

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ___ » _____ 2021р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ___ » _____ 2021р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

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

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

на тему: «Біосинтез β -фруктофуранозидази культивуванням
Saccharomyces cerevisiae»

Виконала: здобувач 3 курсу, групи 1ск

Шевченко Тетяна Вікторівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Удимович Віктор Миколайович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Годовський О.В.
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ - 2021р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

“28” жовтня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Шевченко Тетяни Вікторівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез β -фруктофуранозидази культивуванням *Saccharomyces cerevisiae*»

керівник роботи Удимович Віктор Миколайович, асис.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від “27” жовтня 2020 року № 875

2. Строк подання здобувачем роботи 31.01.2021 року

3. Вихідні дані до роботи геометричний об'єм ферментера – 0,63м³

коефіцієнт заповнення ферментера при культивуванні – 0,5

цільовий продукт біосинтезу - β -фруктофуранозидаза

біологічний агент - *Saccharomyces cerevisiae*

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) _____

Характеристика кінцевого продукту виробництва, характеристика біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема виробництва β -фруктофуранозидази формату А1 – 1 аркуш

Технологічна схема виробництва β -фруктофуранозидази формату А1 – 1 аркуш

ЗМІСТ

Реферат	6
Вступ	7
Розділ 1. Характеристика кінцевого продукту виробництва	9
Розділ 2. Характеристика біологічного агента	12
2.1. Вибір біологічного агента та поживного середовища для його культивування	12
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	16
2.3. Таксономічний статус біологічного агента	20
Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування	21
3.1. Потреба у цільовому продукті	21
3.2. Розрахунок потужності виробництва інвертази для виробництва фруктози	23
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби в інвертази та геометричного об'єму ферментера	24
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки інокуляту	25
Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	29
4.1. Обґрунтування до ферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	29
4.1.1. Обґрунтування способу культивування та типу виробничого ферментера	30
4.1.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря	31
4.1.3. Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору миючих та дезінфікуючих засобів	33
4.1.4. Особливості способу підготовки та стерилізації поживного середовища	36
4.1.5. Обґрунтування стадії підготовки обладнання та комунікацій	38

Розділ 5. Специфікація обладнання	41
Розділ 6. Опис технологічної схеми	43
Розділ 7. Контроль виробництва	54
7.1. Карта постадійного контролю	54
7.2. Мікробіологічний контроль	60
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту	61
7.3.1. Концентрація біомаси	61
7.3.2. Визначення активності β -фруктофуранозидази	62
7.3.3. Визначення концентрації джерела вуглецю	64
7.3.4. Визначення концентрації джерела азоту	64
Список використаних літературних джерел	66

РЕФЕРАТ

В даному проекті представлено технологію та план отримання культуральної рідини для подальшого вилучення ферментного препарату β -фуранозидаза (інвертаза) для гідролізу вуглеводів, зокрема й сахарози, за допомогою культивування штаму дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612. Річна потреба для 100000 українців у препараті β -фуранозидазі, що застосовуються при виробництві фруктози становить 81 кг.

Технологічний процес забезпечується за допомогою робіт допоміжного забезпечення (санітарна підготовка виробництва, підготовка та накопичення аераційного повітря) та основних виробничих робіт (вирощування та накопичення посівного матеріалу в колбах на качалочній установці, інокуляторах та виробничий біосинтез безпосередньо у ферментері), що зазначені в технологічній та апаратурній схемах.

Дипломний проект викладений на 70 сторінках друкованого тексту, має 10 таблиць та 6 рисунків і складається зі вступу, семи розділів, переліку використаної літератури (47 джерел) та графічної частини (креслень формату А1).

Ключові слова: β -фуранозидаза, *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612, фруктоза, біосинтез, фермент.

					НУХТ БТЕК 03.01ск.06 ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		<i>Шевченко Т.В.</i>			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		<i>Удимович В.М.</i>				1	1
Реценз.					РЕФЕРАТ Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>					

ВСТУП

В сучасній біотехнології все частіше піднімається питання важливості активності і специфічності ферментів, дослідження їх біосинтезу різними продуцентами, вивчення необхідних фізико-хімічних властивостей та механізми їх подальшої дії. Вирішення ряду певних питань має не лише фундаментальне значення, але й прикладне з точки зору раціонального використання ферментних препаратів, інтенсифікації певних технологічних процесів та направленої попередньої обробки рослинної та тваринної сировини при виробництві певних харчових продуктів та інгредієнтів раціону людини [1].

Останніми роками в Україні все частіше і гостріше постає проблема такого захворювання як цукровий діабет I-го та II-го типу серед українців. Одним з факторів, що стримує нарощування об'ємів виробництва відомих і нових лікувальних, профілактичних та дієтичних продуктів на основі застосування фруктози та високофруктозних сиропів є відсутність комплексного ферментного препарату β -фруктофуранозидази вітчизняного виробництва. Через бракування дешевої сировини та технології даного ферменту майже весь інвертний сироп (40 000 т за рік) отримують кислотним гідролізом цукрози, який, на відміну від ферментативного, супроводжується накопиченням певного переліку побічних продуктів та речовин, вилучення яких значно ускладнює технологічний процес отримання продукту та підвищує вартість кінцевого продукту виробництва (глюкозного та фруктозного сиропів) [2].

					НУХТ БТЕК 03.01ск.06 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		<i>Шевченко Т.В.</i>			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		<i>Удимович В.М.</i>					1	2
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>						

Метою даного проекту є розробка та планування виробничої ділянки (апаратурна і технологічна схеми) отримання культуральної рідини для подальшого отримання препарату інвертази на основі біосинтезу *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612.

Оскільки в Україні β -фруктофуранозидаза (інша назва – інвертаза) не виробляється, але використовується в різних галузях промисловості та харчування, то розробка технологічної схеми, а також способу культивування інвертази в промислових масштабах з максимально ефективним підходом до виконання біосинтезу є **актуальним питанням**.

Новизною даного проекту є розробка нової технологічної схеми та принципу виробництва β -фуранозидази. Для штаму дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612, який синтезує цільовий продукт запропоновано найоптимальніше поживне середовище, культивування на якому дає змогу отримати найбільший вихід цільового продукту, в порівнянні з іншими штамми за найбільш оптимальних умов біосинтезу [3].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОГО ПРОДУКТУ ВИРОБНИЦТВА

Фермент β -фуранозидаза (β -фруктофуранозидаза, інвертаза) є одним з різновидів глікозил-гідролаз, що є елементом класу гідролаз. Глікозил-гідролази приймають безпосередню участь у руйнації глікозидних зв'язків у високомолекулярних компонентах субстратів, що знаходяться в поживному середовищі, і перетворюють їх в легко доступну форму [7].

Препарати β -фруктофуранозидази застосовуються в ряді різноманітних технологічних процесів де необхідна інверсія сахарози. Зазвичай даний фермент у великій кількості використовують у кондитерській галузі при виробництві так званих «помадних» виробів, оскільки вони при втраті вологи сильно втрачають свою першочергову форму (сильно твердіють) через кристалізацію сахарози. Саме тому до подібних виробів і додають β -фруктофуранозидазу, оскільки вона сповільнює процес гідролізу сахарози. Також цей фермент використовують хлібовипікані з метою покращення аромату, пористості і зовнішнього вигляду хліба та хлібобулочних виробів. β -фуранозидаза *S. cerevisiae*, яка є позаклітинною є глікопротеїном – димером з молекулярною масою 270 кД. Вуглеводна частина ферменту, яка становить 50%, складається з манану і невеликої кількості (3%) глюкозаміну.

β -фуранозидаза виявляється в ряді певних рослин, мікроорганізмів та травних соках тварин. Інвертаза проводить розщеплення сахарози на глюкозу та фруктозу (реакція інверсії за участі ферменту – інвертази), оскільки реакція супроводжується зміною знаку оптичного обертання: правообертальна сахароза перетворюється на лівообертальну суміш глюкози і фруктози – інвертний

цукор (рис 1.1) [8].					НУХТ БТЕК 03.01ск.06 ДП ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОГО ПРОДУКТУ ВИРОБНИЦТВА			Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.	Шевченко Т.В.								1	3
Перевір.	Удимович В.М.							Кафедра БТМ		
Реценз.										
Н. Контр.										
Затверд.	Пирог Т.П.									

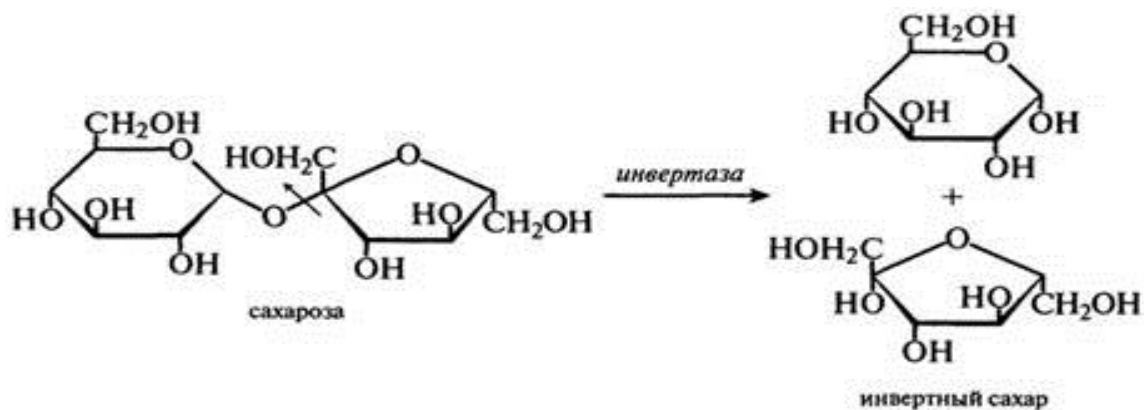


Рис.1.1 Розщеплення сахарози

Препарати β -фуранозидази застосовують у технологічних процесах, де потрібна інверсія сахарози. Фермент використовується у харчовій промисловості, зокрема в кондитерській галузі при виробництві помадних виробів. Помадні вироби швидко черствішають при зберіганні, оскільки із втратою вологи спостерігається явище кристалізації сахарози. Якщо в рецептуру додавати β -фуранозидазу, то відбуватиметься повільний гідроліз сахарози вже в готовій цукерці. Тому помадка і інші кондитерські вироби із помадними масами матимуть тривалий час оптимальну консистенцію і черствіння уповільниться. [7].

Використання ферменту

Даний фермент має широке використання при виробництві інвертних сиропів в лікєро-горілчаній та безалкогольній промисловості, де концентрацією цукрів становить до 72-73%. Фермент може використовуватися як антикристалізатор при виробництві плодово-ягідних морсів та соків, згущеного молока, штучного меду [7].

Вплив на організм людини

Фермент дозволений до застосування при виробництві продуктів харчування і не наносить шкідливого впливу на внутрішні органи і організм людини. В процесі виробництва харчових продуктів інактивується. Однак

велика кількість добавки E-1103 може призводити до технічного псування продуктів [9].

Дозування

Передбачається використання 1 г препарату на 2 кг цукру [9].

Вартість

Вартість інвертази становить 450 грн за 200 грам [9].

РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Вибір біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Фермент β -фуранозидазу можуть продукувати різноманітні мікроорганізми. Але з метою промислового отримання ферменту тривалий час використовуються переважно дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* (див. табл.2.1). Адже, дріжджі роду *Saccharomyces* мають значну інвертазну активність та достатньо великий вихід цільового продукту.

Час культивування різних продуцентів коливається в межах від 30 до 48 годин. Для виробництва час культивування є одним з важливих параметрів тому, що це дає змогу скоригувати та скоротити витрати електроенергії та дати можливість обрати найбільш оптимального продуцента в майбутньому.

