

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

«До захисту допущено»

Директор інституту (декан факультету)

Завідувач кафедри

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

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

«__» _____ 2020 р.

«__» _____ 2020 р.

Кваліфікаційна робота

на здобуття освітнього ступеня бакалавра

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

Освітньо-професійної програми _____ «Біотехнологія»
на тему: _____ Біосинтез левану *Raenibacillus polytuxa*

Виконав: здобувач IV курсу, групи 1

_____ Щербина Іван Сергійович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Керівник _____ Стабніков Віктор Петрович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

_____ (прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____ (прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(шифр і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНИЙ РОБОТУ ЗДОБУВАЧУ

Щербині Івану Сергійовичу

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез левану *Raenibacillus polymyxa*

керівник роботи Стабніков В.П., професор, д.т.н.

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

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

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Raenibacillus polymyxa*, цільовий продукт: леван

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Обґрунтування вибору біологічного агента, Техніко економічне обґрунтування, Параметри культивування біологічного агента, способи виділення цільового продукту, точки контролю виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) Технологічна схема виробництва левану – 1 аркуш формату А2 .Апаратурна схема виробництва левану – 2 аркуші формату А1. Схема автоматизації ділянки виробництва левану – 1 аркуш формату А3

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
10	Клименко Олег Миколайович Доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних систем управління	23.03.2020	24.04.2020

7. Дата видачі завдання _____ «17» березня _____ 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	20.03.2020	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	25.03.2020	
3	Техніко-економічне обґрунтування	01.04.2020	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	05.04.2020	
5	Біосинтез цільового продукту	14.04.2020	
6	Апаратурна Схема	20.04.2020	
7	Технологічна схема	20.04.2020	
8	Специфікація	25.04.2020	
9	Матеріальний баланс	26.04.2020	
10	Опис технологічної схеми	10.05.2020	
11	Контроль виробництва	10.05.2020	
12	Автоматизація ділянки виробництва	24.04.2020	
13	Список використаної літератури	20.05.2020	
14	Вступ. Реферат. Зміст.	20.05.2020	

Здобувач _____
(підпис)(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____
(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячено розробленню технологічної та апаратурної схеми біосинтезу екзополісахариду левану з використанням штаму *Paenibacillus polymyxa EJS – 3*, який синтезує на середовищі з сахарозою та дріжджовим екстрактом 35,4 г/л цільового продукту.

Розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва, яка включає допоміжні роботи (приготування мийних засобів для генерального і щоденного прибирання, а також для миття обладнання, підготовка аераційного повітря, підготовка допоміжних речовин для виділення приготування підживлювального розчину, підготовка та стерилізація поживних середовищ для вирощування посівного матеріалу в колбах, в інокуляторі об'ємом 20 л та виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 250 л) та безпосередньо сам технологічний процес (вирощування посівного матеріалу, процес біосинтезу, відділення біомаси, руйнація клітинних капсул, центрифугування, осадження, фільтрація, сушіння).

Дипломний проект викладений на 117 сторінок друкованого тексту, містить 22 таблиці, 8 малюнків і складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (63 джерела) та графічної частини (2 креслення формату А1 та 1 креслення формату А2).

Ключові слова: екзополісахарид, леван, *Paenibacillus polymyxa EJS – 3*, виробничий біосинтез, виділення, омолоджуючий крем.

					НУХТ БТЕК 04.01.14. КР ПЗ			
		№	Підпис		<i>РЕФЕРАТ</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.	Щербина І.С.							
Консультант							3	1
Керівник	Стабніков В.П.					Кафедра БТМ		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.							

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1	10
ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	10
РОЗДІЛ 2	13
ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	13
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	19
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.	19
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	22
РОЗДІЛ 3	25
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	25
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	25
3.2. Розрахунок потужності виробництва	27
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для біосинтезу екзполісахариду	28
3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для виращування культури у ферментері.....	29
РОЗДІЛ 4	32
БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	32
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента .	32
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	34

РОЗДІЛ 5	36
ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	36
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	36
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.	36
5.1.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря.....	38
5.1.3. Обґрунтування вибору мийних та дезинфікувальних засобів	40
5.1.3.1 Вибір мийного засобу для обладнання і комунікацій.....	41
5.1.3.2 Вибір дезинфікувальних засобів для стін, підлоги, вікон, дверей	41
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	46
5.1.4.1 Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах	46
5.1.4.2 Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л.....	47
5.1.4.3 Підготовка і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 250 л.....	47
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту	49
РОЗДІЛ 6.....	60
МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ	60
6.1.Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)	61
6.2.Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу	61
6.2.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу	61

6.2.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування в посівному апараті.....	67
6.2.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування в колбах на качалках.....	69
6.3 Розрахунок матеріального балансу.....	71
6.4. Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання.....	74
6.4.1 Уточнюючий розрахунок кількості ферментерів.....	74
6.4.2 Уточнюючий розрахунок кількості посівних апаратів.....	74
6.4.3 Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб.....	75
6.5. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування та стерилізації поживного середовища.....	75
6.5.1 Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 250 л.....	75
6.5.2 Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для посівного апарату об'ємом 20 л.....	76
6.5.3 Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування підживлювального розчину для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 250 л.....	76
РОЗДІЛ 7.....	78
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	78
РОЗДІЛ 8.....	82
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	82
РОЗДІЛ 9.....	95
КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	95
9.1. Карта постадійного контролю.....	95
9.2. Мікробіологічний контроль.....	102

9.3. Мікроскопіювання	102
9.4. Визначення концентрації біомаси.....	103
9.5. Концентрація цільового продукту (левану).	103
9.6. Визначення вологості	104
РОЗДІЛ 10.....	106
АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА	106
10.1. Опис апаратурно-технологічної схеми виробничої дільниці..	106
10.2. Технологічні вимоги до системи автоматизації.	107
10.3. Обґрунтування та вибір системи засобів автоматизації	108
10. 4. Опис схеми автоматизації об'єкта	108
10.5. Специфікація на засоби автоматизації	109
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	110
ГРАФІЧНА ЧАСТИНА	
ДОДАТКИ	

ВСТУП

Нині, біотехнологія спрямована на інтенсифікацію або вдосконалення вже відомих процесів та винайдення нових шляхів забезпечення потреб людини. Про важливу роль біотехнології у світі свідчать обсяги виробництва продукції біотехнологічного сектора, що постійно збільшуються. За даними Міжнародного консалтингового агентства Abercade, загальний обсяг світового ринку біотехнологічної продукції на сьогодні становить майже 163 млрд. дол. США. Але в Україні, як свідчить вітчизняний досвід, рівень розвитку біотехнології порівняно зі світовим, є невисоким. За оцінками експертів, обсяг виробництва українського сектору біотехнології на сьогодні не перевищує 20 млн. дол. США і найрозвиненішою є фармацевтична індустрія. Саме тому в Україні розробляється багато нових продуктів або аналогів закордонних, за допомогою біотехнології. Одним з таких є аналог мазі *PROTEOLEA*® від швейцарського бренду Rahn AG. На сьогоднішній день, виробництвом мазей на основі левану не займається жодне з підприємств в Україні натомість вони випускають вартісні продукти власної рецептури, не звертаючи уваги на косметичні засоби, які включають в себе новітні продукти, котрі раніше не використовувались в косметології.

Новизною даного проекту є використання левану в косметологічній галузі в якості речовини, яка є складовою мазі для зволоження та омолодження шкіри. Тобто дана мазь є новим, сучасним засобом в Україні виробництво якого є альтернативою перед іншими мазями завдяки, меншій ціні та інтенсивнішій дії. Також новизною є використання як продуцента *Raenibacillus polytuxa EJS – 3*, який утворює на сахарозі ≈ 35 г/л левану за коротший проміжок часу ніж інші організми і з більшою ефективністю щодо споживання середовища.

					НУХТ БТЕК 04.01.14. КР ПЗ		
		№ докум.	Підпис				
Розроб.	Щербина І.С.			<i>ВСТУП</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						8	2
Керівник	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						

Метою даної роботи є проектування ділянки виробництва (апаратурна і технологічна схеми) полісахариду левану *Paenibacillus polytuxa EJS – 3* у вигляді порошку для подальшого пакування в металізовані пакети.

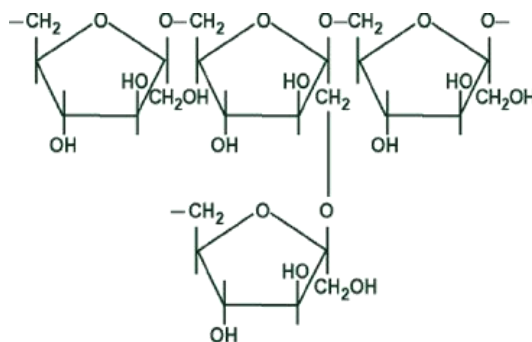
Актуальність теми: проблема омолодження і зволоження шкіри була і є актуальною, оскільки об'єми продажу кремів на ринку протягом років залишаються стабільними, впровадження та розробка кремів на основі левану дає змогу здешевити, а тим самим більш пополяризувати омолоджувальні креми.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

В природі продуцентами левану є такі роди бактерій: *Acetobacter*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Halomonas*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* і *Zyotomonas*, вони є найбільш вивченими.[1]

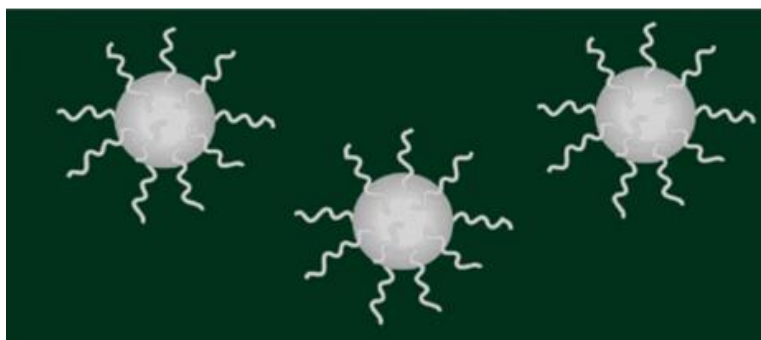
Леван - це фруктановий екзополісахарид, що складається з β -D фруктофуранозних залишків пов'язаних з β -2,6 глікозидними зв'язками і виробляється різними мікроорганізмами та рослинами.[2] Він відрізняється від інших водорозчинних, біосумісних і плівкоутворюючих біополімерів завдяки своєму незвичайному поєднанню таких особливостей, як дуже низька внутрішня в'язкість, висока адгезійна сила та користь для здоров'я. Хоча леван відомий більше століття, його не використовували в повній мірі його унікальних можливостей, але завдяки своїм характеристикам він став в центрі уваги науки і промисловості. На відміну від глюканів, таких як крохмаль та целюлоза, фруктани не беруть участь у фізіологічних процесах тварин. Цей факт робить їх ідеальними кандидатами для пробіотичних волокон і лікарських носіїв, оскільки відсутні ферменти, які гідролізують їх у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту. Лише в товстій кишці вони здатні метаболізуватися завдяки місцевій мікробіоті. Крім того, на відміну від глюканів, продукти гідролізу підходять для хворих на цукровий діабет, тому також леван використовується як замітник сахарози.[3]



Мал.1.1 Розгорнута формула левану

					НУХТ БТЕК 04.01.14. КР ПЗ		
		№ докум.	Підпис				
Розроб.	Щербина І.С.			ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						10	3
Керівник	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						

Леван має молекулярну масу понад 10 мільйонів Да. Полімер з довгим ланцюгом намотується в щільно упаковану сферу діаметром 50-200 Нм (мал.1.2). Переплетення гілок, випромінюваних з поверхні сфери, має когезійну міцність. Гідроксильне число становить 89 мг КОН / г



Мал.1.2 –Структура левану

Бактеріальні Левани утворюють в'язкі опалесцентні розчини; 6% розчин Левану має вигляд густої пасти. Леван - один з небагатьох природних полісахаридів, який може утворювати рідкокристалічну фазу [4].

