки мали розмір 80-130 нм та паличкоподібну структуру. Автори дослідили антиоксидантні, протимікробні та протипухлинні властивості отриманих наночастинок. Було виявлено антибактеріальну дію біологічно отриманих наночастинок цинку щодо збудників кишкових інфекцій, пневмонії та нозокоміальних захворювань. Також було встановлено їх протипухлинну дію *in vitro* на моделі гепатокарциноми людини [6].

Отже, міцеліальні гриби є джерелом метаболітів, які можуть діяти як стабілізуючі і відновлюючі агенти при біосинтезі наночастинок. При цьому вони можуть бути синтезовані як внутрішньо-, так і позаклітинно, мати різну форму та розміри, а також біологічні властивості.

Література:

1. Singh A., Gautam P.K., Verma A., Singh V., Shivapriya P.M., Shivalkar S., Sahoo A.K., Samanta S.K. Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: a review. *Biotechnol. Rep. (Amst.)*. 2020, 25: e00427. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00427.
2. Lafta A.K., Ajah H.A., Dakhil O.A.A., Al-Wattar W.M.A. Biosynthesis of silver nanoparticles using biomass of *Cladosporium cladosporioides* and antifungal activity against pathogenic fungi causing onychomycosis. *Plant Archives*. 2019, 19 (2): 4391-4396.
3. Rodriguez-Serrano C., Guzman-Moreno J., Angeles-Chavez C., Rodriguez-Gonzalez V., Ortega-Sigala J.J., Ramirez-Santoyo R.M., Vidales-Rodriguez L.E. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Fusarium scirpi* and its potential as antimicrobial agent against uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *PLoS One*. 2020, 15(3): e0230275. doi: 10.1371/journal.pone.0230275.
4. Clarence P., Luvankar B., Sales J., Khusro A., Agastian P., Tack J.C., Al Khulaifi M.M., Al-Shwaiman HA, Elgorban A.M., Syed A., Kim H.J. Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using endophytic fungi *Fusarium solani* and its in-vitro anticancer and biomedical applications. *Saudi J. Biol. Sci.* 2020, 27(2): 706-712. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.12.026.
5. Kalpana V.N., Kataru B.A.S., Sravani N., Vigneshwari T., Panneerselvam A., Devi Rajeswari V. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using culture filtrates of *Aspergillus niger*: Antimicrobial textiles and dye degradation studies. *Open Nano*. 2018, 3: 48-55, doi: 10.1016/j.onano.2018.06.001.
6. Gao Y., Anand M.A.V., Ramachandran V., Karthikkumar V., Shalini V., Vijayalakshmi S., Ernest D. Biofabrication of zinc oxide nanoparticles from *Aspergillus niger*, their antioxidant, antimicrobial and anticancer activity. *J. Clust. Sci.* 2019, 30: 937-946, doi: 10.1007/s10876-019-01551-6.

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА
МІНІСТЕРСТВО НАУКИ І ВИЩОЇ ОСВІТИ ПОЛЬЩИ
ПОМОРСЬКА АКАДЕМІЯ В СЛУПСЬКУ
FRIENDS OF LVIV UNIVERSITY, INC., USA

МОЛОДЬ І ПОСТУП БІОЛОГІЇ

XVI МІЖНАРОДНА НАУКОВА КОНФЕРЕНЦІЯ
СТУДЕНТІВ І АСПІРАНТІВ
присвячена 75 річниці створення біологічного факультету
та 90 річниці від дня народження М. Деркача
(Львів, 27 - 29 квітня 2020)

ЗБІРНИК ТЕЗ



Львівський національний
університет імені Івана
Франка



Біологічний факультет
Львівського національного
університету імені Івана Франка



Friends of Lviv University,
Inc., USA



Українське біофізичне
товариство



Українське фізіологічне
товариство ім. П.Костюка



Institut Biologii
i Osobnošci Zrodowiska
Поморська Академія в
Слупську, Польща



Львівська
міська рада



Львів - 2020

Laziuka Y., Kharchenko Y., Skrotska O.
BIOSYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES USING
ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMV V-7241 CELL-FREE SUPERNATANT

National University of Food Technologies
68, Volodymyrska St., Kyiv, 01033, Ukraine
yulia_lysenko_99@ukr.net

Currently, the biological synthesis of nanoparticles and their properties and application in the fields of medicine and the environment is an important area of nanotechnology (Singh, 2015). Synthesis of nanoparticles using chemical

and physical methods has several disadvantages. These drawbacks include the use of toxic solvents, the formation of dangerous by-products and high energy consumption. Therefore, it is important to obtain nanoparticles in a biogenic way, in particular by microorganisms. The mechanisms of biogenic synthesis of nanoparticles have not been fully studied. There are reports on the role of surface active agents (surfactants) in this process (Singh, 2014). Therefore, the producer of surfactants *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 (which was isolated from the oil contaminated environment) was selected for the study (Pirog, 2015).