Проте, головним показником для вибору мікроорганізма-продуцента є активність ферменту, що він синтезує. Найвищою активністю володіє *Saccharomyces cerevisiae* Т-32 – 26,5 од/мг, найнижчий показник спостерігається у *Aspergillus niger* В-3 - 4,0 од/мг.

					НУХТ БТЕК 03.01ск.06 ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Шевченко Т.В.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		
Перевір.		Удимович В.М.			Літ.	Арк.	Аркушів
Реценз.						1	9
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.					

Характеристика продуцентів інвертази

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Питома інвертазна активність, од/мг	Трив. культивування, год	Особливості процесу біосинтезу	Викор. літ.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> T-32	<ul style="list-style-type: none"> • Пептон-20 • Сахароза-30 	26,5	48	Використання дводобового інокуляту. Умови культивування - рН 5,8.	[10]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SAA-612	<ul style="list-style-type: none"> • Сахароза-20 • Дріжджовий екстракт-10 • (NH₄)₂SO₄-1,0 • MgSO₄-0,75 • K₃PO₄ -3,5 	15,0	30	Оптимізація стану культури проводилась за допомогою методики поверхневої відповіді. Умови культивування: рН=8, τ =25.	[6]
<i>Aspergillus niger</i> B-3	<ul style="list-style-type: none"> • Сахароза – 150 • NH₄NO₃ – 2,5 • MgSO₄ – 0,25 • KH₂PO₄ – 0,16 	4	48	Умови культивування: рН=6,5	[22]

**Вартість компонентів поживного середовища
для культивування продуцентів:**

Біологічний агент (назва і номер штаму)	Концентрація кожного компонента середовища, г/л	Ціна компонента поживного середовища, грн/кг	Вартість компонента (грн) для приготування 1 л середовища	Джерело інформації *
1	2	3	4	5
<i>Saccharomyces cereviliae</i> T-32	Пептон-20,0	1218,0	24,36	[1]
	Сахароза-30,0	66,0	1,98	[2]
	Вартість 1 л середовища – 26,34 грн			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SAA-612	Сахароза-20,0	66,0	1,32	[2]
	Дріжджовий екстракт-10,0	1232,0	12,32	[3]
	(NH ₄) ₂ SO ₄ -1,0	10,0	0,01	[4]
	MgSO ₄ -0,75	8,00	0,0006	[5]
	K ₃ PO ₄ -3,5	69,00	0,24	[6]
	Вартість 1 л середовища – 13,89 грн			
<i>Aspergillus niger</i> B-3	Сахароза – 150	66,0	9,9	[2]
	KH ₂ PO ₄ – 0,16	114,0	0,018	[7]
	MgSO ₄ – 0,25	8.00	0,0002	[5]
	NH ₄ NO ₃ – 2,5	53.1	0,133	[8]
	Вартість 1 л середовища – 10,05 грн			

Примітка: *- ціни наведені станом на квітень 2020

- <https://www.systopt.com.ua/ru/peptone-fermentatyvnyj-2/>
- <https://www.olx.ua/obyavlenie/sahar-roz-i-opt-fasovanyj-besplatnaya-dostavka-IDwLvky.html#cfb9e9cc69>
- www.balticbiotrade.com.ua/
- <https://prom.ua/p29068466-sulfat-ammoniya-nh42so4.html>
- <https://prom.ua/p1130593600-sulfat-magniya-magnij.html>
- <https://prom.ua/p1230897600-sulfat-magniya-magnij.html>
- <https://prom.ua/p151620028-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>
- <https://ogorod.ua/shop/1437/magazin/selitra-ammiachnaja-nitrat-ammonija-nh4no3>

Saccharomyces cerevisiae T-32 достатньо добре розвивається на різноманітних поживних середовищах, синтезує інвертазу, що забезпечує можливість використовувати цей штам для зброджування різних видів сировини. Час культивування становить 40 год, та найбільшу активність β-фуранозидази 26,5од/мг (див. табл. 2.1).

Saccharomyces cerevisiae SAA-612 може розвиватися на різноманітних за складом середовищах. Але при наявності переваги у часі культивування (30 годин), β-фуранозидазна активність є меншою (15,0 од/мг).

Aspergillus niger B-3 також має здатність до розвитку на різноманітних за складом середовищах, однак при наявності переваги у вартості 1 л поживного середовища, ферментаційна активність є доволі низькою, лише 4 од/мг.

Провівши аналіз поживних середовищ для культивування продуцентів з різною інвертазною активністю за вартістю (табл. 2.2, 2.3), можна дійти до висновку, що найбільш конкурентно спроможним виявся рід дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612, адже середовище для його культивування виявилось дешевшим в порівнянні з *Saccharomyces cerevisiae* T-32, час культивування є меншим (що зменшує загальні витрати на виробництво), відповідно і вартість цільового продукту виявилась найбільш прийнятною для промислового використання.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 мг цільового продукту інвертази

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн.	Питома інвертазна активність, од/л	Умовна вартість 1 од цільового продукту, грн/од	Тривалість культивування, год	Активність ферменту утвореного за годину, од/год
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> T-32	26,34	26500	$9,94 \times 10^{-4}$	48	662,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SAA-612	13,89	15000	$9,26 \times 10^{-4}$	30	500
<i>Aspergillus niger</i> B-3	10,05	4000	$2,51 \times 10^{-3}$	48	250

Проаналізувавши дані з (табл.2.1, 2.2, 2.3) можна дійти до висновку, що не зважаючи на низьку фруктофуранозидазну активність продуцентом з найбільш економічно вигідним, для синтезу зазначеного вище ферменту є дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612.

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

Морфолого-культуральні ознаки. Клітини *S. cerevisiae* мають округлу, яйцевидну або еліпсоїдну форму; розмір їх коливається від 2,5 до 10 мкм в ширину і від 4,5 до 21 мкм в довжину (рис.2.1) [6,9,16,20].

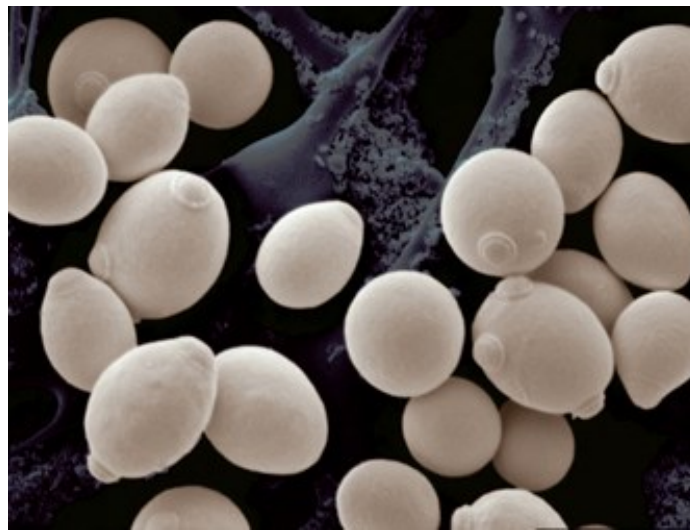


Рис. 2.1. Клітини *Saccharomyces cerevisiae*

Температурний діапазон росту дріжджів складає близько 30 ° С. Можуть рости в межах рН від 3,0 до 8,0; оптимальне значення рН 5,0.

Вигляд клітин (форма і розмір) одного і того ж штаму визначається генетично і може відрізнятися в визначених межах залежно від умов. Вегетативна фаза диплоїдна, рідко вищої плоїдності. Аскоспори мають гладку стінку, в основному еліпсоїдальної форми, рідко – овальні, 4 спори в аску.

Генетична інформація, що міститься в ядрі, розподілена між хромосомами - ниткоподібними структурами, що складаються з ДНК, основними білками - гістонами і деякою кількістю негістонових білків. У *S.cerevisiae* 17 хромосом. Для порівняння: у бактерій - 1, у людини 46 хромосом. Розмір кожної хромосоми у дріжджів приблизно в два рази менше бактеріальної і в 100 разів менше, ніж у людини [6,11,16].

Клітинна стінка дріжджів *Sacharomyces cerevisiae* складається з внутрішнього глюканового шару, який надає їй міцності, та зовнішнього манопротеїнового шару, що має захисну функцію. Манопротеїни утворюють зовнішній електроннощільний фібрилярний шар клітинної стінки. Вони складаються з олігосахаридної частини, утвореної залишками манози, та білка. За типом зв'язку з олігосахаридом розрізняють N-глікозильовані й O-манозильовані білки [16].

Добре ростуть на різних поживних середовищах. На глюкозо-пептонному дріжджовому агарі спостерігається інтенсивний ріст по штриху, консистенція пастоподібна, колір штриха білий, злегка кремового відтінку (рис.2.2). Клітини великі, яйцеподібні.



Рис. 2.2. *S. cerevisiae* на глюкозо-пептонному агарі

На сусло-агарі ріст також інтенсивний (рис 2.3), колонії злегка кремового кольору, щільної консистенції, з гладкою поверхнею, ріст рівномірний, клітини великі, овальні.



Рис.2.3. *S. cerevisiae* на сусло-агарі

При рості у рідких середовищах дріжджі викликають помутніння, утворюють осад [11,16,17].

Фізіолого-біохімічні ознаки. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* є хемоорганогетеротрофами і використовують органічні сполуки як для отримання енергії, так і як джерело вуглецю. Їм необхідний кисень для дихання, проте за його відсутності багато видів здатні отримувати енергію за рахунок анаеробного дихання (бродиння) з виділенням спиртів, тобто вони є факультативними анаеробами.

Saccharomyces cerevisiae інтенсивно зброджують різні субстрати, але в анаеробних умовах перемикаються на дихальний обмін. Дріжджі *S. cerevisiae* націло зброджують мальтозу, глюкозу, сахарозу, частково галактозу. Не

зброджують лактозу, арабінозу, рамнозу, целобіозу, трегалозу, мелибіозу, рибозу, рибіт, D-маніт. Асимілюють інвертазу; характерно максимальне споживання сахарози. Частково асимілюють галактозу .

З джерел азоту не здатні споживати триптофан, гістидин, пролін, фенілаланін, споживають аспарагінову кислоту, метіонін, глютамінової кислоти, аргінін, лейцин, валін, треонін [11,16].

При рості в аеробних умовах при низькому вмісті глюкози в середовищі, дріжджі одержують АТФ за рахунок процесів дихання. Повне окислення субстрату до вуглекислого газу і води може відбуватися у дріжджів за допомогою трьох різних механізмів: в циклі трикарбонових кислот, в гліюксилатному циклі і в пентозофосфатному циклі.

Життєвий цикл клітин *Saccharomyces cerevisiae* полягає у тому, що вони можуть жити і рости у двох формах, гаплоїдній і диплоїдній. Гаплоїдні клітини здатні тільки до вегетативного розмноження. При цьому на молодій клітині утворюється брунька, що поступово збільшується в розмірі. При збільшені бруньки між нею і клітиною з'являється перетяжка, яка поступово звужує канал з'єднання створеної дочірньої клітини з материнською. За сприятливих умов даний процес триває орієнтовно близько 2 годин.

Диплоїдні клітини також здатні до мітозу і брунькування, але за умовами стресу вони проходять процес споруляції, мейозу, і утворюють гаплоїдні спори, що проростають у гаплоїдні клітини.

Гаплоїдні клітини можуть мати один з двох типів спаровування, α і a . Клітини двох різних типів здатні до спаровування з утворенням диплоїдної клітини, що є примітивною формою статевого розмноження. Тип спаровування визначається єдиним генетичним локусом, який у свою чергу управляє статевою поведінкою як гаплоїдних, так і диплоїдних клітин. За допомогою генетичної рекомбінації, гаплоїдні клітини можуть перемикає тип спаровування на кожному клітинному циклі [11,16].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Дріжджі класифікують за способами їх вегетативного розмноження (брунькування, ділення), здатністю до спороутворення, а також за фізіологічними ознаками. Перша класифікація базувалася лише на морфолого-фізіологічних властивостях дріжджів, наступна класифікація враховувала й належність видів до певних місць існування та їх адаптацію до цих умов [11,20].