Мікробний леван володіє низкою відмінних властивостей. Наприклад, на відміну від полісахаридів, які використовуються в якості емульгаторів і загусників, леван набухає у воді і має незвично низьку в'язкість. Плівки на основі Левану мають хороші бар'єрні властивості по відношенню до кисню. Біоматеріали на основі Левану відносно стабільні в кислому середовищі. Розчиняється в 1 н. HCl і для повного гідролізу його витримують при 70 ° С протягом години. Для біоматеріалу він має хорошу термостійкість, температура розкладання - 225 ° С. Температура кристалізації становить 133 ° С. Леван поглинає УФ-випромінювання, особливо в діапазоні UV-C. Леван не утворює гелю. Залежно від товщини, плівки на основі Левана можуть бути прозорими, іноді білі [5,6]

Леван застосовується у виготовленні продуктів харчування, косметичної, фармацевтичної, хімічної промисловості. Він також пускає в хід клітинну проліферацію, утворює біоплівки, володіє протибольовими ефектом в косметиці. Поліфруктозида мають пробіотичні властивості [7].

Вітчизняними вченими розглянуті області застосування біополімерів в харчовій промисловості, а також можливості використання препарату на основі Левану у виробництві ковбасних виробів. Леван відноситься до нових комплексних препаратів групи еубіотиків, легкозасвоюваний і екологічно безпечний субстрат, потенційне джерело фруктози для мікроорганізму, продукт мікробіологічного синтезу. Кількість препарату зумовлена його властивостями: він добре продукує розвиток молочнокислої мікрофлори, яка в зв'язку з цим може накопичуватися в надмірних кількостях [8].

У харчовій промисловості леван використовується як загущаючий агент, як харчова добавка з пребіотичними властивостями, що володіє холестеринознижуючою здатністю. У косметології важливий зволожуючий ефект Левану для шкіри. [9]

РОЗДІЛ 2
ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА
БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

В природі леван-продукуючі мікроорганізми були виділені з місць, як виявляється де, сильні адгезивні властивості не мають значення. Наприклад, бактерії, що виробляють леван були відновлені з соломи, ґрунту, вулканічних грязей, ферментованого коров'ячого молока, меду, забруднених нафтою осадових відкладень, цукрових заводів, тропічних рослин, рослинних нектарів, плодових тіл грибів і навіть з забруднювачів в лабораторії мікробіології .

Леван міститься в листі, стеблах і коренях однодольних рослин, особливо злакових. Їх також синтезують деякі непатогенні мікроорганізми, наприклад, *Bacillus subtilis* і *Bacillus mesentericus* при культивуванні на сахарозних середовищах.[10]

Для того, щоб обрати найефективнішого біологічного агента, необхідно порівняти їх. Порівняння здійснюється в 3 етапи. На першому етапі вибору різні штами продуцентів порівнюються за показниками утворення левану: концентрація цільового продукту, час за який вона утворена.

В *табл. 2.1* розглянуто різні штами леван продукуючих бактерій, а саме: *Paenibacillus polymyxa EJS – 3*, *Halomonas sp. AAD6* , *Z. mobilis 113*. наведено склад поживних середовищ, на яких певний час вирощувалися продуценти, основні показники синтезу та особливості технологічного процесу. Згідно *табл. 2.1* різні роди та штами леван-продукуючих бактерій мають різну продуктивність щодо виробництва продукту Так вихід левану у *Z. Mobilis 113* на освітленій мелясі становить 2,53 г/л,

					НУХТ БТЕК 04.01.14. КР ПЗ		
		№	Підпис				
Розроб.	Щербина І.С.			ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						13	11
Керівник	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						

у відповідному середовищі на сахарозі 14,4 г / л. Для левану з *Halomonas sp. AAD6* найкращим середовищем є цукрова бурякова меляса (30 г / л), оброблена ТСРНАС (трикальційфосфат, сірчана кислота та попередня обробка активованим вугіллям), але вихід левану становить лише 12,4 г / л, а на середовищі з сахарозою взагалі 1,84 г /л.

Середовище для культивування *P. polytuxa EJS – 3* декілька разів змінювали, оптимізували з метою підвищення швидкості продукції левани і досягнення максимального виходу. Ферментацію здійснювали протягом 60 годин при 24 ° С на качалці при 150 обертах на хвилину і рН при цьому був рівний 7. Вихід склав 35,45 г/л . Тому як висновок з *табл 2.1* на даний момент найоптимальнішим і найкращим мікроорганізмом для виробництва левану є *Paenibacillus polytuxa EJS – 3*, який має найбільший вихід цільового продукту за короткий проміжок часу також він досліджений в більшій мірі та вже відомі методи його виділення та методи очищення продукту [11] для подальшого використання.

На другому етапі порівнюється вартість поживних середовищ для культивування обраних продуцентів (*табл. 2.2*).

Особливості одержання екзополісахариду Левану за допомогою *Paenibacillus polymyxa* EJS – 3, *Halomonas* sp. AAD6 , *Z. mobilis* 113.

Таблиця 2.1

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація Левану, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література, рік
<i>Paenibacillus polymyxa</i> EJS – 3	Сахароза – 190; дріжджовий екстракт – 25; CaCl ₂ – 0,35; K ₂ HPO ₄ – 5.	60	35,45	Культивування при 150об/хв pH=8 t=24°C	<i>Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., & Zeng, X.</i> Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium <i>Paenibacillus polymyxa</i> EJS-3. <i>Carbohydrate Polymers</i> – 2010 – doi:10.1016/j.carbpol.2009.07.055 [11]
<i>Halomonas</i> sp. AAD6	М'яса – 30 г/л; K ₂ HPO ₄ – 7 ; KH ₂ PO ₄ – 2;	210	12,4	Культивування при 180 об/хв pH=7,5	Küçükaşık, F., Kazak, H., Güneş, D., Finore, I., Poli, A., Yenigün, O., ... Öner, E. T. (2010).

	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,1; (NH ₄) ₂ SO ₄ - 1 Пептон – 0,5 NaCl – 137,2			t=37°C	Molasses as fermentation substrate for levan production by Halomonas sp. Applied Microbiology and Biotechnology, 89(6), 1729–1740. doi:10.1007/s00253-010-3055-8 [12]
<i>Z. mobilis</i> 113	Сахароза – 100; дріжджовий екстракт – 7; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 1; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 1,6; KH ₂ PO ₄ – 2,5.	48	14,4	Культивування при pH=4,9 t=30°C	Bekers, M., Laukevics, J., Karsakevich, A., Ventina, E., Kaminska, E., Upite, D., ... Scherbaka, R. (2007). <i>Levan-ethanol biosynthesis using Zymomonas mobilis cells immobilized by attachment and entrapment. Process Biochemistry, 36(10), 979–986.</i> doi:10.1016/s0032-9592(01)00140-6 [13]

З табл. 2.2 видно, що найдешевше середовище для *Halomonas sp. AAD6*, потім йде *Z. mobilis 113* з ціною середовища в 3,51 грн. і найдорожчим є середовище для *Paenibacillus polymyxa EJS – 3*, яке дорожче від середовища *Halomonas sp. AAD6* більше ніж в 10 разів, а відносно середовища *Z. mobilis 113* в 3 рази.

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування *Paenibacillus polymyxa EJS – 3*, *Halomonas sp. AAD6*, *Z. mobilis 113*.

Продукт	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело (1, 2, 3, 4)*
<i>Paenibacillus polymyxa EJS – 3</i>	Сахароза	12	2,28	1
	Дріжджовий екстракт	320	8	3
	CaCl ₂	10,8	0,0378	1
	K ₂ HPO ₄	17,55	0,08775	3
	Вартість 1 л середовища – 10,4 грн			
<i>Halomonas sp. AAD6</i>	Меляса	2,7	0,081	3
	K ₂ HPO ₄	17,55	0,123	3
	KH ₂ PO ₄	22,95	0,045	3
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	11	0,001	4
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,51	0,003	3
	Пептон	318	0,16	2
	NaCl	3,3	0,453	4
Вартість 1 л середовища – 0,866 грн				
<i>Z. mobilis 113</i>	Сахароза	12	1,2	1
	Дріжджовий екстракт	320	2,24	2
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	11	0,011	4
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,51	0,006	3

	KH ₂ PO ₄	22,95	0,057	3
Вартість 1 л середовища – 3,51 грн.				

Примітка: * – ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на квітень 2020 р.

1. <https://kiev.prom.ua/ua/>
2. <http://farmaktiv.com.ua/>
3. <https://www.alibaba.com/>
4. <https://flagma.ua/uk>

На третьому етапі продуценти порівнюються за умовною вартістю 1 г утвореного ними етанолу (табл. 2.3).

З даних наведених у табл. 2.3 видно, що найменшу умовну вартість 1 г продукту має леван, який отримується за допомогою штаму *Halomonas sp. AAD6*, але він має найнижчу концентрацію синтезованого левану за годину відносно представлених штамів. Найоптимальнішим є *Paenibacillus polymyxa EJS – 3*, хоча він має не набагато більшу умовну вартість 1 г левану, але все таки він має найкращу концентрацію левану синтезованого за годину.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г левану при культивуванні *Paenibacillus polymyxa EJS – 3*, *B. licheniformis NS032* та *Z. mobilis ATCC 31821*

Продуцент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація левану, г/л	Умовна вартість 1 г левану, грн	Тривалість культивування, год	Концентрація левану, синтезованого за год, г/л
<i>Paenibacillus polymyxa EJS – 3</i>	10,4	35,45	0,29	60	0,59
<i>Halomonas sp. AAD6</i>	0,866	12,4	0,07	210	0,059
<i>Z. mobilis 113</i>	3,51	14,4	0,24	48	0,3

Підсумовуючи дані, наведені у табл. 2.1, табл. 2.2 і табл. 2.3, продуцентом левану обирається штам *Paenibacillus polymyxa EJS – 3*,

оскільки, він вирощується хоч і на дорожньому середовищі, але має більший вихід цільового продукту відносно представлених штамів, має більшу концентрацію цільового продукту за годину і має відомі методи виділення та очищення продукту для подальшого використання в виробництві.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Потреба в субстанції екзополісахариду складає $G_{нд} = 26$ кг. За умовами замовника цю кількість левану потрібно виробити за $T_{рд} = 30$ днів. За літературними даними [11] максимальний синтез полісахариду, 35,45 г/л, досягається за умов росту штаму *Paenibacillus polymyxa* EJS – 3 на середовищі такого складу (г/л): Сахароза – $C_1=190$; дріжджовий екстракт – $C_2 = 25$; $CaCl_2$ – $C_3 = 0,35$; K_2HPO_4 – $C_4 = 5$. Всього – $C_{\Sigma} = 220,35$ г/л.

Для отримання потрібної концентрації левану готують підживлювальний розчин наступного складу (г/л): Сахароза – 160; Дріжджовий екстракт – 20; K_2HPO_4 – 2; $CaCl_2$ – 0,35.

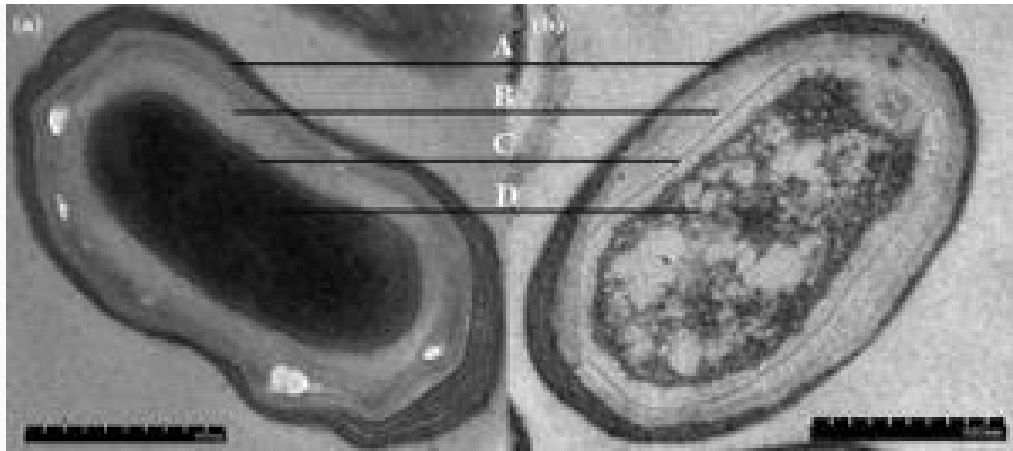
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.