The cultivation of *A. calcoaceticus* IMV V-7241 was carried out on liquid nutrient medium (g/l): tryptone – 10, NaCl – 10, yeast extract – 5. Cultivation parameters: temperature 30 °C, stirring 320 rpm, duration 24 h. The cell-free supernatant was obtained by centrifugation of the culture fluid for 30 min at 5000 rpm, followed by filtration through filters with 0.22 µm pore diameter. A solution of silver nitrate was added to the cell-free supernatant to a final concentration of 1 mM. The control was samples with a nutrient medium, in which silver nitrate was also added. The biogenic synthesis of silver nanoparticles was carried out for 240 h under the following conditions: temperature 4, 22, 30, 37, and 45 °C under static conditions, as well as with stirring (320 rpm) at a temperature of 30 °C. The optical density of the samples was measured on a photoelectric colorimeter at a wavelength of 440 nm.

Singh et al. confirmed that during the formation of silver nanoparticles increases the optical density of the test solution and the color change from transparent to brown (Singh, 2013). In our study, there was also a change of color from light to dark brown, which may indicate the biogenic synthesis of silver nanoparticles. Color changes in the control sample were not observed. About the optical density of the samples, the period from 48 hours to 240 hours, it increased up to 4.5 times (37 °C, static conditions), 7.2 times (45 °C, static conditions) and 3.1 times (30 °C, stirring 320 rpm). At the following biosynthesis parameters: 4, 22, 30 °C under static conditions, changes in optical density, as well as coloration of the samples were not observed.

Therefore, biogenic synthesis of silver nanoparticles using cell-free supernatant *A. calcoaceticus* IMV V-7241 is possible at the following temperatures – 37 and 45 °C under static conditions or at 30 °C and stirring (320 rpm).

Міністерство освіти і науки України
Інститут модернізації змісту освіти
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
Національна академія наук України
Інститут клітинної біотехнології та генетичної інженерії

БІОТЕХНОЛОГІЯ XXI СТОЛІТТЯ



Матеріали
XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції
«Біотехнологія XXI століття» присвяченої 135-річчю від дня народження
Олександра Володимировича Палладіна
(для студентів, аспірантів і молодих вчених)

20 травня 2020 року



Київ-2020

**МОЖЛИВІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ ГРИБІВ ТА БАКТЕРІЙ ДЛЯ
БІОЛОГІЧНОГО СИНТЕЗУ НАНОЧАСТОК СРІБЛА***Лазюка Ю.В., Харченко Є.В., Скроцька І.О.**Національний університет харчових технологій**вул. Володимирська 68, Київ, 01033, yulia_lysenko_99@ukr.net*

Нині проводяться дослідження можливості застосування наночастинок срібла (AgNPs) у антибактеріальній та протигрибковій терапії. Доведено, що вони індукують синтез активних форм кисню, які викликають незворотні пошкодження бактерій, а також здатні зв'язуватись із ДНК або РНК, що перешкоджає процесу реплікації мікроорганізмів [1, 2]. Отримати AgNPs можна за допомогою різних способів. При цьому хімічні та фізичні методи є досить трудомісткими, енергозатратними, а також потребують використання токсичних сполук, які негативно впливають на навколишнє середовище. Біологічний метод синтезу наночастинок є дешевим та екологічно чистим. Відомі способи біогенного синтезу наночастинок срібла за допомогою бактерій та міцеліальних грибів.

Досліджено можливість отримання сферичних AgNPs за допомогою бактерій *Isoptericola* sp. SYSU 333150. При цьому до культуральної рідини автори додавали нітрат срібла та здійснювали подальшу інкубацію під дією сонячного світла. У результаті було отримано наночастинок з розмірами 11-40 нм [1]. Показано біосинтез AgNPs у безклітинному супернатанті *Acinetobacter calcoaceticus* за наступних параметрів: 1 мМ нітрату срібла, тривалість 168 год при 40 °C у статичних умовах. Розміри синтезованих наночастинок – 10-60 нм [3].

Виявлено здатність міцеліальних грибів *Cladosporium cladosporioides* синтезувати AgNPs при додаванні нітрату срібла. Синтез тривав 72 год при постійному перемішуванні. Отримані наночастинок мали розмірами 5-50 нм [2]. Також можна отримати AgNPs, використовуючи безклітинний екстракт *Fusarium scirpi*, до якого додають нітрат срібла. Після 168 год витримки без доступу світла формувались квазісферичні наночастинок з розмірами 2-20 нм [4].

Отже, використання бактерій та міцеліальних грибів у процесі біологічного синтезу AgNPs дозволяє отримати наночастинок різноманітного розміру та форми.

1. Dong Z.Y. Antibacterial activity of silver nanoparticles against *Staphylococcus warneri* synthesized using endophytic bacteria by photo-irradiation / Z.Y. Dong, M.P. Narsing Rao, M. Xiao et al. // *Front. Microbiol.* – 2017. – № 8. – 1090.

2. Lafta A.K. Biosynthesis of silver nanoparticles using biomass of *Cladosporium cladosporioides* and antifungal activity against pathogenic fungi causing onychomycosis / A.K. Lafta, H.A. Ajah, O.A.A. Dakhil, W.M.A. Al-Wattar // *Plant Archives.* – 2019. – Vol. 19, № 2. – P. 4391-4396.

3. Singh R. Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics / R. Singh, P. Wagh, S. Wadhvani et al. // *Int. J. Nanomedicine.* – 2013. – № 8. – P. 4277-4290.

4. Rodriguez-Serrano C. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Fusarium scirpi* and its potential as antimicrobial agent against uropathogenic *Escherichia coli* biofilms / C. Rodriguez-Serrano, J. Guzman-Moreno, C. Angeles-Chavez // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15, № 3. – e0230275.