Опублікована класифікація Н.Дж.В. Крегер-ван Рій 1984 року протягом майже 16 років вважалася найповнішою.

Четверте видання Визначника дріжджів 1998 року за редакцією американських учених К.П. Куртцмана та Дж.В. Фела. Філогенетична класифікація дріжджів К.П. Куртцмана з'явилася у 2000 р.

У 2006 р. опубліковано філогенетичну класифікацію аскоміцетних дріжджів.

Таблиця 2.4

Таксономічна група	Класифікація Н. Дж. В. Крегер-ван Рій (1984 р.)	Класифікація К.П. Куртцмана (2000 р.)	Філогенетична класифікація аскоміцетних дріжджів
Відділ		-	-
Підвідділ	<i>Ascomyotina</i>	-	<i>Saccharomycotina</i>
Клас	<i>Hemiascomycetes</i>	<i>Hemiascomycetes</i>	<i>Saccharomycetes</i>
Порядок	<i>Endomycetales</i>	<i>Saccharomycetales</i> (синонім <i>Endomycetales</i>)	<i>Saccharomycetales</i>
Родина	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Candidaceae</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>
Рід	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces</i>
Вид	<i>Cerevisiae</i>	<i>Cerevisiae</i>	<i>Cerevisiae</i>

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Цукровий діабет – доволі складне та прогресуюче захворювання, під час якого високий ризик розвитку мікросудинних і кардіоваскулярних ускладнень в організмі людини. Але, попри те, що за останній час досягнуто значних успіхів у розумінні природи розвитку цукрового діабету, захворювання і надалі залишається доволі серйозною медичною і соціальною проблемою не лише в Україні, але й за кордоном. Це зумовлено тривожною тенденцією збільшення зростання числа хворих. Основні причини росту кількості хворих з цукровим діабетом: інтенсивний вплив факторів ризику на населення (нераціональне харчування, гіподинамія, надмірна маса тіла/ожиріння, хронічний стрес тощо). Цукровий діабет (ЦД) входить до п'ятірки найбільш поширених хронічних неінфекційних захворювань, що є особливо актуальні у всьому світі. Останніми десятиріччями відзначається катастрофічне зростання рівня захворюваності на ЦД. За даними Міжнародної діабетичної федерації станом на кінець 2019 року 4,2 млн. людей в світі помирли від причин, що пов'язані з ЦД. Смерть від діабету та його ускладнень відбувається кожні 7-8 секунд. Основними причинами та факторами хвороби вважається генетична схильність, ожиріння, захворювання підшлункової залози, стреси, певні вірусні захворювання - краснуха, вітряна віспа, гепатити [1-3].

За даними Центру медичної статистики Міністерства охорони здоров'я України станом на 01 січня 2017 року (більш актуальні дані щодо кількості хворих відсутні у зв'язку з тим, що починаючи з 01.01.2017 МОЗ України зменшило процес моніторингу, а статистика, що смертей від ЦД взагалі скасована) в Україні зареєстровано близько 1 223 500 хворих на цукровий діабет (з них 200 тис. –

					НУХТ БТЕК 03.01ск.06 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шевченко Т.В.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Удимович В.М.					1	8
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

інсулінозалежні). За підрахунками Міжнародної діабетичної федерації розповсюдженість ЦД в нашій країні складає 3,5 – 4%. Варто зазначити, що при лікуванні хворим на цукровий діабет приписують дієтотерапію, згідно з якою необхідною є заміна білого кристалічного цукру на цукрозамінники природного походження, виключення з щоденного раціону харчування продуктів десертного ряду [4].

На сьогодні харчова промисловість пропонує різноманіття харчових продуктів для людей, що хворі на цукровий діабет (печиво, батончики, хлібці, тощо). Їх головна особливість полягає у заміні масової частки цукру (глюкози) на фруктозу чи будь-які інші цукрозамінники, що у свою чергу попереджує ризик різкого збільшення глюкози у крові та до подальшого погіршення стану людини [4-5].

Останнім часом, увага дослідників і виробників зосереджена на використанні в якості цукрозамінника – моносахариду фруктози. Це насамперед пов'язано із впровадженням інноваційних технологій її виробництва та економічною доцільністю у технологіях продуктів дієтичного призначення.

Фруктоза має солодкість 1,7, порівняно із цукровою солодкістю, її засвоєння організмом не потребує інсуліну та не впливає на загальний рівень цукру в крові. Даний моносахарид має кращу розчинність у воді, ніж сахароза (її розчинність за температури 30°C – 84,34 г, сахарози – 70,42г). Розчин фруктози має меншу густину та зброджується дріжджами. Рекомендована добова доза фруктози у продуктах харчування для хворих на діабет – не більше 20 г, при вазі у 60 кг, тобто не більше 3 г на 1 кг маси тіла людини. Частина цієї норми припадає на солодкі продукти природного походження (фрукти, мед та ін.), що у сумі становить близько половини від загально дозволених 20 г фруктози [7,8].

При проведенні попереднього розрахунку необхідної кількості ферменту для забезпечення 1 223 500 хворих, необхідно виготовити досить велику кількість продукту. Отже, враховуючи значний тонажний об'єм виробництва, було прийнято рішення здійснити на початковій стадії виробництво для забезпечення потреб 100000 хворих на цукровий діабет. Виходячи з цього, нам необхідно

розрахувати добову потребу у фруктозі для 100000 хворих на діабет по Україні на один день:

$$100 \times 10^3 \times 10 \text{ г} = 100 \times 10^4 \text{ г/добу} = 1000 \text{ кг/добу} = 1 \text{ тонна}$$

Потреба у фруктозі на місяць:

$$1000 \times 30 = 30000 \text{ кг/місяць}$$

Для забезпечення продукції на рік:

$$150000 \text{ кг} \times 12 = 360000 \text{ кг/рік} = 360 \text{ тон/рік}$$

3.2. Розрахунок потужності виробництва інвертази для виробництва фруктози

Враховуючи той факт, що було прийнято рішення зробити розрахунок забезпечення фруктозою 100000 хворих на цукровий діабет, підприємство має виробляти 360 тон продукту на рік. Згідно з літературними даними [9, 10, 12], 4 од акт. ферменту розщеплюють 1г сахарози, Для одержання 360 тон фруктози на рік, необхідно використати:

$$X - 360000000 \text{ г}$$

$$4 \text{ од. акт.} - 1 \text{ г, тоді}$$

$$X = 1440002200 \text{ од. акт. ферменту } \beta\text{-фуранозидази.}$$

Оскільки активність ферменту становить приблизно 17800 од. акт., а необхідна кількість для забезпечення 100000 людей становить 1440002200 од. акт. отримаємо необхідну кількість β -фуранозидази в грамах згідно розрахунку, що наведений нижче (за пропорцією):

$$17800 - 1 \text{ г}$$

$$1440002200 - x$$

$$X = 80899 \text{ г інвертази.}$$

Згідно з наведеними вище даними можна розрахувати потужність виробництва продукту.

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд} = 300$), враховуючи втрати (20%) [11], кількість препарату інвертази на добу ($G_{нтд}$) становитиме:

$$G_{нтд} = G_{нт} / T_{рд} = 80899 / 300 = 270 \text{ г/добу}$$

Кількість готового препарату за цикл, кг/цикл:

$$G_{цк} = G_{нтд} \times T_{ц} / 24 = 270 \times 48 / 24 = 0,540 \text{ кг/цикл}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за один виробничий цикл:

$$V_{кр} = K_1 \times G_{цк} \times CP_{гп} / P_{кр} \times (1 - E_{св}) = 1,1 \times 0,540 \times 0,9 / 2 \times (1 - 0,15) = 0,314 \text{ м}^3$$

$K_1 = 1,1$ - коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій;

$CP_{гп}$ – вміст сухої речовини в готовому продукті (0,9);

$P_{кр}$ – концентрація продукту в культуральній рідині (2 г/л);

$E_{св}$ – сумарні втрати при виділенні готового продукту (0,15).

Вихід препарату у кг з 1 м³ культуральної рідини:

$$P_{кр} = G_{цк} / V_{кр} = 0,540 / 0,314 = 1,7 \text{ кг}$$

Визначаємо кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{цк} = G_{нт} / G_{цк} = 80899 / 540 = 150 \text{ цикли}$$

Отже, приймаємо 150 виробничі цикли.

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби в інвертазі та геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення нормального функціонування виробничого підприємства, що займається виробництвом дієтичного харчування для людей, що хворі на цукровий діабет, необхідно 360 тон фруктози на рік.

Розрахуємо, кількість інвертази, що потрібно отримати за цикл ферментації для підрахунку кількості стадій приготування посівного матеріалу.

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд}=300$), враховуючи втрати (20%) [11], кількість препарату інвертази на добу ($G_{нпд}$) становитиме:

$$G_{нтд} = G_{нт}/T_{рд} = 80899/300 = 270 \text{ г/добу}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за один виробничий цикл, з урахуванням втрат:

$$V_{кр} = K_1 \times G_{цк} \times CP_{гп} / P_{кр} \times (1 - E_{св}) = 1,1 \times 0,540 \times 0,9 / 2 \times (1 - 0,15) = 0,314 \text{ м}^3$$

$K_1 = 1,1$ - коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій;

$CP_{гп}$ – вміст сухої речовини в готовому продукті (0,9);

$P_{кр}$ – концентрація продукту в культуральній рідині (2 г/л);

$E_{св}$ – сумарні втрати при виділенні готового продукту (0,15).

Геометричний об'єм ферментера для отримання $0,314 \text{ м}^3$ культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_{г} = V_{крц}/K_{зап} = 0,314/0,6 = 0,52 \text{ м}^3,$$

де $K_{зап}$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Виходячи з того, що потрібного нам ферментера для отримання $0,314 \text{ м}^3$ культуральної рідини, геометричним об'ємом $0,52 \text{ м}^3$ не існує, обираємо найближчий за геометричним об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 0,63 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зф} = V_{ф}/V_{сф1} = 0,314 / 0,63 = 0,5, \text{ що не перевищує заданих значень.}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки інокулятора

В підрозділі 3.3 було проведено розрахунки, за результатом яких ми обрали стандартний ферментер, геометричним об'ємом $0,63 \text{ м}^3$. Виходячи з цього в одному ферментері за виробничий цикл отримують $V_{кр} = 0,314 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб1}} = 0,314 \text{ м}^3$.

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

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_a) = 0,314 / (1 + 0,1) = 0,285 \text{ м}^3,$$

де $X_a = 0,1$ – частка, кількість посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 0,314 - 0,285 = 0,029 \text{ м}^3$$

Для одержання $0,029 \text{ м}^3$ інокуляту у ферментері враховуємо втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 ... 15% (приймаємо за 10%).

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті з урахуванням потенційних втрат становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 0,029 / (1 - 0,1) = 0,032 \text{ м}^3$$

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

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Звідси кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_a) = 0,032 / (1 + 0,1) = 0,029 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,032 - 0,029 = 0,003 \text{ м}^3 \text{ або } 3 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.2}} = 0,032 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування дріжджів в інокуляторі геометричним об'ємом:

$$V_{\text{геом.2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап.}} = 0,032 / 0,6 = 0,053 \text{ м}^3 \text{ або } 53 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сф2}} = 0,06 \text{ м}^3$, та перевіряємо обраний коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф2}} = 0,032 / 0,06 = 0,53.$$

$K_{\text{зап2}}$, що становить 0,53, не перевищує заданого значення.