Paenibacillus polymyxa - ендоспороутворююча бактерія, яка є не патогенною і виявлена в середовищах, таких як коріння рослин, ґрунті та морських осадах. Це грампозитивна, паличкоподібна, рухлива бактерія, розміром 0,6 на 3,0 мкм, яка рухається за допомогою перетрихальних джгутиків. Широкий спектр можливостей цієї бактерії заключається в тому, що вона може: фіксувати азот, виробляти гормони, які сприяють росту рослин, продукувати різноманітні полісахариди в тому числі і леван, виробляти гідролітичні ферменти та антибіотики проти шкідливих мікроорганізмів рослин та людини. Тому *P. polymyxa* була використана у виробництві комерційних антимікробних препаратів. Дана бактерія може допомагати рослинам у поглинанні фосфору та підвищувати пористість ґрунту. Цей мікроорганізм відіграє певну роль у функціонуванні екосистем

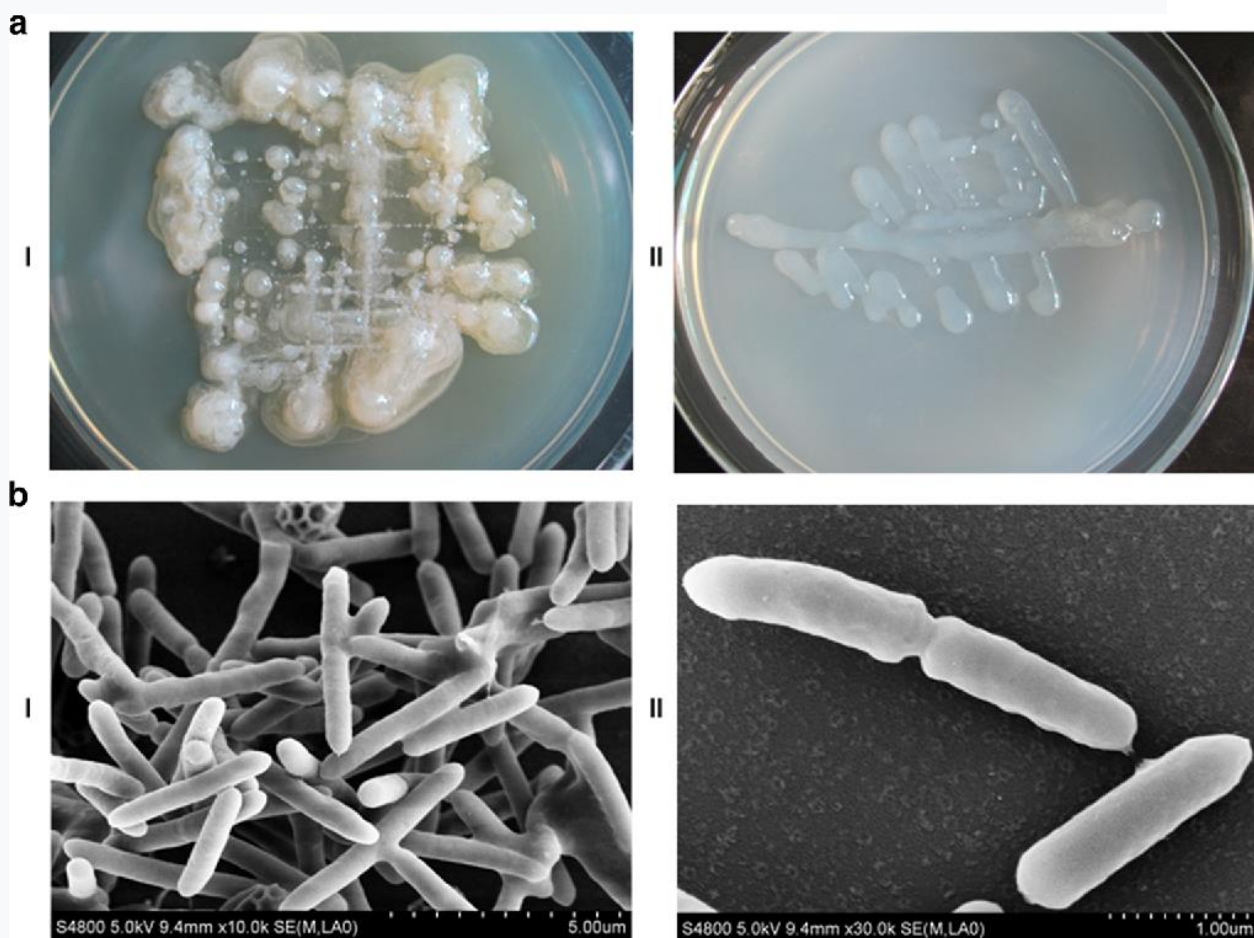
та потенційну роль в промислових процесах, оскільки ця бактерія виробляє вторинні метаболіти, які широко застосовуються в сільськогосподарських екосистемах, біозахисті в харчовій та лікарській промисловості. Також у фармацевтичній промисловості використовують штам *Paenibacillus polymyxa* EJS – 3 для синтезу екзополісахариду левану – снодійного та седативного засобу. Метаболіти, такі як поліміксин E1 та лантибіотик, також зменшують колонізацію патогенів у личинок птиці та креветок [14]. Інша область застосування метаболітів, що продукуються бактерією, – біофлокуляція – очищення води, викликана метаболітами, такими як 2,3-бутандіол (BDL). *P. polymyxa* також використовують для розділення гематиту, піриту та халькопірозу [15]. Даний мікроорганізм також має потенційне застосування в біоремедіації. Він оточує себе з'єднаннями, які називаються екзополісахаридами (або позаклітинні полімерні речовини), які важливі для утворення біоплівки та прилипання до коріння рослин та частинок ґрунту. Цей екзополісахарид може бути використаний як недорога та легко оброблювана сполука для видалення кадмію (Cd^{2+}) з водних розчинів [16]. Це досягається за рахунок поглинання кадмію в водному розчині в екзополісахарид *P. Polymyxa*. Інші галузі промислового застосування *P. polymyxa* - очищення та ферментація відходів і водопровідної води .

P. polymyxa - факультативний анаероб (здатний до нітратредукції). Росте на простих поживних середовищах. На щільних поживних середовищах формує безбарвні або бліді, плоскі або опуклі, гладкі і слизові колонії з пильчатим краєм (за рН 4 – 7; температура 30⁰С). [17]. Для розмноження бактерія диференціюється на епілептичні спори, які чітко розтягують материнську клітину. Ендоспори можуть проростати, коли умови є більш придатними для існування [18]. Проростання спор *P. polymyxa* може залежати від багатьох факторів, включаючи активацію тепла та поживні речовини, такі як фруктоза плюс L-аланін [18]. Органічні кислоти також

можуть впливати на теплостійкість спор [19]. Коли *P. polytuxa* не є ендоспорною формою, вона має перитрихальні джгутики, які допомагають їй рухатись.



Малюнок 2.1 Мікрофотографії *P. polytuxa* а.) спляча спора б) проросла спора. Джерело: Нюо et al. 2010 рік[20]



Мал. 2.2 а I і а II) колонії *P. polymyxa* на щільному поживному середовищі SDA(глюкозний агар Сабура) і CZA (середовище Чапек-Дох)відповідно. *б I і б II)* фото з електронного мікроскопа з різним збільшенням. Джерело: [21]

P. polymyxa є хеморганогетеротрофом, який може фіксувати атмосферний азот і є факультативним анаеробом [22]. Як факультативний анаероб, він може використовувати аеробне дихання в присутності кисню або перейти на бродіння, коли рівень кисню є низькими. Також ця бактерія може використовувати різні джерела органічного вуглецю, такі як глюкоза, сахароза, мальтоза та арабіноза, і може виробляти ряд метаболітів, таких як ацетоїн, лактат та етанол [23]. Також *P. polymyxa* є мезофілом, яка оптимально зростає при 30 ° С, а оптимальний рН становить 4-7 [22]. *P. polymyxa* має здатність виробляти газ Н₂ як побічний продукт під час ферментативного процесу, на який впливають як рН, так і температура [18]. Цей ферментативний процес, який називається ацетогенезом, дає ацетат, водень та СО₂, які можуть бути використані як субстрати метаногенів для отримання метану [18]. Також цей мікроорганізм здатний синтезувати леван з сахарози. *P. polymyxa* має унікальну здатність синтезувати антибіотики / протигрибкові сполуки такі як: полімксин, панібацилін [18] і фузарицидін [24].

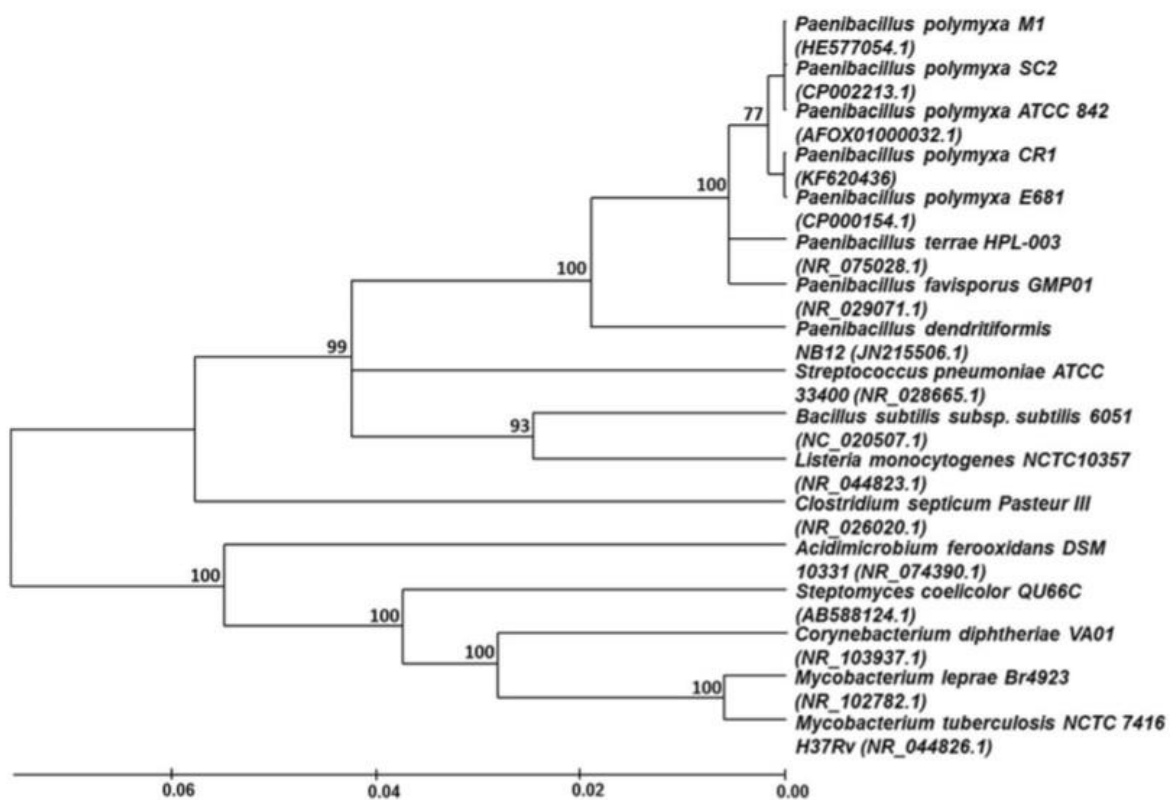
2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Paenibacillus був спочатку класифікований під родом *Bacillus*, поки він не став окремим родом в 1993 році [25]. Ця різниця була знайдена з використанням порівняльного аналізу послідовності генів 16S рРНК трьох різних бактерій, які показали достатню філогенетичну відстань від *Bacillus subtilis*, щоб гарантувати новий рід [18]. *Paenibacillus* (*paene* + *Bacillus*) означає майже *Bacillus* на латині.

Загальноприйнятий фенотиповий статус *P. polymyxa*:

Домен – *Bacteria*;
Відділ – *Firmicutes* ;
Клас – *Bacilli*;
Порядок – *Bacillales*;
Родина – *Paenibacillaceae*;
Рід – *Paenibacillaceae*;
Вид – *polутуха* .

За допомогою багатоступеневого підходу, аналізу 16S рРНК послідовностей було складено філогенетичне дерево (мал.2.3). І на основі отриманих даних , аналізу їх за допомогою GenBank було виявлено, що *P. Polутуха* тісно пов'язаний з *Paenibacillus validus* – ступінь ідентичності генів 94% , *Paenibacillus koreensis* ступінь ідентичності генів становить 93% і таке ж значення для *Paenibacillus larvae*. Також на цьому дереві представлені мікроорганізми, які є менш спорідненими до даного.



Мал.2.3 Філогенетичне дерево створене на основі 16S рРНК – послідовностей, що показує положення *P. Polymyxa* [26].

РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

У даному курсовому проекті пропонується використання екзополісахариду левану, синтезованого *Raenibacillus polytuxa* EJS – 3 для використання його у косметичній галузі, а саме для створення аналогу мазі *PROTEOLEA*® від швейцарського бренду *Rahn AG*, яка використовується, як зволожуючий та омолоджуючий крем для лиця. [27]

У структурі ринку косметики України велика частка (до 70% від усього обсягу продажів) приходить на дешеву продукцію класу «масс – маркет», близько 12% складає елітна косметика (класу «люкс»), 15–20% - продукція транснаціональних корпорацій (міжнародних компаній), яка призначена для населення із середнім статком [28]. Значна частина товарів вищої цінової категорії є імпортними, до них відносять практично всі світові бренди: Avon, Beiersdorf, Chanel, Colgate-Palmolive, Estee Lauder, Henkel-Schwarzkopf, Johnson & Johnson, L’Oreal, Mary Kay, Oriflame, Тобто в останні роки споживачі переходять на більш дешеву косметику, адже відомі іноземні бренди, через знецінення гривні, багатьом не по кишені. . В Україні мало відомих українських косметичних брендів, це насамперед пов’язано з відсутністю конкурентоздатних виробничих потужностей пострадянського періоду. Можна виділити лише декілька: «Etual cosmetics» (спеціалізується на виробництві декоративної косметики, закупає інгредієнти у Франції і Німеччині); «LORINA» (український бренд декоративної косметики); «Irene Vukir». Саме тому слід звернути увагу на створення сучасного виробництва вітчизняних аналогів, так званої елітної косметики закордонних виробників.

Мазь *PROTEOLEA*®, як і її аналог містить в своєму складі наступні компоненти: Гліцерин – 50%; Вода – 25-40%

					НУХТ БТЕК 04.01.14. КР ПЗ		
		№	Підпис				
Розроб.	Щербина І.С.			<i>ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						25	6
Керівник	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						

- Фруктан (Леван) – 1-5%
- Дециловий глюкозид – 1-5%
- Екстракт листя оливкового дерева - 1-5;
- Фенитиловий спирт – 0.1-1%
- Екстракт насіння Джуджуба – 0.1 -1%
- Аскорбінова кислота – 0.1-1%.
- Лимонна кислота – 0.1-1%. [27]

Отже, за літературними даними [29] до складу мазі входить від 1 до 5 % левану, для достовірності результатів прорахунків обираємо концентрацію левану в 1%. Помітний ефект застосування мазі з'являється через 14 днів, згідно даних виробника Rahn AG, через 28 днів досягається помітне зменшення зморшок та розгладження шкіри, для обрахунків використовуємо період в 28 днів, оскільки ефект застосування мазі буде більш проявленим.

При розрахунку потреби мазі в Україні враховуємо що, цільовою аудиторією споживання даного косметологічного продукту будуть жінки віком від 35 до 50 років. За даними державної служби статистики України [30] станом на 1 січня 2019 року в Україні проживає 5 198 934 жінок даної вікової категорії з них 1 875 676 віком від 35 до 40, 1 690 046 віком від 40 до 45 і 1 633 212 віком від 45 до 50 років. Отже, маємо 5 198 934 потенційних споживачів косметологічних продуктів, але з даних наведених вище робимо висновок що 20% жінок не користуються кремами для лиця, 40% користуються дешевою продукцією, 15 % користується продукцією транснаціональних корпорацій, а 15% користуються елітною косметикою,[28] приймемо що косметикою нашого виробництва будуть користуватися 10 % жінок, тобто 519 894 особи ,оскільки даний продукт є новим на ринку косметології України, немає розрекламованого бренду, необхідно спочатку виготовити пробну партію продукту, в розмірі близько 1% від прогнозованого ринку для перевірки продажу даного продукту, тобто для 5200 осіб.

Під час застосування мазі протягом рекомендованого курсу (28 днів) буде використано десять туб об'ємом 50 мл. В одній тубі міститься, як було вказано вище 1% левану. Тобто $0.01 * 500 = 5$ г левану буде використано на один рекомендований курс. Отже загальна потреба левану буде становити :

$$5200 * 5 = 26 \text{ кг.}$$

3.2 Розрахунок потужності виробництва

Для потреб жінок України необхідно 26 кг левану. Оскільки даний екзополісахарид буде використаний лише для одного заводу, виробництво даного мікробного екзополісахариду забезпечуватиме 100% розрахованої потреби.

Леван синтезується *Paenibacillus polymyxa* EJS – 3. Відомо, що максимальний вихід даного продукту становить 35,45 г/л [11]. Проте для розрахунків беремо 30 г/л, оскільки максимальний синтез – це не сталі значення. Враховуючи це, розрахуємо кількість культуральної рідини, яка необхідна для одержання 26 кг екзополісахариду (ЕПС):

$$30 \text{ кг ЕПС} - 1 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини}$$

$$26 \text{ кг ЕПС} - X \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини,}$$

де X – кількість культуральної рідини для отримання необхідної кількості ЕПС, м^3 .

$$Y = 26 / 30 = 0,87 \text{ м}^3$$

Враховуючи втрати при виділенні цільового продукту, який має бути хімічно чистим (30 %), об'єм культуральної рідини становить:

$$V_2 = 0,87 / (1 - 0,30) = 1,243 \text{ м}^3 = 1\,250 \text{ л культуральної рідини}$$

Отже, для виготовлення левану на потреби косметологічної продукції необхідно 1 250 л культуральної рідини.

3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для біосинтезу екзополісахариду

Враховуючи загальну кількість культуральної рідини необхідної на рік, розрахуємо скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації.

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд} = 30$). Інші 270 днів виробництво буде працювати для синтезу інших ЕПС, як компонентів лікарських засобів.

Тоді кількість продукту на добу ($V_{гпд}$) становитиме:

$$V_{гпд} = V_{гп}/T_{рд} = 1\,250/30 = 41,7 \text{ л/добу.}$$

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = V_{гп}/((V_{гпд} \times T_{цф})/24) = 1\,250/((41,7 \times 66,5)/24) = 10,8 = 11 \text{ циклів,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який складається з тривалості виробничого біосинтезу (60 год) та часу підготовчих операцій (6,5 год).

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

Розраховуємо кількість культуральної рідини за цикл ($V_{цк}$):

$$V_{кр} = (K_1 \times V_{гпд} \times T_{цф})/24 = (1,1 \times 41,7 \times 66,5)/24 = 127,1 \text{ л /цикл,}$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій (приймаємо $K_1 = 1,1$).

Такий об'єм культуральної рідини (127,1 л) можна отримати у ферментері з геометричним об'ємом:

$$V_{гф} = V_{кр}/K_3 = 127,1/0,6 = 211,83 \text{ л,}$$

де K_3 – коефіцієнт заповнення ферментера ($K_3 = 0,6$), що обирається в межах 0,5 – 0,65.

У ГОСТ 20680–2002 знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{\text{нф}} = 250$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{ф}}/V_{\text{нф}} = 127,1/250 = 0,508.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у межах норми.

Отже, для отримання 127,1 л культуральної рідини обираємо ферментер об'ємом 250 л.

3.4 Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 127,1$ л культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%)) становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{127,1}{1 - 0,1} \approx 141,22 \text{ л}$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 141,22 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,508$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\text{ф.1}} = 141,22/0,508 = 278$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 250$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{141,22}{250} = 0,565$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

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

В такому разі кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + X_{\text{ф}}} = \frac{141,22}{1 + 0,1} = 128,38 \text{ м}^3$$

де $X_{\text{ф}}$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 141,22 - 128,38 = 12,84 \text{ л}$$

3.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в посівному апараті

Для одержання 12,84 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{12,84}{1 - 0,1} = 14,27 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 14,27/0,6 = 23,78 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 25 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{14,27}{25} = 0,57$$

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{14,27}{1 + 0,1} = 12,97 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 14,27 - 12,97 = 1,3 \text{ л}$$

3.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

Для одержання 1,3 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл з коефіцієнтом заповнення 0,2. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм3}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{1300}{750 \times 0,2} = 8,67 = 9 \text{ шт.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 9 качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу екзополісахариду левану у ферментері об'ємом 250 л з коефіцієнтом заповнення 0,565 буде проходити у два етапи.

РОЗДІЛ 4 БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

За даними наукової статті [11], ростовим субстратом у поживному середовищі для біосинтезу левану є сахароза. Склад поживного середовища для біосинтезу кінцевого продукту, екзополісахариду левану, г/л : Сахароза – 190; дріжджовий екстракт – 25; CaCl₂ – 0,35; K₂HPO₄ – 5. [11].

Відповідно до KEGG[31] , катаболізм сахарози у продуцента левану, *Raenibacillus polymyxa*, відбувається за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса, або гліколіз, який є одним з ключових шляхів метаболізму всіх живих організмів. Ключовим ферментом під час гліколізу у *Raenibacillus polymyxa* є 6-фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11) Нижче наведена схема катаболізму глюкози за шляхом гліколізу (рис. 4.1). Але гліколіз у даного штаму буде відрізнитись, оскільки ростовим субстратом є сахароза, яка є дисахаридом і складається з двох моносахаридів глюкози і фруктози. Оскільки гліколізом здійснюється саме перетворення глюкози, фруктоза повинна пройти модифікацію і також бути включеною в гліколіз. Спочатку сахароза буде фосфорильована за допомогою сахарозо-специфічного ПВ компоненту (КФ 2.7.1.211). Потім сахарозо-6-фосфат буде розкладено на фруктозу та глюкозо-6-фосфат за допомогою В-фруктофуранозидози (КФ 3.2.1.26). Фруктоза буде фосфорильованою молекулою АТФ за допомогою ферменту фруктокінази (КФ 2.7.1.4), після чого буде утворений фруктозо-6-фосфат. Після чого структура фруктозо-6-фосфату буде змінена за допомогою ферменту глюкозо-6-фосфоізомеразі на глюкозо-6-фосфат, потім буде проходити модифікація на глюкозо-1-фосфат за допомогою ферменту фосфоглюкомутази.

					НУХТ БТЕК 04.01.14. КР ПЗ		
		№	Підпис				
Розроб.	Щербина І.С.			<i>БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						32	4
Керівник	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						

Вступивши в реакцію гліколізу глюкозо-1-фосфат модифікується в глюкозо-6-фосфат, за допомогою того ж фермента, після чого відбувається ізомеризація глюкозо-6-фосфату до фруктозо-6-фосфату за допомогою глюкозо-6-фосфат ізомерази. Після того як пройдуть дані етапи, гліколіз буде проходити згідно стандартного.

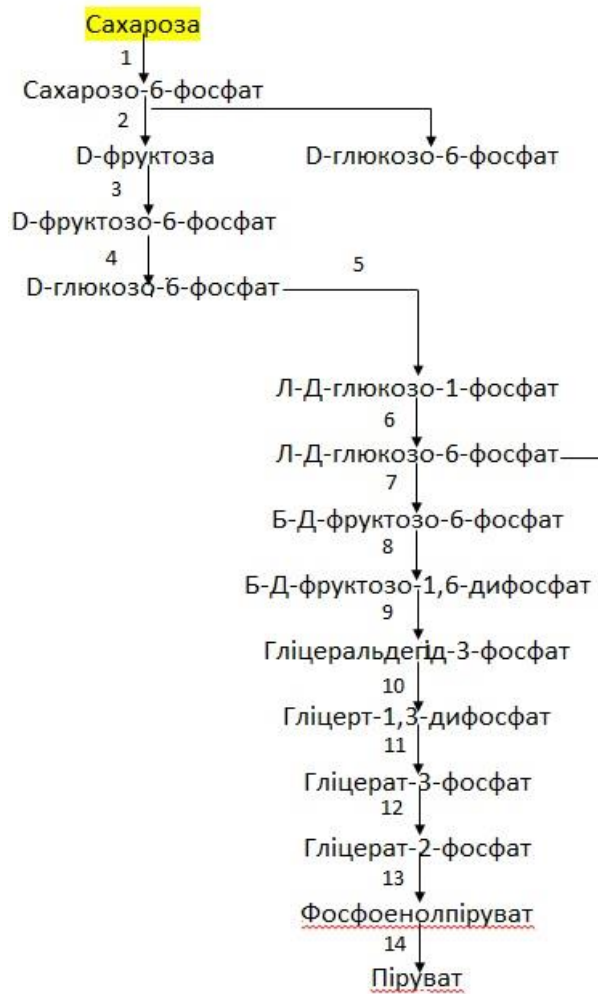


Рис. 4.1. Катаболізм глюкози у *Raenibacillus polymyxa*

Ферменти, які беруть участь при перетворенні глюкози за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса: 1. Сахарозо-специфічний ПВ компонент (КФ 2.7.1.211) 2. В-фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26) 3. Фруктокіназа (КФ 2.7.1.4) 4. Глюкозо-6-фосфоізомераза (КФ 5.3.1.9) 5. Фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2) 6. Фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2) 7. Глюкозо-6фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9) 8. 6-Фосфотруктокіназа (КФ 2.7.1.11) 9. Фруктозодифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13) 10. Гліцерльдегід-3-фосфат дегідрогеназа (КФ 1.2.1.12) 11.

Фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3) 12. 2,3-дифосфогліцерат мутаза (КФ 5.4.2.12) 13. Енолаза (КФ 4.2.1.11) 14. Піруват кіназа (2.7.1.40)

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Оскільки леван - це фруктановий екзополісахарид, що складається з β -D фруктофуранозних залишків пов'язаних з β -2,6 глікозидними зв'язками, а саме з сахарози і 8-24 залишків фруктози. (рис 4.2) [31] то біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт буде мати наступні етапи:

- 1) Фосфорилування сахарози за допомогою сахарозо-специфічного ПВ компоненту (КФ 2.7.1.211);
- 2) Розклад сахарозо-6-фосфау на фруктозу та глюкозо-6-фосфат за допомогою В-фруктофуранозидази (КФ 3.2.1.26);
- 3) Фосфорилування фруктози молекулою АТФ за допомогою ферменту фруктокінази (КФ 2.7.1.4), після чого буде утворений фруктозо-6-фосфат;
- 4) Зміна структури фруктозо-6-фосфат на глюкозо-6-фосфат, за допомогою Глюкозо-6-фосфоізомерази (КФ 5.3.1.9);
- 5) Утворення глюкози з глюкозо-6-фосфату;
- 6) Перетворення глюкози за допомогою леванцукрази (КФ 2.4.1.10) на сахарозу;
- 7) Утворення левану з сахарози за допомогою леванцукрази (КФ 2.4.1.10).

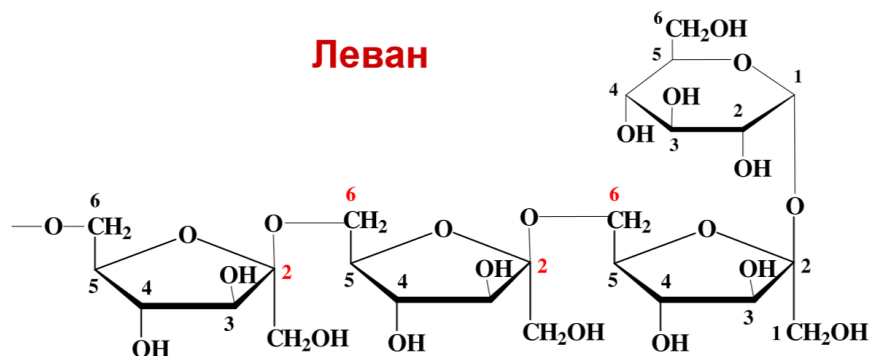


Рис.4.2 Розгорнута формула левану

Для утворення та поновлення основних інтермедіатів необхідні анаплеротичні реакції, які функціонують в ЦТК:

- 1) З фосфоенолпірувату до оксалоацетату з залученням H_2O та CO_2 за допомогою фосфоенолпіруват карбоксилази (КФ 4.1.1.31) ;
- 2) Утворення з малату оксалоацетату під дією фермента малат дегідрогеназа (КФ 1.1.5.4).

РОЗДІЛ 5

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Виробництво левану можна здійснювати періодичним і безперервним способами.[3] Під час періодичного процесу можна досягти більш повного споживання субстрату мікроорганізмами, внаслідок того, що субстрат вноситься лише один раз і споживається продуцентом протягом усього часу культивування. На відміну від періодичного процесу під час безперервного можливе вимивання ще неспожитого середовища з ферментера. Оскільки йде накопичення екополісахариду, то кількість біомаси дуже не значна, а під час безперервного процесу культивування може також вимиватися біомаса, що призведе до значного зменшення кількості цільового продукту. Зважаючи на це обирається періодичний спосіб культивування.

Культивування продуцента може здійснюватися поверхневим або глибинним способами [19]. Обираємо глибинний спосіб, оскільки, за допомогою цього способу можливо насинтезувати більше даного екзополісахариду з подальшим виділенням левану в чистому вигляді.

Як зазначалося вище, даний штам є факультативним анаеробом тому під час виробничого культивування у ферментері повинні бути створені безкисневі умови. Для забезпечення таких умов достатньо проводити культивування в статичних умовах (з вимкненим перемішуючим пристроєм). В цьому випадку після засівання поживного середовища бактерії самі використають увесь розчинний кисень в середовищі і забезпечать анаеробні умови.

					НУХТ БТЕК 04.01.14. КР ПЗ		
		№	Підпис				
Розроб.	Щербина І.С.			<i>ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						36	23
Керівник	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						

Для проведення культивування факультативно анаеробного штаму бактерій *Paenibacillus polymyxa EJS* – 3 оптимальною є температура 24-25 °С, оскільки даний мікроорганізм є мезофілом. Оптимальним значенням рН для даного процесу буде рН = 7,5-8.[14] Такі умови є сприятливими для розвитку багатьох мезофільних та нейтрофільних мікроорганізмів. Також середовище, для культивування є складним (містить сахарозу та дріжджовий екстракт) , що також покращує розвиток на ньому різноманітних мікроорганізмів. Всі ці фактори підтверджують той факт, що *Paenibacillus polymyxa EJS* – 3 необхідно культивувати в стерильних умовах. Для перешкодження контамінації проводиться стерилізація обладнання (інокулятори, збірники, ферментери), комунікацій, поживних середовищ для культивування.

Отже, для виробничого левану за допомогою *Paenibacillus polymyxa EJS* – 3 використовують глибинний метод культивування періодичним способом, що відбувається в стерильних умовах без аерації середовища.

В залежності від умов культивування конструкція і облаштування ферментера може відрізнитися. Визначившись зі способом культивування та фізіолого-біохімічними особливостями продуцента обираємо необхідне оснащення для ферментера, яке б забезпечило створення даних умов. Анаеробні умови будуть забезпечуватись шляхом відсутності подачі повітря в ферментер, але для того щоб відводити надлишок CO₂ з середовища, якщо така необхідність виникне, то може проводитись подача газу (азоту) через барботер в ферментер.

Тому ферментер повинен бути забезпечений барботером для подачі газу, датчиком контролю рО₂ (для підтвердження анаеробних умов), газоаналізатором (для контролю кількості CO₂).

Для того щоб інтенсифікувати масообмінні процеси та досягти кращої гомогенізації культуральної рідини використовується перемішувач з частотою обертів 150 об/хв [11]. Існують лопатеві, турбінні, гвинтові, якірні, рамні та шнекові мішалки. Оскільки, культивування

продуцента не передбачає встановлення перемішуючого пристрою певної особливої конструкції і типу, то він обирається довільно. Тому можна обрати найпростішу та найдешевшу за конструкцією мішалку – лопатеву (шестилопатеву). В даному середовищі наявний дріжджовий екстракт, що може призводити до незначного піноутворення. Для запобігання утворенню піни, мішалка буде встановлюватись зверху апарата. Також, оскільки леван має низьку в'язкість необхідно встановити в ферментер відбивні перегородки, які будуть запобігати утворенню воронки під час перемішування.[32]

Для того щоб забезпечити сталу температуру культивування ферментер необхідно оснастити сорочкою і термометром, для контролю температури. Для контролю рівня рН культуральної рідини ферментер оснащується датчиком контролю рН.

Отже, для того щоб забезпечити необхідні умови культивування нам необхідний ферментер, який буде обладнаний шестилопатевою мішалкою, барботером, сорочкою, датчиками для контроль рН, рO₂, газоаналізатором.

5.1.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря

Raenibacillus polymyxa EJS – 3 є факультативним анаеробом, тому підготовка стерильного аераційного повітря для його культивування є необхідною. Для стерилізації повітря в боксах в лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом, використовують УФ-лампи.

Основною вимогою, що пред'являється до аеруючого повітря при культивуванні, є стерильність, під якою розуміється повна відсутність мікрофлори [33].

При вирощуванні мікроорганізмів в глибинних умовах потрібна безперервна подача стерильного повітря в ферментери, на аерацію культуральної рідини. Повітря, що подається в ферментер, не тільки постачає зростаючу культуру киснем, а й відводить газоподібні продукти обміну і фізіологічне тепло, що виділяється мікроорганізмом в процесі розвитку [34]. Використовуються методи газової очистки або застосування антисептиків, підвищені або знижені температури, ультрафіолетові випромінювання,

іонізуюче випромінювання тощо. Використання цих методів свідчить про їх ненадійність, так як спори та конідії мають високу стійкість до високих температур та іонізуючого випромінювання[34].

У процесах мікробіологічного синтезу повітря, що подається на аерацію, повинне бути очищене на 99,9999 % від домішок і мікроорганізмів розміром до 1 мкм [35]. Стадію підготовки аераційного повітря у разі великих його витрат здійснюють в окремих будівлях, у разі невеликих – в окремих приміщеннях. Підготовка аераційного повітря складається з таких стадій:

Забір атмосферного повітря. Забір повітря потрібно здійснювати зовні приміщення, із затінених і найменш забруднених місць, на висоті не менше 4 м від поверхні землі. Повітряна частина складається з корпусу з шиберам, завихрювача, заслінки і корпусу примусової подачі повітря.

Важливе значення має вибір місця для забору атмосферного повітря. Слід враховувати, що чим нижча температура всмоктуваного повітря, тим менше міститься в ньому вологи і тим вища його щільність [35]. Всмоктуване повітря обов'язково має проходити через пристрої, які очищають його від механічних домішок і вологи. Відносна вологість повітря, що надходить у компресор, не повинна перевищувати 65 %. При більшому вологовмісті всмоктуваного повітря необхідно передбачати його осушення [36].

Очищення повітря від пилу на плоских тканинних фільтрах грубого очищення. Фільтри грубого очищення призначені для уловлювання основної маси забруднення, що потрапили в систему після проходження фільтрів попереднього очищення і компресора, а також для подовження терміну служби фільтрів тонкого очищення, що виконують основний процес стерилізації на стадії фільтрації.

В якості фільтруючого матеріалу можна використовувати такі матеріали: скловату, скловолокно, бавовна, нетканий волокнистий шар із поліпропіленових або поліетиленових волокон тощо. Як фільтруючий матеріал обираємо скловату, а в верхніх шарах укладаємо ще чесану бавовну. Скловата служить попереднім фільтром і перешкоджає карамелізації бавовни при стерилізації. Такі фільтрувальні матеріали мають високу продуктивність

і таким чином здійснюється двоступеневе очищення повітря в одному апараті. Фільтр грубої очистки стерилізуємо гострою парою протягом 2 годин при тиску 0,4 мПа. Після стерилізації проводиться просушування фільтра стерильним нагрітим повітрям .

Після проходження повітря через фільтри грубої очистки відбувається його стиснення. Стиснення повітря проходить в компресорі (при цьому повітря нагрівається до температури 120-200 °С) [35].

Після стиснення повітря відбувається його охолодження до температури 25-30 °С, за якої волога повітря конденсується. Для цього використовується водяний теплообмінник типу «труба в трубі» [35].

Далі відбувається видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора в ресивер. Ресивер зменшує пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря. Цей процес відбувається в ємності великого об'єму [35].

Після видалення вологи відбувається нагрівання повітря

Очищення повітря на фільтрах тонкого очищення. На підприємствах ферментної промисловості використовується фільтр типу ФТО, всередині якого викладається елемент із гофрованої тканини Петрянова. Така тканина характеризується термостійкістю та механічною міцністю. [36].

Очищення повітря на фільтрах індивідуального очищення. Для очищення повітря використовується індивідуальний мембранний фільтр Microfluor II. Фільтр виготовляються в вигляді фільтропатронів і капсул.

Фільтр встановлюють перед кожним інокулятором, посівним апаратом та виробничим ферментером і забезпечує очистку повітря від часток діаметром 0,2 мкм. Отримуємо стерильне аераційне повітря зі ступенем очищення – 99% [36].

5.1.3. Обґрунтування вибору мийних та дезинфікувальних засобів

Щоб обрати мийний (для обладнань і комунікацій) та дезинфікувальний (для стін, підлоги, вікон, дверей) засіб, необхідно врахувати його вартість та витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м² затрачається 100 мл робочого

розчину мийних чи дезінфікувального засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).[37]

Вартість концентратів мийних та дезінфікувальних засобів та їх витрати при виробництві наведено в табл. 2.2.

Миття ферментера (250 л) та посівного апарату (20 л) відбуватиметься ручним способом. Об'єм мийного засобу складатиме близько 50 % об'єму обладнання.

5.1.3.1 Вибір мийного засобу для обладнання і комунікацій

Біомой - багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб з дезінфікуючим ефектом. Діючими речовинами є: алкілбензолсульфонат натрію (сульфанол) 5,0-8,0%; лужна протеаза 1,0-1,1%. Допоміжні речовини: натрій карбонат; диспергатор; наповнювач. Завдяки вдало збалансованій рецептурі Біомой має виражені властивості з очищення поверхонь, які обробляються, від жирів і білка [38].

Септоклін А11 - це нейтральний пінний засіб для миття робочих поверхонь обладнання. Містить суміш ПАВ, комплексоутворюючих речовин, барвник, зволожуючі компоненти. Засіб володіє хорошою миючою і знежирюючою дією. Видаляє забруднення олійно-жирового характеру. Ефективний в холодній і гарячій воді. Надає блиск оброблюваної поверхні [39].

Розчин каустичної соди (їдкий натр) - це безбарвна або слабо забарвлена рідина, може містити незначну кількість осаду. Мильна на дотик. За своїми хімічними властивостями каустична сода є сильною основою. Забезпечує очищення техніки, трубопроводів, ємностей, запчастин, механізмів, тари, інвентарю та інших зовнішніх і внутрішніх поверхонь, що характеризуються стійкістю до лугів, від жиру, білкового і маслянистого бруду [40].

5.1.3.2 Вибір дезінфікувальних засобів для стін, підлоги, вікон, дверей *Засоби на основі гуанідінових сполук*

Полідез 20 універсальний, екологічно безпечний засіб дезінфекції з високою антимікробною дією. Має сильну бактерицидну, фунгіцидну дію. Ефективний проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, аеробних, анаеробних мікроорганізмів. В тому числі, бактерій групи кишкової палички, стрептококів, стафілококів, сальмонел, а також біоценозів бактерій, грибів, водоростей і амеб. Діюча речовина: суміш солей полігексаметиленгуанідину. Застосовується для дезінфекції приміщень, інструменту, інвентарю, систем водопостачання, вентиляції і кондиціонування [41].

Гембар - для дезінфекції поверхонь, інвентарю і посуду. Активно діюча речовина - гуанідинова полімерна сполука, що є синтетичним аналогом природних гуанідинових сполук. Препарат має пролонговану бактерицидну, фунгіцидну, віруліцидну дію. Інактивує мікроби туберкульозу та сальмонели, грибки, віруси (в тому числі поліо-, адено-, гепатиту Б, герпесу, енцефалітний, грипу, ВІЛ) [42].

Недоліком гуанідинових засобів є фунгістатична дія (пригнічення росту мікроміцетів) при низьких концентраціях.

Хлорактивні препарати

Клорсепт-25 - бактерицидний засіб широкого спектра дії, що випускається у вигляді шипучих таблеток, володіє високою ефективністю і різноманітними дезінфікуючими якостями, що перевершують хлорне вапно, хлорамін, гіпохлорид. При розчиненні в воді утворює дезінфікуючі розчини відомого і точного дозування ефективні проти: бактерій (в тому числі мікобактерій туберкульозу, стафілококів), вірусів (включаючи ВІЛ-інфекцію, вірус гепатиту В та ін.), грибів і спор. В якості діючої речовини використовується дихлорізоціанурату натрія [43].

Дезактин - хлоровмісний препарат у вигляді порошку. До складу входять дихлорантин, диметилгідантоїн. Дезактин має широкий спектр бактерицидної, віруліцидної (включаючи парентеріальні вірусні гепатити, ВІЛ-інфекцію, рота-, паповавіруси), фунгіцидної (в т.ч. гриби роду *Candida*) дії. Препарат призначений для дезінфекції та очищення поверхонь всіх видів

(приміщення, меблі, прилади, інвентар, посуд, санітарно-технічне обладнання і т.д.) [44].

Недоліками хлорактивних препаратів є леткість, інгаляційна токсичність, виникнення дезрезистентних форм [45].

Засоби на основі амонієвих сполук

Дезекон ОМ лужний низькопінний концентрований дезінфекційний засіб на основі композиції четвертинних амонієвих солей, амінів і бігуанідів для дезінфекції, комплексної мийки, дезодорування. Засіб має бактерицидні (включаючи збудників туберкульозу, *P.aeruginosa*, *S.aureus*), віруліцидні (включаючи віруси гепатитів В, С, ВІЛ, герпесу, грипу), фунгіцидні (проти збудників кандидозів і дерматомікозів, а також цвілевих грибів *A.niger*) властивості. При підвищенні температури розчинів їх антимікробну активність і миюча здатність збільшуються [46].

Дезефект - ефективний і безпечний рідкий концентрований дезінфекційний засіб з мийною дією для дезінфекції. Дезефект має антимікробні властивості проти широкого спектра грам + і грам- бактерій (включаючи збудників гнійно-септичних та інших інфекцій, збудників холери, туберкульозу, легіонельозу), вірусів (в т.ч. вірусів грипу, герпесу, аденовірусів, ВІЛ, вірусів гепатитів А, В, С, рото-, поліо-, ентеровірусів тощо), патогенних грибів роду *Candida*, збудників дерматомікозів, цвілевих грибів, а також володіє спороцидною дією [47].

Недоліками даних дезінфікувальних засобів є зниження ефективності в присутності органічних матеріалів, легко абсорбуються і нейтралізуються багатьма матеріалами (бавовна, шерсть), несумісні з милом із-за лужності [45].

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва левану

P. polytuxa

Назва мийного/дезінфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Біомой [1]	Обладнання, інвентар, комунікації	0,3	2000	1000	98,4	295,2
Септоклін А11 [2]	Обладнання, інвентар, комунікації	1,0	2000	1000	27,0	270
Каустична сода [3]	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	2000	1000	19,20	384
Полідез 20 [4]	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,1	1390	139	275	38,23
Гембар [5]	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,1	1390	139	432	60,1
Клорсепт-25 [6]	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,15	1390	139	386	53,6
Дезактин [7]	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,1	1390	139	220	30,6

Дезекон ОМ [8]	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,1	1390	139	255	35,4
Дезефект [9]	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,1	1390	139	330	45,87

Примітка: ціни наведені станом на травень 2020 р. 1. <http://farmakos.ua/ua/price.html> 2. <https://energomash.net.ua/p13141309-sredstvo-dlya-ruchnoj.html> 3. <https://harkov.flagma.ua/soda-kausticheskaya-o3060473.html> 4. <https://prom.ua/ua/p349638546-dezinfitsiruyushee-sredstvo-polidez.html> 5. <https://spilna-meta.com.ua/p257133652-dezinfitsiruyushee-sredstvo-gembar.html> 6. <https://kiev.prom.ua/ua/p42668642-klorsept-300-tabl.html?primelead=MS4xMQ%3D%3D> 7. <https://www.mpi-dpr.com.ua/uk/dlya-medicinskikh-uchrezhdenij/9-dezaktin-khlorsoderzhasnij-preparat-1-kg.html> 8. <https://kiev.prom.ua/ua/p80899089-sanikon-dezekon.html> 9. <https://interdez.com.ua/product/dezefekt-unvcpd>

Отже, після аналізу даних наведених в таблиці можна зробити наступні висновки:

- дезінфікувальні засоби варто застосовувати інтервалом в 3 місяці для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів;
- для миття обладнання, інвентарю, комунікацій доцільно використовувати мийний засіб «Септоклін А11»;
- для миття і дезінфекції стін, підлоги, вікон і дверей – Дезекон ОМ, Дезактин, Полідез 20.

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез левану (35,45 г/л за 60 год) досягається за умов росту штаму *Paenibacillus polymyxa EJS – 3* на середовищі такого складу (г/л): Сахароза – 190; дріжджовий екстракт – 25; CaCl₂ – 0,35; K₂HPO₄– 5. [11].

Згідно з розрахунками, які наведені у розділі 1, виробничий біосинтез левану здійснюється у ферментері об'ємом 250 л.

Одержання інокуляту відбувається у 2 етапи (у колбах на качалці, у посівному апараті на 20 л).

5.1.4.1 Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах

Для приготування 1 л посівного матеріалу в колбах об'ємом 750 мл, компоненти поживного середовища необхідно розділити на композиції. Стерилізація буде проходити у автоклаві.

Таблиця 5.2

Склад та підготовка поживного середовища для підготовки посівного матеріалу в колбах

Компоненти поживного середовища, (г/л)	Композиторія	Режим стерилізації
Сахароза – 30 Дріжджовий екстракт – 5	А	112 °С, 30 хв

$K_2HPO_4 - 3$	Б	131°C, 30 хв
----------------	---	--------------

5.1.4.2 Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л

Для одержання 10,1 л посівного матеріалу використовують інокулятор об'ємом 20 л. Стерилізація першої композиції буде проходити в автоклаві, другої – в інокуляторі.

Таблиця 5.3

Склад та підготовка поживного середовища для підготовки посівного матеріалу в інокуляторі

Компоненти поживного середовища, (г/л)	Композиторія	Режим стерилізації
Сахароза – 30 Дріжджовий екстракт – 5	А	112 °С, 30 хв
$K_2HPO_4 - 3$	Б	131°C, 30 хв

5.1.4.3 Підготовка і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 250 л

Виробничий біосинтез продукту проходить у ферментері з геометричним об'ємом 250 л. Робочий об'єм становить 111,3 л з урахуванням коефіцієнту заповнення 0,6. Стерилізація першої композиції буде проходити безпосередню у ферментері, другої – в автоклаві.

Для приготування 101,2 л поживного середовища, потрібно мати збірник для першої композиції та колби – для решти композицій.

Таблиця 5.4

Склад та підготовка поживного середовища для виробничого біосинтезу

Компоненти поживного середовища, (г/л)	Композиція	Режим стерилізації
Сахароза – 30 Дріжджовий екстракт – 25	А	112 °С, 30 хв
КН ₂ РО ₄ – 5	Б	131°С, 30 хв

Також готують піждивлючий розчин для виробничого культивування *Raenibacillus polytuxa EJS* - з наступного складу:

Таблиця 5.5

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 46 л, кг	Композиція	Режим стерилізації
Сахароза	160	16,2	А	112 °С, 30 хв

Також додатково готують стерильний розчин NaOH (6%) та HCl (6%) для контролю рівня рН під час виробничого біосинтезу. Готують та стерилізують дані розчини в об'ємі 1 л, стерилізують в колбах в автоклаві.

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Природні полісахариди присутні в складі рослинних і тваринних тканин у вигляді складно-побудованих систем. Хоча методи виділення полісахаридів з природної сировини надзвичайно різноманітні, і неможливо описати стандартну процедуру, існує ряд загальних вимог і підходів. Обраний спосіб виділення повинен відповідати двом основним вимогам. По-перше, процес повинен бути максимально ефективним, супроводжуватися незначними втратами на всіх етапах отримання. По-друге, в процесі виділення полісахарид повинен піддаватися можливо менших змін [5].

При виділенні індивідуальних полісахаридів доводиться вирішувати три завдання різного ступеня складності (слід зазначити, що вони рідко є послідовними етапами виділення) [48]:

- 1) відділення низькомолекулярних речовин;
- 2) відділення біополімерів неуглеводної природи
- 3) поділ сумішей полісахаридів.

При виборі методу для вирішення чергового завдання слід враховувати ті властивості цільового біополімера, за якими він відрізняється від інших компонентів вихідної суміші; ці відмінності і повинні виявлятися за допомогою застосування шуканого методу. З огляду на різноманіття вивчених полісахаридів, розробка стандартної процедури їх виділення і очищення є неможливою. Проте, незалежно від природи цільового з'єднання процес повинен бути максимально ефективним, тобто забезпечувати максимальний вихід продукту; полісахарид не може бути піддано деструкції під впливом хімічних реагентів, використаних для його виділення, або ферментів, присутніх у складі сировини.

5.2.1. Обґрунтування способу відділення біомаси

Оскільки леван – екзополісахарид, який є основним компонентом клітинної стінки бактерій, тому першим етапом в процесі очищення цільового продукту буде розділення культуральної рідини і клітинної біомаси. Для подальшого процесу обробки необхідна тільки біомаса.