Для одержання $0,003 \text{ м}^3$ посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 ... 15% (приймаємо за 10%).

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 0,003 / (1 - 0,1) = 0,0033 \text{ м}^3$$

Кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{а}}) = 0,0033 / (1 + 0,1) = 0,003 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 0,0033 - 0,003 = 0,0003 \text{ м}^3 \text{ або } 0,3 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.3}} = 0,0033 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування дріжджів у посівному апараті геометричним об'ємом:

$$V_{\text{геом.3}} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап.}} = 0,0033 / 0,6 = 0,0055 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор на $0,01 \text{ м}^3$, далі уточнюємо коефіцієнт заповнення прийнятий раніше:

$$K_{\text{зап.3}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{станд. геом.}} = 0,0033 / 0,01 = 0,3,$$

що не перевищує заданого значення.

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{пм3}} = 0,3 \text{ л}$ можна одержати культивуванням *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612 у качалочних колбах.

Вирощування посівного матеріалу проводять у колбах $V=750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$.

Тоді кількість колб для одержання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пмз}} / (V_{\text{колб}} \times K_{зк}) = 300 / (750 \times 0,2) = 2.$$

Таким чином для одержання посівного матеріалу необхідно 2 колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу інвертази для подальшого виробництва у ферментері об'ємом $V_{\text{геом.}} = 0,63 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи:

I етап. Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці. Кількість колб ($V=750$ мл) – 2. $K_{зк} = 0,2$.

II етап. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом $0,01 \text{ м}^3$. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу становить $V_{\text{робз}} = 0,3$ л.

III етап. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом $0,06 \text{ м}^3$. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу становить $V_{\text{роб2}} = 0,0029 \text{ м}^3$.

Виробничий біосинтез. Об'єм ферментера $0,63 \text{ м}^3$. $K_{зк} = 0,65$. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу становить $V_{\text{роб1}} = 0,314 \text{ м}^3$.

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Для виробництва β -фуранозидази (інвертази) в проекті передбачається застосовувати продуцент *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612. Даний продуцент є мезофілом – оптимум температури становить 30-40°C та нейтрофілом з рН 6,0 [6].

Saccharomyces cerevisiae SAA-612 є факультативним анаеробом, - може рости як і за наявності кисню, так і без кисню. В анаеробних умовах продуцент реалізує спиртове бродіння, при якому спостерігається невеликий приріст біомаси. При аеробному культивуванні відбувається активне накопичення біомаси та синтез β -фуранозидази.

Тривалість культивування дріжджів повинно становити 48 години.

Необхідно відзначити, що в промисловості дріжджі зазвичай культивують глибинним способом. Зважаючи на вище наведену інформацію, технологічне одержання β -фуранозидази буде передбачати глибинне культивування продуцента в асептичних умовах. Також буде передбачено підтримку оптимальних параметрів, таких як температура, рН та аерація. Для забезпечення додаткових асептичних умов передбачається використання труби перетискування між інокулятором та посівним апаратом під час підготовки посівного матеріалу, та між посівним апаратом та виробничим ферментером після накопичення достатньої кількості посівного матеріалу [6,11].

					НУХТ БТЕК 03.01ск.06 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		<i>Шевченко Т.В.</i>			РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		<i>Удимович В.М.</i>					1	12
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>						

4.1.1. Обґрунтування способу культивування та типу виробничого ферментеру

Для виробництва β -фуранозидази в проекті передбачається використання продуцент *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612. Даний продуцент є мезофілом – оптимум температури становить 30-40°C та нейтрофілом з рН 8,0 [6,11, 12].

Тривалість культивування дріжджів становить – 48 годин. Отже передбачається періодичний спосіб культивування.

Потрібно також зауважити, що в промисловості дріжджі культивують глибинним способом. Зважаючи на вище наведену інформацію, технологічне одержання β -фуранозидази буде передбачати глибинне культивування продуценту в асептичних умовах. Також буде передбачено підтримку оптимальних параметрів, таких як температура, рН та аерація.

Глибинне культивування відбувається у вертикальних герметичних ємностях різного габаритного розміру, які називаються ферментерами (рис. 2.1). Однією з головних та основних вимог до ферментера повинна бути можливість проведення процесу культивування штаму-продуцента в асептичних умовах при інтенсивній аерації та перемішування середовища. Для постійного підтримання стерильних умов культивування, ферментери повинні бути абсолютно повністю герметичними, а лінії трубопроводів мають бути легкодоступні до миття та обробки гарячою парою для забезпечення їх стерилізації.

В даній роботі, для культивування продуцента *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612, з подальшою метою отримання цільового продукту β -фуранозидази, передбачено використання ферментера об'ємом 0,63 м³.

Так як, продуцент *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612, є факультативним анаеробом, тобто може існувати як за відсутності кисню, так і за його присутністю, то для отримання цільового продукту більш доцільним є використання ферментера з пневматичним перемішуванням і аерацією середовища. Усередині такого ферментера вмонтовуються форсунки, дифузори, барботери для подачі повітря.

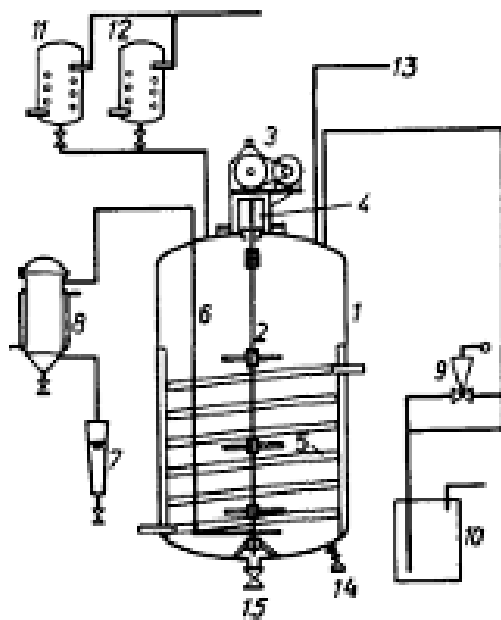


Рис. 2.1 Схема ферментера із допоміжними пристроями

Дуже важливо переконатися, що у ферментері повністю забезпечуються асептичний режим культивування, дотримання всіх параметрів вирощування мікроорганізму і створюються сприятливі умови для біосинтезу цільового продукту. Для дотримання цих вимог, ферментер повинен витримувати жорстку стерилізацію і працювати протягом всього культивування під незначним надмірним тиском.

4.1.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Оскільки продуцент β -фуранозидази є факультативним анаеробом, а для отримання ферменту необхідне культивування в аеробних умовах, то необхідно підготувати стерильне аераційне повітря, що в подальшому буде подаватися до ферментера [14].

Технологічно й економічно виправданим для виробництва інвертази є очищення повітря за допомогою волокнистих та пористих матеріалів. Таким способом вдається отримати повітря з дуже високим ступенем очистки. Завислі в

повітрі частки затримуються волокнистим матеріалом завдяки інерційному та дифузійному механізму осадження. [13,23,24]

Відповідно до діючих стандартів фільтруючі елементи класифікуються на групи та класи відповідно до якості фільтрування (ефективності і проникності):

- фільтри для грубої очистки повітря;
- фільтри для тонкої очистки повітря;
- індивідуальні фільтри, що встановлюються безпосередньо перед ферментером або інокулятором [23-26].

Після забору повітря з атмосфери, повітря надходить на фільтр грубого очищення, де відбувається очищення до позначки близько 80%. Фільтри грубого очищення встановлюються та застосовуються одразу після забірних решіток шахти повітря та в якості попередньої очистки для систем кондиціонування повітря в приміщеннях. Головне завдання фільтрів грубої очистки - затримати великі механічні частинки розміром більше 5 мкм (пух, листя, тварини, волосся, цементний пил і т. ін.

Пропонується використовувати коміркові фільтри грубої очистки, такі як ФЯУ, ФЯП, ФЯР, які відрізняються лише типом фільтруючого матеріалу.

Типи фільтруючих матеріалів, що застосовується:

- ультраскло,
- хімволокно,
- поліуретан,
- поліестер,
- фільтрувальний папір та інші.

У якості фільтрувального матеріалу ми обираємо хімволокно, через його переваги:

- Багаторазове викристання за рахунок заміни тільки фільтруючого матеріалу.
- Низький початковий опір.
- Жорстка металева рамка.
- Пожегобезпечний матеріал.

Фільтри тонкого очищення повітря найчастіше застосовують для другого ступеня очищення повітря. Пропонується використання картриджного фільтра моделі FMW. Це доволі ефективний фільтр, що має компактну конструкцію та ступінь очищення повітря більше 99%. Продуктивність фільтра становить 2000 м³/год [25].

Переваги зазначеного фільтра:

- безперервне та автоматичне очищення фільтруючих картриджів стисненим повітрям;
- подвійна система очищення застосовуваних картриджів за допомогою часового таймера та застосовуваного датчика перепаду тиску;
- ефективність очищення понад 99% для частинок розміром до 0,5 мікрон;
- легкодоступність в технічному обслуговуванні - необхідно тільки звільнити пилозбірники від пилу,
- в конструкції використовуються екологічно чисті матеріали;
- стійка конструкція, яка є витривала до впливу зовнішніх факторів,

Для остаточної очистки повітря від частинок, що містяться в ньому, і мікрофлори застосовують фільтри HEPA фірми «New filter». Фільтруючий матеріал – скловолокно, упаковане вигляді малих складок(мінігофр). Цей матеріал гідрофобний, стійкий до хімічно агресивних середовищ і може експлуатуватися при температурі не вище 70 °С і відносній вологості до 100 %. Ступінь очистки 99,996%[25-28]

Стерилізують фільтри парою. Зміну фільтрів ведуть 1 раз на місяць

4.1.3. Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору миючих та/або дезинфікуючих засобів

Виробництво ферментного препарату інвертази здійснюється упродовж 270 днів на рік (див. розділ 3). Культивування продуцента *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612 здійснюється у 0,63 м³ ферментері, інокуляторі (0,06 м³), інокуляторі

0,01 м³, збірниках для підготовки та стерилізації компонентів поживного середовища, качалки, а також боксу та лабораторного устаткування.

Сода кальцинована – це хімічна сполука, натрієва сіль вугільної кислоти, тверда речовина у вигляді білого порошку. Натрій вуглекислий (ще одна загальноприйнята назва речовини) – популярний в побуті і різних промислових напрямках продукт. Багатьом господарям відомий як ефективний чистяче – мийний засіб, якому під силу легко і швидко видалити плями жиру зі скла, порцеляни й емальованих поверхонь. Часто його використовують при ручному пранні білизни, щоб пом'якшити тверду воду. Тому закономірно, що карбонат натрію – популярний інгредієнт різноманітної побутової хімії: пральних порошоків, засобів для видалення накипу, хімічних композицій для пральних і посудомийних машин. Крім побутового застосування, ця речовина використовується в скловиробництві, виготовленні хімікатів, паперової та текстильної продукції. З її допомогою пом'якшують воду і виготовляють харчові продукти. Сода добре розчиняється у воді - розчинник обчислюється в 17,7% по масі при 20 °С, в той час як при досягненні 100 °С він досягає 31,3%. Водний розчин соди має лужну реакцію внаслідок гідролізу солі [29].

Супераль - сильно пінний миючий засіб з антимікробною дією для видалення пригорілі, карбонизованих і застарілих органічних забруднень з водостійких поверхонь ємностей, термокамер, грилів і коптилень, духовок, підлог, стін в виробничих приміщеннях і цехах на підприємствах харчової промисловості, громадського харчування.

Склад: комплекс ПАР і лугів, інгібітор корозії, комплексоутворювач, стабілізатор піни.

Опис продукту: однорідна рідина від кремового до коричневого кольору з незначними допустимими розшаруваннями; щільність 1,3 – 1,45 г / см³; рН = 11,0 – 13,0.

Вплив на поверхню: для поверхонь, стійких до сильних лугів, нержавіючої сталі, чавуну, керамічної плитки [30].

Хлорантоїн – дезінфікуючий засіб, засіб достерилізаційного очищення виробів медичного призначення.

Концентрація засобу для дезінфекції поверхні приміщень становить 0,2% для щоденного прибирання та 2% для генерального.

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас %: 1,3 – дихлор-5,5 – діметілгідантоїн (дихлорантин) – 21,5 – 23,5 (діючі речовини); 5,5 – діметілгідантоїн – 12,5 – 16,5; диспергатор (натрій триполіфосфат) 9,0 – 12,5; аніонні поверхнево – активні речовини – 3,2 – 5,0; інгібітор корозії (натрій бензоат) до 10,0; наповнювач до 100,0. Вміст активного хлору становит не менше 14,1%.

Розчини засобу *Хлорантоїн* застосовується:

- для дезінфекції та миття:
- поверхонь приміщень (підлога, стіни, тверда меблі, віконні рами, підвіконня, двері, стелю тощо),
- поверхонь обладнання (медичних та інших приладів, апаратів з лакофарбовим, гальванічним і полімерним покриттям, і виготовлених зі скла, гуми) в усіх галузях призначення;
- технологічного обладнання в харчопереробної, фармацевтичної, мікробіологічної та парфумерно – косметичної промисловості, тощо.

Спектр антимікробної дії. «*Хлорантоїн*» виявляє бактерицидні, віруліцидні (включаючи збудників поліоеміліту, грипу, парагрипу, коронавірусної, ротавірусної, аденавірусної інфекцій, гепатитів, ВІЛ, та ін), спороцидні та фунгіцидні (включаючи збудників кандидозів, дерматомікозів, плісняві гриби) властивості [31].

Вімол - засіб мийний технічний застосовується для механізованого способу мийки шляхом рециркуляції його розчинів, а також вручну шляхом занурення деталей обладнання, інвентарю та тари в робочі розчини препарату на підприємствах АПК. Він може використовуватися як активна миюча добавка до розчинів каустичної соди для підвищення миючого дії. *Вімол* може бути

застосовано для мийки обладнання, виготовленого з алюмінію, нержавіючої сталі, синтетичних матеріалів, скла, а також обладнання, покритого емаллю[32].

Отже, проаналізувавши *вище наведену інформацію*, для миття обладнання доцільно буде використовувати Кальциновану соду, а для миття стін, стелі, підлоги, вікон та дверей – «Хлорантоїн», оскільки враховуючи такі фактори як ефективність використання, концентрацію даних розчинів, та вартість за один літр (кілограм), витрати на їх придбання для всього періоду виробництва становлять найменше.

4.1.4. Особливості способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Склад поживного середовища для вирощування посівного матеріалу, інокулятора та виробничого біосинтезу виробництва ферменту β -фуранозидази продуцентом *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612 є незмінним і має наступний склад (г/л):

- Сахароза – 20,0 ;
- Дріжджовий екстракт – 10,0 ;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0 ;
- MgSO_4 – 0,75;
- K_3PO_4 – 3,5 [3].

Оскільки стерилізація відбувається за різних умов розділимо компоненти в колбах на качалках на три композиції. Інші компоненти стерилізуватимемо двома композиціями з додаванням кислоти.

Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для отримання необхідного посівного матеріалу у качалочних колбах на качалках необхідно 0,35 л середовища, саме тому стерилізація компонентів буде відбуватися у автоклаві при відповідних умовах стерилізації.

Компоненти середовища розбивають на наступні композиції:

Композиція А: сахароза, дріжджовий екстракт (стерилізація 112 - 115 °С, при 0,05 МПа, протягом 20 - 30 хв);

Композиція Б: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; MgSO_4 (стерилізація 131 °С, при 0,15 МПа, протягом 40 - 60 хв);

Композиція В: K_3PO_4 (стерилізація 131 °С, при 0,15 МПа, протягом 40-60 хв).

Культивування проводять в качалочних колбах ($V = 750$ мл, 3 колби та $K_3 = 0,2$), кількість обертів качалки становить 160 за хв.

Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі

На другому етапі необхідно одержати 3,6 л поживного середовища. Для цього використовують інокулятор геометричним об'ємом 10 л. Оскільки стерилізація компонентів поживного середовища відбувається за різних умов, розділимо середовище на три композиції:

Композиція А: сахароза, дріжджовий екстракт (стерилізація 112 - 115 °С, при 0,05 МПа, протягом 20 - 30 хв);

Композиція Б: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; MgSO_4 (стерилізація 131 °С, при 0,15 МПа, протягом 40 - 60 хв);

Композиція В: K_3PO_4 (стерилізація 131 °С, при 0,15 МПа, протягом 40-60 хв).

Зважаючи на те, що об'єм композицій не є надто великим, то їх стерилізація буде відбуватися у автоклаві.

Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті

На третьому етапі необхідно одержати 29 л поживного середовища. Для цього використовують посівний апарат геометричним об'ємом 60 л. Оскільки стерилізація компонентів поживного середовища відбувається за різних умов, розділимо середовище на дві композиції:

Композиція А: сахароза, дріжджовий екстракт (стерилізація 112 - 115 °С, при 0,05 МПа, протягом 20 - 30 хв);

Композиція Б: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; MgSO_4 (стерилізація 131 °С, при 0,15 МПа, протягом 40 - 60 хв);

Композиція В: K_3PO_4 (стерилізація 131 °С, при 0,15 МПа, протягом 40-60 хв).

Підготовка композицій буде відбуватися у відокремлених реактор, що встановлюватимуться безпосередньо поруч із посівним апаратом.

Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері

На даному етапі необхідно одержати 0,314 м³ поживного середовища. Для цього використовують ферментер геометричним об'ємом 0,63 м³. Оскільки стерилізація компонентів поживного середовища відбувається за різних умов, розділимо середовище на дві композиції:

Композиція А: сахароза, дріжджовий екстракт (стерилізація 112 - 115 °С, при 0,05 МПа, протягом 20 - 30 хв);

Композиція Б: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; MgSO_4 (стерилізація 131 °С, при 0,15 МПа, протягом 40 - 60 хв);

Композиція В: K_3PO_4 (стерилізація 131 °С, при 0,15 МПа, протягом 40-60 хв).

Підготовка композицій буде відбуватися у відокремлених реактор, що встановлюватимуться безпосередньо поруч із виробничим реактором.

4.1.5. Обґрунтування стадії підготовки обладнання та комунікацій

Підготовка обладнання як необхідна складова підготовки виробництва направлена виключно досягнення необхідного та прийняттого рівня чистоти та асептичності для подальшого запуску виробничого процесу. Наприклад, підготовка інокуляторів, ферментерів включає такі операції:

- миття обладнання;
- технічний огляд;
- перевірка на герметичність;

- стерилізація.

Після миття обладнання проводимо технічний огляд обладнання з метою виявлення можливих порушень щільності і розгерметизації в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У випадку виявлення не ущільнених ділянок проводять підтягування різьбових з'єднань, або за потреби заміну ущільнювачів.

Наступний етап підготовки обладнання до стерилізації полягає в подальшій перевірці їх на цілісність та герметичність. Закривають всю необхідну запірну арматуру ємнісного обладнання і подають аераційне повітря до набуття надлишкового тиску в середині апарату $P = 0,1 - 0,2$ МПа. Далі перекривають вентиль подачі повітря та фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30 – 60 хв) в операційному журналі проведення відповідного огляду. Апарат вважається герметичним та допущеним до експлуатації, якщо зниження тиску в апараті не перевищує 0,01 Мпа та менше. В іншому випадку необхідно здійснити належний пошук неущільнень та розгерметизацій за допомогою галогенових течієпошукачів. До апарату додають невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (доприкладу, чотирихлористий карбон), повторно перекривають всю необхідну запірну арматуру. Апарат розігрівають до температури 80 °С та збільшують тиск до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через неущільнення та зони розгерметизацій і виявляються у випадку наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість операції зазвичай становить 1,5 – 2 год. У випадку виявлення неущільнень та розгерметизацій здійснюють їх подальшу ліквідацію [13,24-26].

Стадія стерилізації є останньою у процесі підготовки обладнання. Для цього використовують термічну стерилізацію гострою водяною парою при надлишковому тиску $P = 0,05 - 0,1$ МПа при температурі 125 – 150°С. Стерилізацію можна умовно поділити на три етапи: нагрів апарата, витримання за температури стерилізації (стерилізація) та охолодження.

Нагрів апарата. Під час стерилізації апарата попередньо в сорочку подають глуху пару і прогрівають апарат до температури 80 – 90 °С.

Стерилізація. Необхідно відкрити всю, без винятків, запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях та подають гостру пару через барботер безпосередньо у внутрішній об'єм апарату або нижній спуск, завчасно відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для подальшого видалення повітря з апарату. Після досягнення в апараті температури стерилізації $t_{ст} = 125 - 150$ °С закривають усю запірну арматуру на апараті, крім парової, і витримують заданий час стерилізації.

Охолодження. Закриваються уся запірні арматура подачі пари в апарат.

У сорочку обладнання подається холодна вода. Для компенсації падіння тиску (утворення вакууму при конденсації пари в апараті) в апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури до $30 - 40$ °С і надлишкового тиску $P = 0,003 - 0,005$ МПа [24-26].

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. *графічна частина*), наведена у *табл. 5.1*.

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання виробництва препарату на основі *S. cerevisiae*

Позиція	Найменування	К-ть	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
P-1	Реактор-змішувач для приготування робочого розчину кальцинованої соди	1	Реактор-змішувач об'ємом 100 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12X18Н10Т. Виробник: «Фітохімфарм» (Україна) [33].
P-2	Реактор-змішувач для приготування робочого Хлорантоїну	1	Реактор-змішувач об'ємом 50 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12X18Н10Т. Виробник: «Фітохімфарм» (Україна) [33].
ПЗ-3	Пристрій для забору повітря	1	Повітрязбірник ВВ-3,2-1. Обладнаний металевією сіткою для видалення механічних забруднень [34].
Ф-4	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр першого ступеня очистки типу DF 1100. Фільтруючий матеріал – нетканний матеріал, продуктивність – 1100 E = 80 % [35].
К-5	Компресор	1	Гвинтовий компресор серії ADP720, продуктивність 300 м ³ /год, тиск всмоктування 1,0 Мпа [36].
Т-6	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач серії типу RA-200 фірми «ОМІ», продуктивність 20м ³ /хв [37].
P-7	Ресивер	1	Ресивер повітряний серії типу РВ 900/10 бежецкого заводу (Росія), об'єм 900 л, робочий тиск 10 Атм [38].