Для відділення бактеріальної біомаси застосовуються такі методи розділення: флотація, фільтрація, ультрафільтрація, центрифугування, екстракція, діаліз, хроматографія.

Флотація

Флотація – один з видів адсорбційно – бульбашкового поділу, заснований на формуванні спливаючих агломератів забруднень з диспергованої газової фази і подальшим їх відділенням у вигляді шламу[50].

Перевагами флотації є:

- неперервність процесу,
- широкий діапазон застосування,
- невеликі капітальні і експлуатаційні витрати,
- проста апаратура,
- селективність виділення домішок, що в порівнянні з відстоюванням велика швидкість процесу,
- можливість отримання шламу більш низької вологості (90-95%), висока ступінь очищення (95-98%),
- можливість рекуперації речовин видаляються.

Метод флотації використовується в тому випадку, якщо клітини продуцента в силу низької змочуваності накопичуються в поверхневих шарах вмісту апарату[49].

В даному випадку цей метод не доцільно використовувати, оскільки бактерії розподіляються по всій товщі культуральної рідини і будуть погано розділятися флотаційним методом.

Ще одним недоліком є високі втрати біомаси до 15%, а також низький ступінь концентрування. Зважаючи на те, що кількість полісахариду на пряму залежить від кількості біомаси даний вид розділення не може бути використаний.

Фільтрація.

Принцип роботи різних застосовуваних на даний час фільтрувальних систем (барабанні, стрічкові, тарілчасті фільтри, карусельні вакуум-фільтри, фільтри-преси, мембранні фільтри) засновані на однаковому принципі –

затримки біомаси за допомогою пористої фільтрувальної перегородки. Залежно від характеру робочого процесу виділяють фільтри періодичної і безперервної дії. Вони можуть працювати як під вакуумом, так і при надлишковому тиску.

Для фільтрів безперервної дії підведення суспензії, відведення осаду і відведення фільтрату (або відведення загущеною суспензії) відбувається безперервно. А в фільтрах періодичної дії ці стадії розділені в часі (перериваються).

Недоліком способу є явище налипання клітин на фільтри, та забивання пор фільтруючого елемента білками і іншими колоїдними частинками, це знижує швидкість потоку рідини в процесі фільтрування, збільшує енерговитрати на підтримання процесу. Тому цей спосіб не є ефективним для бактеріальної культури[50].

Ультрафільтрація.

Ультрафільтрація здійснює затримку колоїдних і тонкодисперсних домішок, мікроорганізмів, бактерій і вірусів, розчинених солей важких металів, заліза, ртуті, миш'яку, марганцю, свинцю і т. д. Діаметр пор може досягати 0,02 мкм. Головною перевагою є високий ступінь очистки. Добре підходить, якщо цільовий продукт розчинений в культуральній рідині. В даному випадку такий метод не доцільно використовувати, оскільки цільовий продукт міститься на поверхні клітин, а не в культуральній рідині. І як у випадку зі звичайною фільтрацією також будуть закупорюватись пори мембран, що не є ефективним[51].

Центрифугування

Виділяють два основних типи центрифуг: відстійні і фільтруючі. Відстійні центрифуги використовують для розділення емульсій і суспензій за допомогою осадження дисперсних частинок під впливом відцентрових сил. У хімічній галузі також широко застосовуються фільтруючі центрифуги[50].

Якщо розділяти центрифуги за призначенням, то можна виділити фільтруючі і сепаруючі центрифуги.

Фільтруючі центрифуги оснащуються барабанами, покритими зсередини, як правило, тканиною або інший фільтруючою перегородкою. Даний тип центрифуг використовується для розділення суспензій, мають зернисту або тверду кристалічну фазу, а також тверді і штучні матеріали.

Сепаруючі центрифуги теж оснащені суцільним барабаном. Даний тип центрифуг найчастіше використовуються для поділу концентрованих суспензій і емульсій.

Даний спосіб вимагає більш дорогого устаткування, ніж фільтрування, тому він застосовується, якщо:

- а) суспензія фільтрується занадто повільно;
- б) виникає необхідність максимального звільнення культуральної рідини від наявних в ній частинок;
- в) потрібно забезпечити безперервний процес сепарації, коли фільтри розраховані на періодичну дію.

Враховуючи те, що кількість продукту залежить від кількості біомаси, яку нам потрібно відділити з найменшими втратами, то фільтрування в даному випадку не підходить. Тому для відділення біомаси від культуральної рідини доцільніше використовувати сепаруюче центрифугування. Цей метод має ряд переваг:

- немає потреби в застосуванні фільтрувальних елементів
- матеріал обробляється з найменшими витратами активної речовини
- процес легше піддається автоматизації, оскільки агрегати займають менше місця, легше мити устаткування.

Отже, виходячи з вищенаведеної інформації для відділення біомаси від культуральної рідини найкраще застосовувати центрифугування. Так як об'єм культуральної рідини, що зливається за одну ферментацію, є малим (101 л), а концентрація продукту – 35.5 г/л, і для відділення біомаси необхідно 10000 об/хв можна використати центрифугу Biotechno серії CEPATZ-5[52].

5.2.2.Руйнація клітинних капсул

Наступним етапом виділення полісахариду є руйнація клітинних капсул. Клітинні капсули можна зруйнувати ультразвуком або додати до біомаси хімічну речовину, яка ці капсули розчинить. При застосуванні ультразвуку разом з капсулами можна зруйнувати клітини і в такому випадку вивільниться велика кількість сторонніх метаболітів, що є не бажаним. Тому даний метод не доцільно використовувати.

Оскільки відомо з літератури [3] відомо, що леван добре розчиняється в лужних розчинах, то капсули можна розчинити, подіявши на них розчинником NaOH у концентрації 0,5 М[3]. Клітини витримають таку концентрацію лугу і не зруйнуються. Відповідно забруднення продукту сторонніми метаболітами не буде. Тому найбільш доцільно використовувати даний метод руйнації клітинних капсул.

5.2.3.Центрифугування

На цьому етапі проводять центрифугування для відділення розчиненого полісахариду від залишків клітин. Доцільно відділити полісахарид від клітин за допомогою сепаруючої центрифуги UNRF360, яка за всіма технологічними характеристиками буде ідеально підходити для даного етапу [51].

5.2.4. Ультрафільтрація

Далі полісахарид відфільтровують на фільтрах діаметри пор яких будуть меншими за мінімальні розміри молекул екзополісахариду для відділення низькомолекулярних сполу к(солі , амінокислоти тощо).

Леван має молекулярну масу понад 10 мільйонів Да. Полімер з довгим ланцюгом намотується в щільно упаковану сферу діаметром 50-200 Нм.[3] Відповідно діаметр пор не має бути більшим 50 нм. Таку ультрафільтрація можливо здійснити за допомогою ультрафільтраційної установки УФ-201 компанії “ Biotechno”, фільтри діаметром пор 50 нм також можна замовити в даної компанії [53]. Після фільтрації екзополісахарид відправляють на сушіння.

5.2.5.Осадження полісахариду.

Для осадження полісахариду застосовують декілька методів, недоліки та переваги яких наведені нижче:

Екстракція. Метод екстракції на увазі витяг речовин, що містяться в сировині, в розчин, і використовується як початковий етап очищення. Можливо два варіанти екстракції:

1) розчинення полісахариду і ряду супутніх речовин і відділення нерозчинних домішок. Таким чином отримують рослинні і деякі бактеріальні екзополісахариди. Найчастіше в якості розчинника використовують воду, проте полісахариди з великою кількістю кислотних функціональних груп краще розчиняються в розбавлених мінеральних кислотах, а геміцелюлози екстрагують в лужному середовищі.

Екстракція полісахаридів супроводжується розчиненням полярних низькомолекулярних сполук, деяких білків і нуклеїнових кислот, тому подальша обробка екстракту передбачає видалення цих речовин.

2) виділення полісахариду з суміші у вигляді осаду. Так, хітин і целюлоза зберігають цілісність структури при жорсткій лужній або окислювальній обробці, яка призводить до деструкції інших біополімерів.

Екстракція вимагає попереднього подрібнення сировини; при цьому частина фібрилярних молекул може бути пошкоджена або механічним шляхом, або окисленням киснем повітря (останнє - в лужному середовищі). Необхідність в екстракції відпадає при виділенні полісахаридів з рідин біологічного походження, де вони спочатку знаходяться в розчині (культуральні рідини, плазма крові і т.д.) [54].

Діаліз. В процесі діалізу розчин екстракту поміщають в целофан, занурений у воду, при цьому низькомолекулярні домішки дифундують через целофан назовні. Дифузія прискорюється під дією електричного поля (електродіаліз) або при перемішуванні. Для видалення катіонів з розчинів кислих полісахаридів діаліз проводять в підкисленому середовищі [54].

Хроматографія - поділ речовин, що розрізняються за певними фізико-хімічними параметрами [55]. Вид хроматографії, заснований на поділі речовин за молекулярною вагою - гель-фільтрація на сефандексі. Сефандекс -

напівсинтетичний сорбент полісахаридної природи; його гранули містять пори і формують т. зв. "Молекулярне сито", яке затримує всередині низькомолекулярні речовини і не перешкоджає дифузії полімерів. Існують набори сефандексів з різною величиною пір для поділу суміші полісахаридів. Таким способом одержують декстрини.

Іонообмінна хроматографія дозволяє розділити речовини відповідно до їх заряду (наприклад, відокремити кислі полісахариди від нейтральних). Іонообмінник - це твердий носій заряджених груп, який здатний за рахунок електростатичної взаємодії зв'язувати іони досліджуваних молекул.

Розподільча хроматографія виявляє різну рухливість досліджуваних речовин при розподілі останніх між двома фазами, стаціонарної (матрикс = носій = сорбент) і мобільного (розчинник = проявник) [55]. Адсорбційна хроматографія може розділити речовини в тому випадку, якщо при однакових концентраціях вони демонструють різну ступінь зв'язування з сорбентом. Труднощі, які виникають при використанні даних видів хроматографії при роботі з розчинами полісахаридів, обумовлені схильністю останніх до міжмолекулярної асоціації та утворення колоїдних розчинів.

Осадження. Полісахарид може бути осаджений з супернатанту додаванням полярного органічного розчинника, що змішується з водою, наприклад спирт або ацетон. Пропорції розчинника можуть бути різні, це може бути один, два або три об'єми до об'єму культуральної рідини, хоча найчастіше використовуються два об'єми. Органічні розчинники викликають осаження, знижуючи розчинність екзополісахаридів в воді. Вони також можуть бути використані для знебарвлення і для екстракції низькомолекулярних продуктів ферментації і компонентів середовища. Під час осаження білки і солі середовища можуть також осідати разом з екзополісахаридами, але так як перед цим була застосована ультрафільтрація, цю проблему було знижено.

Отже, з вищенаведених методів виділення екзополісахариду найбільш придатним, найменш затратним та підходящим для левану та даного процесу

буде метод осадження органічним розчинником, оскільки він достатньо простий у використанні і не потребує високовартісного обладнання.

Осадження полісахариду проводять додавши до попередньо відфільтрованого спиртового розчину ЕПС етиловий спирт (96%) у пропорції розчинника два об'єми до об'єму спиртового розчину. В результаті отримуємо ЕПС від світло-коричневого до кремово-білого забарвлення.

Після осадження екзополісахарид відправляється на центрифугування для відділення спирту.

5.2.6 Центрифугування

На цьому етапі проводять центрифугування для відділення етилового спирту від чистого екзополісахариду. Доцільно вбуде виконати данне відділення за допомогою сепаруючої центрифуги UNRF360, яка за своїми технологічними характеристиками буде ідеально підходити для даного етапу [51].

5.2.7.Обґрунтування способу сушіння

Сушіння – видалення рідини (вологи) з твердих, рідких і газоподібних матеріалів (продуктів, препаратів). В даний час з відомих сушарок, розроблених для мікробіології, знайшли застосування розпилювальні сушарки з дисковим і форсунковим розпиленням, вакуумні сушарки, вальцьові сушарки (у гідролізній промисловості), ліофільні (сублімаційні) сушарки (у виробництві бактеріальних препаратів, ферментів) та стрічкові. Методи сушіння і конструкції сушарок в значній мірі визначаються режимами сушки для конкретного матеріалу, що забезпечують високу якість сухого продукту при найменших капіталовкладеннях і енерговитратах. Це особливо характерно для продуктів мікробного синтезу, оптимальні режими і методи сушіння яких можуть бути визначені після вивчення не тільки фізико-хімічних і теплофізичних характеристик, але і біологічних властивостей. Специфіка сушіння пов'язана з порівняно низькою термостійкістю і вимогами максимально можливої зберігання цільових продуктів біосинтезу в кінцевих препаратах [56].