					НУХТ БТЕК 03.01ск.06 ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Шевченко Т.В.				Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Удимович В.М.					1	2
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.	Пирог Т.П.						
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ							

Завершення таблиці 5.1

T-8, T8.1	Теплообмінник-нагрівач	2	Теплообмінник нагрівач серії СВМ фірми " Systemair", потік повітря 1,5 м/с, виготовлений з листової сталі з алюцинковим покриттям [39].
Ф-9	Головний фільтр очистки повітря	1	Панельний осередковий фільтр класу F9. Фільтруючий матеріал мікроскловолокно. Максимальна робоча температура: 300 °С. Ступінь очищення становить 90- 99 % [40].
Ф-17 Ф-18 Ф-19	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Фільтри Donaldson P770735 виготовляється у вигляді фільтропатронів E = 99,99 % [41].
P-10 P-12	Реактор-змішувач для приготування композиції А	2	Реактори-змішувачі об'ємом 30 та 300 л. Реактори оснащені мішалками та рубашкою. Нержавіюча сталь [42].
P-11 P-13	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	2	Реактори-змішувачі об'ємом 30 та 300 л. Реактори оснащені мішалками та рубашкою регуляції темератури. Нержавіюча сталь [42].
P-11.1 P-13.1	Реактор-змішувач для приготування композиції В	2	Реактори-змішувачі об'ємом 30 та 300 л. Реактори оснащені мішалками та рубашкою регуляції темератури. Нержавіюча сталь [42].
I-14	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 10 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (до 20-1500 об/хв), сталь AISI 304. Виробник: «BIOSTAT Cplus» [43].
ПА-15	Інокулятор	1	Інокулятор, об'ємом 0,06 м ³ , оснащений паровою сорочкою, барботером, мішалкою, пробовідбірником, трубою перетискання та автоматичним датчиком рівня піни. Швидкість перемішування (до 8-500 об/хв). Нержавіюча сталь [43].
ФР-16	Виробничий ферментер	1	Ферментер об'ємом 0,63 м ³ оснащений мішалкою із нержавіючої сталі, швидкість перемішування (до 16- 1000 об/хв). Також має барботер для подачі стерильного повітря та нижній спуск. Нержавіюча сталь [43].
3-21	Збірник зберігання культуральної рідини	2	Збірник оснащений кришкою, нижнім спуском, паровою сорочкою, перемішуючим пристроєм. Об'єм 1 м ³ ; н/сталь AISI 304 [44].
H-20	Насос відцентровий	1	Деталі, що стикаються з середовищем – нерж. сталь CF-3М 1.4404; Продуктивність: 1,5 м ³ /ч; Напор: 150 м (15 бар); Еластоміри: EPDM, витон, сикон, PTFE [45].

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612 для одержання ферменту β -фуранозидази включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка аераційного повітря і поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез протеолітичного ферменту).

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР 1.2.1. Приготування робочого розчину Кальцинованої соди

Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор-змішувач (Р-1) об'ємом 100 л вносять кальциновану соду та додають питну воду, вмикають перемішувальний пристрій (100 об/хв) та підігрівають глухою парою до температури 70-85 °С, до повного розчинення порошку.

ДР 1.2.2. Приготування робочого розчину Хлорантоїну

Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор-змішувач (Р-2) об'ємом 50 л вносять порошок Хлорантоїну, додають питну воду, що підігріта до температури 65 °С, та перемішують до повного розчинення.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання.

Щоденне прибирання приміщень проводиться за допомогою миючо-дезінфікуючого засобу Хлорантоїну (від ДР 1.2.2.) концентрацією 0,2%. Під час щоденного прибирання миють підлогу, та протирають ззовні апаратуру.

НУХТ БТЕК 03.01ск.06 ДП ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		<i>Шевченко Т.В.</i>			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		<i>Удимович В.М.</i>				1	11
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>					

РОЗДІЛ 6. ОПИС
ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Періодичність зміни ємності з миючим засобом кожні 30-35 м².

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

Для обробки виробничих приміщень при генеральному прибиранні використовують 0,2 % розчин Хлорантоїну (від ДР 1.2.2.). Генеральне прибирання проходить раз на місяць та включає миття дверей, стін та вікон.

Для перевірки мікробіологічної чистоти проводять мікробіологічний контроль (КУО < 300/см²).

ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1. Миття та ополіскування обладнання

Для миття обладнання та комунікацій застосовують розчин соди кальцинованої у концентрації 2 % (від ДР. 1.2.1) підігрітого до температури 70 – 85 °С. Розчином кальцинованої соди промивають обладнання протягом 1 години при постійному перемішуванні. Розчин, що було використано, надходить на подальшу стадію знешкодження відходів. Ополіскування здійснюють технічною або ж питною водою кімнатної температури. Потім, після зливу, вода направляється до стадії знешкодження відходів.

ДР 1.4.2. Технічний огляд

Після миття та ополіскування ємнісного обладнання проводять його візуальний огляд з метою виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні, а також пошкоджень, що можуть призвести до аварійних ситуацій. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань, заміну або ж ремонт.

ДР 1.4.3. Перевірка обладнання на герметичність

Вся запірна арматура ємнісного обладнання повністю щільно закривається, подається аераційне очищене повітря до моменту створення надлишкового тиску щонайменше $P = 0,1-0,2$ МПа. Потім закривають вентиль подачі повітря до апарату та фіксують показання манометра з часом витримки (експозиції) (30-60 хв) в операційному журналі до відповідної одиниці обладнання. Апарат вважається герметичним та допущеним до подальшої експлуатації, якщо падіння тиску не перевищує значення 0,01 МПа. В іншому випадку необхідно здійснити

пошук неущільнень та розгерметизацій за допомогою відповідних галогенових течієпошукачів. Для цього у внутрішній об'єм обладнання вносять незначну кількість леткої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон), закривають всю запірну арматуру. Апарат прогривають до температури значенням 80 °С і збільшують тиск до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через пошкодження та розгерметизації і виявляються у випадку наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість операції зазвичай становить 1 год. У разі виявлення неущільнень та розгерметизацій здійснюють їх подальшу ліквідацію.

ДР 1.4.4. Стерилізація обладнання

Нагрів апарата. Попередньо в сорочку апарата подають насичену пару і прогривають обладнання до температури 80 – 90°С.

Стерилізація. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат. В ферментер (ФР-16), інокулятор (І-14) та посівний апарат (ПА15) гостру пару подають через барботер, а в збірники – через нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації 130-135 °С закривають усю запірну арматуру, крім парової, і витримують 1,5 год (тиск 0,2 МПа). При стерилізації апарата паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря.

Охолодження. Закривають усю запірну арматуру подачі пари в апарат. Далі у сорочку подають холодну воду. Для компенсації падіння тиску в апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30 – 40 °С і надлишкового тиску $P = 0,003 - 0,005$ МПа.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрязабірник (ПЗ-4) на висоті 8 м (2 м від верхньої точки даху), де концентрація пилових часток і мікроорганізмів є мінімальною.

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення повітря

Попередню очистку повітря здійснюють у фільтрі (Ф-5), що забезпечує ступінь очищення 80%. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил, механічні частки діаметром 5–10 мкм затримуються.

ДР 2.3. Компресування повітря

Стиснення повітря відбувається за допомогою компресора (К-6), при цьому створюється тиск величиною 0,4 Мпа, температура повітря підвищується від 120 до 250°C. Знищується значна кількість контамінуючої мікрофлори.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи

Для видалення вологи, що утворилася при компресуванні, повітря піддають швидкому охолодженню до 15 – 18°C у теплообмінному апараті (Т-8.1), далі видалену вологу подають на ресивер (Р-7), у якому відбувається видалення зайвої вологи до $W = 60 \%$.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

З метою запобігання утворення конденсату пари, на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, охолоджене повітря у теплообміннику (Т-8) нагрівають до температури 25 – 30°C.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря пропускають через головний фільтр (Ф-9), в якому фільтрувальним матеріалом є мікроскловолокно. Ступінь очищення становить $E = 95 \%$.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом встановлюють індивідуальний фільтр (Ф-17, Ф-18, Ф-19), з відповідним фільтруючим матеріалом. Ступінь очищення становить $E = 99,999 \%$.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 300 мл в колбах на качалках

Вміст компонентів для приготування 300 мл наведено у *табл. 6.1.*

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,3 л середовища.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,0029 м ³ середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Сахароза	20	5,8	А	200
Дріжджовий екстракт	10	2,8		
Вода		191		
MgSO ₄	0,75	0,21	Б	50
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	0,29		
Вода		50		
K ₃ PO ₄	3,5	1,01	В	50
Вода		50		
Разом:		300		

ДР 3.1.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 5,8 г сахарози, 2,8 г дріжджового екстракту, переносять в колбу об'ємом 750 мл, додають 191 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С 40 хв.

ДР 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,21 г MgSO₄, 0,29 г (NH₄)₂SO₄ вносять в колбу об'ємом 100 мл, додають 50 мл дистильованої води, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С 40 хв.

ДР 3.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 1,01 г K₃PO₄, вносять в колбу об'ємом 100 мл, додають 50 мл дистильованої води, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С 40 хв.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

Вміст компонентів для приготування 3,5 л поживного середовища наведено в табл.6.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3,5 л середовища.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,5 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	20	66	А	1100
Дріжджовий екстракт	10	33		
Вода		1000		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	3,3	Б	1006
MgSO ₄	0,75	2,5		
Вода		1000		
K ₃ PO ₄	3,5	11,6	В	1012
Вода		1000		

ДР 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 66 г сахарози, 33 г дріжджового екстракту, переносять в колбу, додають 1000 мл питної води, перемішують. Стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С 40 хв.

ДР 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують (NH₄)₂SO₄ – 3,3 г, MgSO₄ – 2,5 г, переносять в колбу, додають 1000 мл питної води, перемішують. Стерилізують при температурі 131 °С 40 хв а автоклаві.

ДР 3.2.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують K₃PO₄ – 11,6 г, переносять в колбу, додають 1000 мл питної води, перемішують. Стерилізують при температурі 131 °С 40 хв у автоклаві.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 л

Вміст компонентів для приготування 3,5 л поживного середовища наведено в табл. 6.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 35 л середовища.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,035 м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	20	0,7	А	16,05
Дріжджовий екстракт	10	0,35		
Вода		15		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	0,035	Б	15,05
MgSO ₄	0,75	0,026		
Вода		15		
K ₃ PO ₄	3,5	0,11	В	5,011
Вода		5		

ДР 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують сахарозу - 700 г, дріжджовий екстракт - 350 г, у реактор об'ємом 30л (Р-10) додають 15 л питної води, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 35-40 °С до повного розчинення. В сорочку реактору подають гостру пару та стерилізують при температурі 112 °С протягом 40 хвилин. Після чого, самопливом розчин з реактора подають в посівний апарат (ПА-15).

ДР 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують (NH₄)₂SO₄ – 35 г, MgSO₄ - 26 г, вносять у реактор (Р-11), додають 15 л питної води, вмикають мішалку до повного розчинення. В сорочку реактора подають пару до температури 131 °С та стерилізують протягом 1 год. Після чого, самопливом розчин з реактора подають в посівний апарат (ПА-15).

ДР 3.3.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують K₃PO₄ - 110 г, вносять у реактор (Р-11.1), додають 5 л питної води, вмикають мішалку до повного розчинення. В сорочку інокулятора подають пару до 131 °С протягом 1 год та проводять стерилізацію. Після чого, самопливом розчин з реактора подають в посівний апарат (ПА-15).

ДР 3.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 630 л

Для вирощування інокуляту на даному етапі необхідно приготувати 353 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 353 л поживного середовища наведено в *табл. 6.4*.

Таблиця 6.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 353 л середовища.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,353 м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	20	7,06	А	210,59
Дріжджовий екстракт	10	3,53		
Вода		200		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	0,34	Б	70,6
MgSO ₄	0,75	0,26		
Вода		70		
K ₃ PO ₄	3,5	1,22	В	71,22
Вода		70,5		

ДР 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують сахарозу - 7,0 кг, дріжджовий екстракт – 3,4 кг, вносять у збірник об'ємом 300 л (Р-12) додають 200 л питної води, вмикають мішалку до повного розчинення. В сорочку реактора подають гостру пару та стерилізують при температурі 112 °С протягом 40 хвилин. Після чого, самопливом розчин з реактора подають у ферментер (Фр-16).

ДР 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують (NH₄)₂SO₄ – 0,34 кг, MgSO₄ – 0,26 кг, вносять у збірник об'ємом 100 л (Р-13), додають 70 л питної води, вмикають мішалку до повного розчинення солей. В сорочку реактора подають гостру пару та стерилізують при температурі 131 °С протягом 1 год. Після чого, самопливом розчин з реактора подають у ферментер (Фр-16).

ДР 3.4.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують K_3PO_4 – 1,22 кг, вносять у збірник об'ємом 100 л (Р-13.1), додають 70.5 л питної води, вмикають мішалку до повного розчинення солей. В сорочку реактора подають гостру пару та стерилізують при температурі 131 °С протягом 1 год. Після чого, самопливом розчин з реактора подають у ферментер (Фр-16).

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

*ТП 4.1. Підтримання колекційної культури *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612*

Колекційну культуру *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612 зберігають у пробірках зі скошеним сусло-агаром у спеціальному обладнанні, зазвичай холодильному за температури 2 – 4°С. Пересіви здійснюють кожні 3–4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

*ТП.4.2 Одержання робочої культури *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612 на чашках Петрі.*

Колекційну культуру, що зберігається у пробірках з вказаним вище середовищем, розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі з сусло агаром і вирощують при температурі 30°С.

ТП 4.3. Вирощування робочої культури

Отримані ізолювані колонії від *ТП 3.2* пересівають петлею в пробірки з середовищем складу (г/л): дріжджовий екстракт – 10, пептон – 20, декстроза – 20 (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Вирощують дріжджі при 30 °С впродовж 12 годин.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

У колбу об'ємом 750 мл з композицією А (від *ДР 3.1.1*) в асептичних умовах вносять композицію Б та В (від *ДР 3.1.2* та *ДР 3.1.3* відповідно). Перемішують і розливають стерильним мірним циліндром (200 мл) у дві качалочні колби об'ємом 750 мл у рівній пропорції.

Культивування *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612 здійснюють в колбах на качалці (320 об/хв) впродовж 12 год. Після вирощування інокуляту здійснюють мікробіологічний контроль в кожній колбі.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

В інокулятор (І-14), вносять композицію А (від ДР 3.2.1), композицію Б (від ДР 3.2.2) та композицію В (від ДР 3.2.3). Перед внесенням посівного матеріалу, відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю.

Посівний матеріал (від ТП 4.4) подають в асептичних умовах через стерильну засівну колбу, об'ємом 1 л.

Вмикають мішалку, подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку (для підтримання температури 28 – 30°C), та культивують впродовж 12 год. Кожні 4 – 6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

ТП 4.6. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 60 л

В посівний апарат (ПА-15), вносять стерильну композицію А (від ДР 3.3.1), композицію Б (від ДР 3.3.2) та композицію В (від ДР 3.3.3) при постійному перемішуванні. Перед внесенням посівного матеріалу, відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю.

Посівний матеріал (від ТП 4.5) подають в асептичних умовах через трубу перетискання, під надлишковим тиском, подаємо у виробничий ферментер.

Вмикають мішалку, подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку (для підтримання температури 28-30°C), та культивують впродовж 24 год. Кожні 4 – 6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування

У ферментер (ФР-16) подають стерильну композицію А (від ДР 3.4.1), композицію Б (від ДР 3.4.2) та композицію В (від ДР 3.4.3) при постійному перемішуванні. Перед внесенням посівного матеріалу, відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю.

Посівний матеріал (від *ТІІ 4.6*) подають через трубу перетискування з посівного апарату (ПА-15).

Вмикають мішалку, подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку та культивують при температурі 30 °С впродовж 48 годин.

Кожні 4 – 6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю, визначення рівня біомаси та концентрації.

Після завершення біосинтезу культуральна рідина з ферментеру (Фр-16) за допомогою насосу (Н-20) перекачується у збірник (З-21) для тимчасового зберігання

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Карта постадійного контролю

Карту постадійного контролю виробництва препарату за допомогою дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612 наведено у табл. 7.1.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 03.01ск.06 ДП ПЗ			
Розроб.		<i>Шевченко Т.В.</i>			РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		<i>Удимович В.М.</i>					1	12
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>						

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю отримання продукту за допомогою дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
ДР 1. Санітарна підготовка виробництва				
ДР 1.2. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів				
Кх, Кт 1.2.1. Приготування робочого розчину Кальцинованої соди	Концентрація розчину Кальцинованої соди	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 2%
Кх 1.2.2. Приготування робочого розчину Хлорантоїну	Концентрація розчину Хлорантоїну	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 0,2%
ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень				
Кх, 1.3.1. Щоденне прибирання приміщень	Підлога, ззовні апаратура. Чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кх, Км 1.3.2. Геренальне прибирання приміщень	Підлога, стіни, двері, вікна, ззовні апаратура. Чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду КУО < 800/см ²
ДР 1.4. Підготовка обладнання та комунікацій				
Кт 1.4.1. Миття та ополіскування обладнання	Мийний розчин, обладнання, температура розчину, тривалість, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки	t = 70°C, τ = 1-2 год

Кт 1.4.3. Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	$P = 0,2$ МПа, $\tau = 1$ год
Кт 1.4.4. Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	$P = 0,2$ МПа, $t = 130-135$ °С, $\tau = 1,5$ год
ДР 2. Підготовка аераційного повітря				
Кт 2.2. Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 80$ %, тиск згідно паспорту
Кт 2.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	$P = 0,4$ МПа $t = 120-250$ °С
Кт 2.4 Охолодження повітря та видалення зайвої вологи	Охолоджене повітря, повітря після видалення зайвої вологи, температура	Термометр технічний, психометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	$t = 30$ °С, $W = 60$ %
Кт 2.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 40$ °С
Кт 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі головного очищення	$E = 95$ %, тиск згідно паспорту
Кт 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	$E = 99,999$ %

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища				
ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 300 мл в колбах на качалках				
Кт, Км 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=112 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=130 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=130 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л				
Кт, Км 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=112 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=130 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=130 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

Кт, Км, Кх 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л	Посівний матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування, рН, температура, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, датчик рН, годинник, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	$\tau = 12$ год, $t = 28-30$ °С, рН = 6,8-7,0, X=0,8 г/л, n = 20-160 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 л	Посівний матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування, рН, температура, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, датчик рН, годинник, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	$\tau = 24$ год, $t = 28-30$ °С, рН = 6,8-7,0, X=0,8 г/л, n = 20-160 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 5. Виробничий біосинтез				
Кт, Км, Кх 5.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина, швидкість перемішування, температура, рН, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація інвертази	Термометр технічний, годинник, датчик рН, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль та визначення рівня біомаси проводять кожні 4-6 годин, концентрація ПАР визначається після закінчення процесу культивування	$t = 28-30$ °С, $\tau = 48$ год, рН = 6,8-7,0, n = 20-160 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти.

7.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль може здійснюватись шляхом розсіву на чашки Петрі з агаризованими середовищами або мікроскопіюванням. Більш доцільним є використання методу мікроскопіювання, адже процес розсіву на чашки Петрі є довготривалим. Для мікроскопіювання використовують препарат «роздавлена крапля».

Протягом усього процесу культивування періодично (кожні 4 – 6 год) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю (мікроскопіювання зразків та висів на щільні поживні середовища), визначення концентрації біомаси і цільового продукту, а також вмісту джерел вуглецю (сахарози) та азоту (сульфат амонію) [11,18,20,46].

Для приготування препарату за методом «роздавленої краплі» на поверхню чистого сухого предметного скла наносять краплю стерильної води. Скляною паличкою або бактеріологічною петлею в краплю вносять невелику кількість досліджуваної культури і обережно розподіляють її в рідині для отримання однорідної суспензії. Приготовану краплю накривають покривним склом, уникаючи утворення бульбашок повітря. Якщо частина рідини виступає за край покривного скла, надлишок середовища можна промокнути вузькою смужкою фільтрувального паперу. Мікроскопіюють системою зі збільшенням 40X (рис. 7.1). Спостерігають колонії. В препараті не допускається наявності жодних інших мікроорганізмів [18].

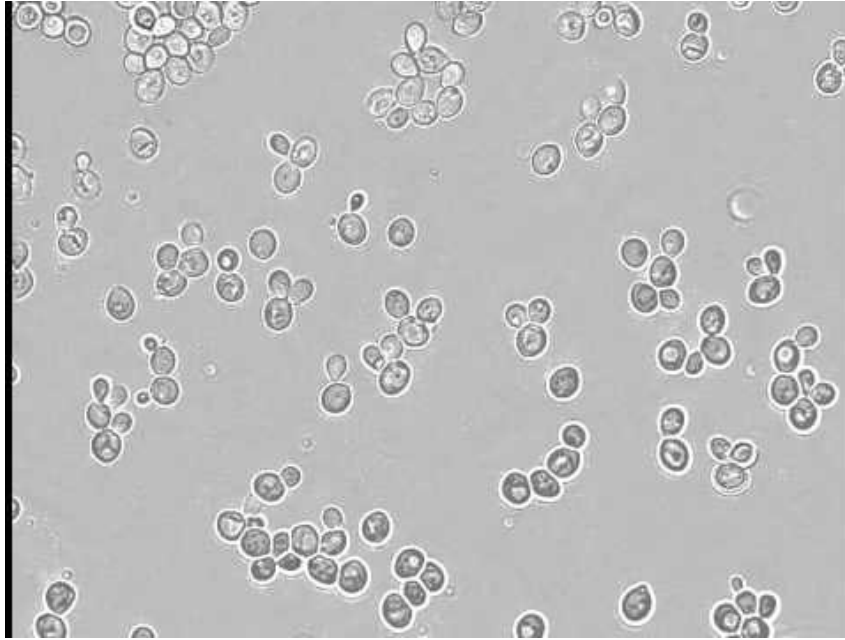


Рис. 7.1 *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612, збільшення під мікроскопом 40х

Крім цього, чистоту культур мікроорганізмів обов'язково перевіряють висівом на поживні середовища. Культуральну рідину *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612 розсівають петлею на чашки Петрі з м'ясо – пептоним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з суслоагаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) – для виявлення дріжджів і грибів. Критерієм чистоти є відсутність колоній інших мікроорганізмів. Посіви інкубують декілька діб при температурі 30 – 35 °С [18].

7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.3.1. Концентрація біомаси

У разі утворення гомогенної суспензії, концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії із наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком.

У пробірки із 9 мл стерильної води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтується, потім вимірюється оптична густина (при 540 нм). Концентрацію біомаси визначають за калібрувальним графіком [46].

За утворення конгломератів клітин концентрацію біомаси визначають ваговим методом. Для цього відбирають 25 мл культуральної рідини, центрифугують, осад клітин після центрифугування двічі промивають від залишків поживного середовища водою. Відмитий осад суспендують у воді, переносять у попередньо зважені бюкси і випарюють до постійної маси при 105 °С. Далі перераховують на вміст у г/л [18,19].

7.3.2. Визначення активності β -фруктофуранозидази (інвертази)

Інвертаза каталізує розщеплення сахарози на глюкозу і фруктозу. Активність інвертази можна визначити за ферментативним фотоколориметричним методом з застосуванням гексаціаноферрату калію (II).

За одиницю активності β -фруктофуранозидази приймають таку кількість ферменту, яка каталізує розщеплення 1 мкмоль сахарози за 1 хвилину при рН 4,6 та температурі 30°C.

Реактивами для визначення активності ферменту виступають: 1%-ий розчин сахарози; ацетатний буферний розчин з рН 4,6; 0,1 %-ий розчин гексаціаноферрату калію (II); розчин глюкозооксидази і пероксидази; глюкозооксидазний реактив (150 мг/л глюкозооксидази, 1,1 мг/л пероксидази, 1,034 г фенолу, 0,148 г 4-аміно-феназону, довести фосфатним буфером до 1 л, стабільний протягом 1 міс в посудині з темного скла при температурі 4°C); стандартний розчин глюкози.

Методика проведення аналізу. Розчини сахарози (2%), фермента (культуральна рідина) та дистильовану воду витримують в ультратермостаті з температурою 30 °С впродовж 15 – 20 хвилин для підігріву. В мірну колбу на 100 мл вносять 5 мл ферментного розчину, 10 мл субстрату та інкубують 10 хвилин в

ультратермостаті при 30 °С. Після чого відбирають 1 мл гідролізату в пробірку, що знаходиться в киплячій бані, витримують 2хвилини для інактивації ферменту і потім охолоджують під проточною водою. Для визначення вмісту глюкози в пробірку з охолодженим гідролізатом вносять 3 мл глюкозооксидазного реактиву, перемішують та залишають 45 хвилин при кімнатній температурі. Одночасно з цим готують контрольну пробу. Для цього 5 мл розчину ферментного препарату поміщають в пробірку та нагрівають 10 хвилин в киплячій водяній бані для інактивації ферменту. Після чого до розчину додають 10 мл субстрату та проводять все подальші операції так же, як і при роботі з досліджуваним зразком. Окрім вказаної контрольної проби, ставлять контрольну пробу на глюкозооксидазний реактив. Для цього до 2 мл реактиву додають 1 мл дистильованої води [19,21].

Після витримки досліджуваних та контрольний розчини набувають лимонно-жовтого забарвлення, інтенсивність якого визначають на фотоелектроколориметрі при світлофільтрі з довжиною хвилі 390 – 418 нм, в кюветі з товщиною поглинаючого світлого шару 10 мм. Якщо величини оптичних густин будуть вище або нижче меж, вказаних на градуовальному графіку, дослід повторюють з меншою або більшою кількістю досліджуваного препарату. Отримані значення оптичних густин використовують для визначення кількості глюкози, що входить в склад утвореного в процесі гідролізу сахарози інвертного цукру. Кількість глюкози визначають за допомогою градуовального графіка. Для побудови графіка готують стандартні розчини глюкози з концентрацією від 10 до 150 мкг в 1 мм.

Обробка результатів. Визначив по градуовальному графіку приріст глюкози в гідролізатах, розраховують інвертазну активність досліджуваного матеріалу (од/г або од/см³) по формулі:

$$CA_k = (C \times 2) / (t \times a \times 180),$$

де C – кількість утвореної глюкози, г; 2 – число молекул моносахаридів; 180 – молярна маса глюкози, г/моль; t – тривалість інкубації, хв; a – кількість ферментного препарату в см^3 реакційного середовища, г [19,21].

7.3.3. Визначення концентрації джерела вуглецю

В середовищі для культивування *S. cerevisiae* SAA612 джерелом вуглецю виступає сахароза. Визначити концентрацію сахарози ми можемо за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ)

Перш ніж визначити концентрацію сахарози, необхідно приготувати досліджувальний зразок: 10 мл культуральної рідини, фільтрують через фільтр (діаметр пор 0,45 мкм). У відфільтрованому зразку визначають концентрацію сахарози за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на хроматографі – Shimadzu Prominence LC-20AT Tokyo, Japan. В даному хроматографі наявні колонка HPX-87H (Bio-Rad Philadelphia, PA, USA) та детектор показника заломлення (Shimadzu RID-10A Tokyo, Japan). В якості рухомої фази використовують 0,005 н сірчану кислоту, швидкість потоку якої становить 0,6 мл/хв. Температура колонки становить 600°C. Зразок для дослідження у хроматограф вноситься в об'ємі 20 мкл, а як зразки порівняння використовують сахарозу аналітичної чистоти різних концентрацій. Концентрація сахарози визначається як відношення площ піків досліджувального зразка до стандартних розчинів різної концентрації [19,21].

7.3.4. Визначення концентрації джерела азоту

В середовищі для культивування *S. cerevisiae* SAA-612 джерелом азоту виступає сульфат амонію.

Визначення амонійного азоту. Суть методу: іони амонію при взаємодії з реактивом Несслера утворюють забарвлені в жовто-коричневий колір комплексні

сполуки йодистого ртуту амонію. Оптичну густину розчину вимірюють на фотоелектроколориметрі. Методика проведення аналізу: у мірну колбу місткістю 50 мл поміщають декілька крапель досліджуваного розчину, який попередньо відфільтрований через фільтр (діаметр пор 0,45 мкм), в якому міститься амонійний азот, додають 1 мл реактиву Несслера, доводять об'єм розчину дистильованою водою до мітки і перемішують. Через 3 хв вимірюють оптичну щільність розчину на фотоелектроколориметр з синім світлофільтром (довжина хвилі $\lambda = 400 - 430$ нм) в кюветі з товщиною поглинаючого світло шару 50 мм. Як розчин порівняння використовують дистильовану воду. Кількість амонійного азоту в пробі визначають за калібрувальним графіком [47].

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Лобова О.В., Пилипчук О.О. Конспект лекцій «Сільськогосподарська біотехнологія». – Київ, 2014. – 83 с.
2. Цукровий діабет: сучасна парадигма лікування. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.umj.com.ua/article/3006/protivirusni-likarski-zasobi-pri-likuvanni-gripu-efektivnist-ta-bezpeka>
3. Демичева О. Сахарный диабет. – 2018. – № 7. – С. 87–112. Програма «Цукровий діабет на 2017-2018 роки»
4. Дорохович В.В. Фруктоза: новые технологии производства и актуальность применения в пищевой промышленности // Продукты и ингредиенты. – 2006. – № 1. – С. 14–16.
5. Замінник цукру: Плюси та мінуси вживання фруктози. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://1plus1.ua/snidanok-z-1-1/novyny/plusi-ta-minusi-vzivannja-fruktozi>
6. Bhalla T., Bansuli, Thakur N., Savitri, Thakur N. Invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612: Production, characterization and application in synthesis of fructo - oligosaccharides//J.LWT. – 2017. – Vol 77. – P 178– 185.
7. Філімоненко О.Ю. Конспект лекцій для студ. напряму підготовки 6.051401 "Біотехнологія" денної та заочної форми навч. — Дніпродзержинськ: ДДТУ.- 2016. – 157 с.
8. Инвертаза. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://butuatert.ru/insha/18553-e1103-invertaza.html>
9. Инвертаза ENZIM - Фермент для расщепления сахара. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://enzim.prom.ua/p658324181-invertaza-enzim-ferment.html>
10. Ушаков В.М., Циоменко А.Б, Лунашин В.В., Кулаев И.С., Фихте Б.А. Способ получения внеклеточной инвертазы из дрожжей .

[Електронний\ресурс]

- Режим доступу:

<http://www.findpatent.ru/patent/147/1471559.html>

11. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* та їх використання. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://mydocx.ru/11-52712.html>

12. *Грачева И.М., Крявова А.Ю.* Технология ферментных препаратов. – Москва: Элевар, 2000. – 512 с.

13. *Пирог Т. П., Карлаш Ю. В., Красінько В. О.* Основи проектування біотехнологічних виробництв: метод. Рекомендації до викон. курсового проекту для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навчання. К.: НУХТ, 2015. – 87 с.

14. *Плановский А.Н., Николаев П.И.* Процессы и аппараты химической и нефтехимической технологии. — М., 1972.

15. *Пирог Т.П., Ігнатова О.А.* Загальна біотехнологія. – Київ: НУХТ, 2009. – 336 с.

16. *Меледина Т.В., Давыденко С.Г.* Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Морфология, химический состав, метаболизм: Учеб. пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2015. – 88 с.

17. *Мельничук М.Д., Кляченко О.Л., Бородай В.В.* та ін. Промислова біотехнологія. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. – 252 с.

18. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання / Уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010. – 129 с.

19. *Коломиец Э.И., Лобанок А.Г.*..Микробные..биотехнологии:..фундаментальные и прикладные аспекты. – М.: Беларуская наука, 2015. – 500 с.

20. *Пирог Т.П.* Загальна мікробіологія./ Т.П. Пирог. – К.:НУХТ,2010. – 632 с

21. *Грачева И.М., Крявова А.Ю.* Технология ферментных препаратов. – Москва: Элевар, 2000. – 512 с.

22. Шарова Н.Ю. Синтез инвертазы штаммами микромицета *Aspergillus niger* продуцентами лимонной кислоты // – Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – № 1. – с. 60 – 67.
23. Фільтрування.. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://medical-enc.com.ua/filtrovanie.htm>
24. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В.Карлаш – К: НУХТ, 2013. – 143 с
25. Калушняк К. А., Голгер Л. И., Балашов В. Е. Оборудование микробиологических производств. – М.: Агропромиздат, 1987. – 398 с
26. Стасевич М.В., Милянч А.О., Стрельников Л.С. та ін. Технологічне обладнання біотехнологічної і фармацевтичної промисловосі. – Львів: Новий Світ-2000, 2017. – 410 с.
27. Фільтр грубої очистки [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://dalgakiran.ua/store/product/Filtryi_vyisokogo_davleniya_PureTec_HEFF
28. Фільтр тонкої очистки [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://kiev.prom.ua/p118169070-filtr-dlya-ochistki.html>
29. Сода кальцинована..[Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.systopt.com.ua/soda-kaltsynovana-natrij-vuglekyslyj-karbonat-natriyu/>
30. Супераль..[Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://velvis.uaprom.net/p90751621-moyuschee-sredstvo-dlya.html>
31. Хлорантоін..[Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://farmakos.nethouse.ua/static/doc/0000/0000/0082/82185.2ae4iqrdtm.pdf>
32. Вимол(средство моющее техническое)[Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://logosib.ru/vimol>
33. Реактор-змішувач [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://fitohimfarm.com.ua/ua/statti/reaktor-zmishuvach_ss.html

34. Повітрязабірник [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://gazovik-neft.ru/catalogue/capacity-equip/air-holder>
35. Фільтр грубої очистки [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.airpol.com.ua/catalog/ochystka-povtria/filters/filtry-gruboi-ochystky/>
36. Компресор [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.olx.ua/obyavlenie/dozhimnoy-kompressor-buster-airpol-adp-720-40-bar-polsha-IDy7at8.html>
37. Охладитель воздуха [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://wwtec.ru/index.php?id=154>
38. Ресивер [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://abccorp.ru/aso-receivers-rv900-10.html>
39. Водонагрівач [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://ventklimat.com.ua/products/vodyanoj-nagrevatel-systemair-vbr-70-40-2-water-heating-batt->
40. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://navolyni.com/projekt.php?projekt=evroklima-z&g=15129&m=2#titlename>
41. Повітряний фільтр [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://shop.alfa-kom.rv.ua/filters/p770735.html>
42. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://npkagromash.ru>
43. Ферментер-інокулятор [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://www.sartogosm.ru/biostat_c_plus.html, <https://www.sartorius.com/sartorius/en/EUR/products/bioreactors-fermentors/in-situ-sterilizable-pilot-production/biostat-d-dcu>
44. [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://fitohimfarm.com.ua/ua/statti/reaktor-zmishuvach_ss.html
45. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.kck.ua/dir/armature/pumps/centrifugal.html>
46. *Мельничук М.Д., Кляченко О.Л., Бородай В.В.* та ін. Промислова біотехнологія. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. – 252 с.

47. Методы определения аммонийного азота. [Электронный ресурс]. –
Режим доступа: [http://www.gosthelp.ru/text/GOST26449285-
Ustanovkidist.html](http://www.gosthelp.ru/text/GOST26449285-Ustanovkidist.html)