Розпилюючі сушарки

У мікробіологічної промисловості в основному використовуються розпилювальні сушарки з дисковим розпиленням.

Для рідких продуктів, що піддаються процесу сушки (розчинів солей, суспензій, емульсій), застосовують розпилюючі сушарки. Сушильний агент — повітря або димові гази — подаються в сушильну камеру, куди подається висушуваний продукт. У таких умовах створюється велика поверхня випаровування висушуваного продукту і забезпечується хороший контакт з теплоносієм, тому сушка відбувається надзвичайно швидко. Час сушіння 15-30 сек. Навіть при високій температурі теплоносія розкладання продукту в розпилюючих сушарках не відбувається, і в результаті отримують тонкоподрібнений продукт високої якості.

Розпилювання дисками придатно для суспензій і в'язких рідин, але вимагає великих витрат енергії. У розпилюючих сушарках досягається хороший контакт матеріалу з сушильним агентом, проте об'єм сушильної камери повинен бути великим. Тому такий спосіб сушки застосовується тільки в тих випадках, коли початковий продукт знаходиться в рідкому стані[57].

Вакуумні сушарки

Сушарка працює в періодичному режимі і являє собою шафу циліндричної форми та закривається герметично.

Перевагою вакуумних сушарок є можливість сушіння матеріалів при невисоких температурах, менша витрата тепла, можливість уловлювання пари цінних компонентів (наприклад, пари спиртів та органічних рідин), кращі санітарні та безпечні умови роботи обслуговуючого персоналу, швидкість процесу, рівномірне висушування, компактність установки.

Недоліками таких сушарок, необхідність застосування ручної праці, більші витрати часу на сушіння відносно розпилювальних сушарок, завантаження й вивантаження матеріалу вручну[57].

Вальцьові сушарки

Вальцьові сушарки призначені для сушіння пастоподібних матеріалів з одночасним формуванням висушеного матеріалу у формі таблеток і гранул певної форми. Одержали поширення одно- та двовальцеві атмосферні й вакуумні сушарки.

Сушарка працює безперервно, ручне завантаження повністю виключене, але конструкція придатна тільки для сушки рідких і пастоподібних продуктів[57].

Ліофільні (сублімаційні) сушарки

Ліофілізація – це процес видалення води із замороженого матеріалу. Лід сублімується безпосередньо в пар, без проходження через рідку фазу. Процес здійснюється в вакуумних умовах заморозкою продукту від 10 до 70 °С .

Метою ліофілізації є отримання добре розчинної у воді речовини. При додаванні води відновлена речовина має зберігати ті ж характеристики, що й вихідна завдяки тому, що ліофілізація відбувається при охолодженні до дуже низьких температур, можна зневоднювати речовини, які не переносять високих температур, наприклад білки, ферменти, вітаміни і т. д[50].

Метод ліофілізації дозволяє отримувати сухі препарати без втрати їх кількісної та якісної цілісності, але з недоліків варто згадати високу вартість обладнання. Конструкція сублімаційної сушарки так ж, як у вакуумної.

Стрічкові сушарки

Основною частиною стрічкової сушарки є горизонтальна нескінченна стрічка , яка рухається в камері. Матеріал поступає з одного кінця стрічки і скидається з іншого її кінця. Дійшовши до кінця стрічки, він висипається на стрічку, що пролягає нижче, а починає рухатися в протилежному напрямі. Такий рух здійснюється багато разів, поки матеріал не досягне вихідного отвору. Стрічкові багатоярусні сушарки застосовуються для сушки сипких і кристалічних продуктів, не вимагають ручної праці на завантаження і вивантаження продукту, досить компактні. Можна застосовувати для

великих так і для малих обсягів продукції. Прості в експлуатації. Недоліками для висушування саме левану є занадто низька температура процесу 50-70°C, а для сушіння даного екзополісахариду необхідна температура 105°C, також дані сушарки є достатньо громіздкими та дорогими в обслуговуванні. [57].

З наведених даних можна зробити висновок, що для висушування левану доцільніше застосовувати вакуум-випарну сушарку Uoslab СВ-80[58], оскільки в цього типу сушарок:

- проста експлуатація;
- достатня продуктивність;
- досить компактні;
- рівномірне висушування;
- вони добре підходять для висушування термостабільних продуктів.

РОЗДІЛ 6

МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ

З техніко економічного розрахунку потреба в субстанції екзополісахариду складає $G_{нд} = 26$ кг. За умовами замовника цю кількість левану потрібно виробити за $T_{рд} = 30$ днів. За літературними даними [11] максимальний синтез полісахариду, $35,45$ г/л, досягається за умов росту штаму *Raenibacillus polytuxa* EJS – 3 на середовищі такого складу (г/л): Сахароза – $C_1=190$; дріжджовий екстракт – $C_2 = 25$; $CaCl_2$ – $C_3 = 0,35$; K_2HPO_4 - $C_4 = 5$. Всього – $C_{\Sigma} = 220,35$ г/л.

Для отримання потрібної концентрації левану готують підживлювальний розчин наступного складу (г/л): Сахароза – 160; Дріжджовий екстракт - 20; K_2HPO_4 - 2 ; $CaCl_2$ – 0,35.

Посівний матеріал вирощують на поживному середовищі такого складу (г/л): сахароза – $C_1=30$ г/л; дріжджовий екстракт – $C_2=5$ г/л; K_2HPO_4 - $C_2=3$ г/л. Всього – $C_{\Sigma} = 38$ г/л.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера $T_{Цф} = T_{ф} + T_{по} = 60 + 6,5 = 66,5$ год, де $T_{по}$ – час підготовчих операцій; коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) $K_1 = 1,1$; коефіцієнт заповнення ферментера, частка (0,5 – 0,65); приймаємо $K_3 = 0,6$; коефіцієнт заповнення посівного апарата, частка $K_{па} = 0,6$; коефіцієнт заповнення колб, частка $K_{кол} = 0,2$; коефіцієнт заповнення збірника, частка (0,7 – 0,8) $K_{зб} = 0,8$. Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{св} = 0,3$; кількість посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка (0,05 – 0,1) $X_{ф} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для посівних апаратів, частка (0,02 – 0,1) $X_{па} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для інокуляторів, частка (0,02 – 0,1) $X_{ин} = 0,1$;

					НУХТ БТЕК 04.01.14. КР ПЗ		
		№	Підпис				
Розроб.	Щербина І.С.			<i>МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						60	17
Керівник	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						

кількість посівного матеріалу для качалочних колб, частка (0,02 – 0,1) $X_{\text{кол}} = 0,1$; втрати культуральної рідини при біосинтезі, частка (0,1 – 0,2) $E_{\text{ф}} = 0,1$; втрати посівного матеріалу при його культивуванні в посівних апаратах, частка (0,1 – 0,2) $E_{\text{па}} = 0,1$; втрати посівного матеріалу при його культивуванні в інокуляторах, частка (0,05 – 0,1) $E_{\text{ін}} = 0,1$; втрати посівного матеріалу при його культивуванні в колбах, частка (0,01 – 0,05) $E_{\text{кол}} = 0,01$.

6.1. Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)

Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)

- Кількість продукту на добу,

$$G_{\text{нд}} = G_{\text{нт}}/T_{\text{рд}} = 26/30 = 0,87 \text{ кг/добу.}$$

- Кількість левану за цикл,

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{нд}} T_{\text{цф}}/24 = 0,87 \cdot 66,5/24 = 2,41 \text{ кг/цикл.}$$

- Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл):

$$V_{\text{кр}} = K_1 G_{\text{цк}} C P_{\text{гп}}/P_{\text{кр}}(1 - E_{\text{св}}) = 1,1 \cdot 2,41 \cdot 0,94/35,5 \cdot 0,7 = 0,1002 \text{ м}^3.$$

- Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{\text{цк}} = G_{\text{нд}}/G_{\text{цк}} = 26/2,41 = 11 \text{ циклів.}$$

- Вихід продукту з 1 м³ культуральної рідини, л/м³:

$$q_{\text{цк}} = G_{\text{цк}} 1000/V_{\text{кр}} = 2,41 \cdot 1000/0,1002 = 24.$$

6.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу

6.2.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

Кількість поживного середовища (ПС) та посівного матеріалу (ПМ) в ферментері до культивування становить:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{кр}}/(1 - E_{\text{ф}}) = 100,2/(1 - 0,1) = 111,3 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в ферментері складе:

$$V_{\text{пс}} = V_{\text{ф}}/(1 + X_{\text{ф}}) = 111,3/(1 + 0,1) = 101,2 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву ферментера:

$$V_{\text{пмф}} = V_{\text{ф}} - V_{\text{пс}} = 111,3 - 101,2 = 10,1 \text{ л.}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{зф} = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{гф} = V_{ф}/K_{зф} = 111,3/0,6 = 186$ л

Обираємо стандартний ферментер геометричним об'ємом 250 л .

6.2.1.1 Визначаємо кількість стадій вирощування посівного матеріалу

Оскільки кількість ПМ становить $X_{ф} = X_i = 0,1$ від кількості ПС визначаємо кількість ПМ для інших стадій. Приблизна кількість ПМ для інших стадій становитиме:

ПМ для ферментера з посівного апарату:

$$V_{пмф} = 10,1 \text{ л .}$$

$$V_{ін} = V_{пмф} / K_{з} = 10,1 / 0,6 = 16,8 \text{ м}^3$$

Обираємо інокулятор з геометричним об'ємом 20 л.

ПМ для посівного апарату з качалочних колб:

$$V_{пма} = V_{пін1} X_{ін} = 10,1 \cdot 0,1 = 1,01 \text{ л}$$

$$n_{колб} = V_{пма} / V_{колб} \cdot K_{зколб} = 1,01 / 0,75 \cdot 0,2 = 7 \text{ колб.}$$

Отже, маємо 2 ступеневу стадію отримання ПМ.

6.2.1.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері геометричним об'ємом 250л

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного

середовища $V_{пс}$ складають:

$$G_{заг} = V_{пс} C_{\Sigma} = 0,1012 \cdot 38 = 3,846 \text{ кг, в тому числі по компонентно, г:}$$

$$\text{Сахароза} - G_1 = G_{заг} (C_1/C_{\Sigma}) = 3846 \cdot (30/38) = 3036$$

$$\text{Дріжджовий екстракт} - G_2 = G_{заг} (C_2/C_{\Sigma}) = 3846 \cdot (5/38) = 506$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 - G_4 = G_{заг} (C_4/C_{\Sigma}) = 3846 \cdot (3/38) = 304$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Кількість води визначають за наступною формулою

$$V_{\text{в}} = V_{\text{пс}} - G_{\text{заг}} - V_{\text{дод.с}} - V_{\text{дод.дж}} - V_{\text{р.с.}} \times (V_{\text{пс}} \times K_{\text{кон}}),$$

де $K_{\text{кон}}$ – частка конденсату у загальні кількості води, що йде на приготування середовища, $V_{\text{дод.с}}$ – об'єм води для приготування сахарози для додаткового підживлення, $V_{\text{дод.дж}}$ – об'єм дріжджового екстракту для додаткового підживлення, $V_{\text{р.с.}}$ – об'єм води для приготування розчину солей для додаткового підживлення (K_2HPO_4 і CaCl_2), а $V_{\text{пс}} \times K_{\text{кон}}$ – загальна кількість утвореного конденсату.

В залежності від способу стерилізації та використовуваного обладнання величина $K_{\text{кон}}$ може складати:

$K_{\text{кон}} = 0$ при стерилізації в колбах на качалці; у разі стерилізації компонентів поживного середовища у реакторі-змішувачі або у ферментері $K_{\text{кон}} = 0,1-0,15$ при стерилізації компонентів в УБС $K_{\text{кон}} = 0,1$.

Якщо об'єм поживного середовища у ферментері складає $V_{\text{пс}} = 101,2$ л.

Тоді кількість конденсату становитиме:

$$V_{\text{фк}} = V_{\text{пс}} \cdot K_{\text{кон}} = 101,2 \cdot 0,1 = 10,12 \text{ л.}$$

При цьому частка конденсату – $K_{\text{кон}}$ становитиме 0,1.

Додатково готують розчин солей K_2HPO_4 і CaCl_2 у кількості 2 г/л та 0,35 г/л відповідно для виробничого біосинтезу, за даними статті (). Тобто, всього необхідно приготувати - $V_{\text{р.с.}} = 1,5$ л.

Під час біосинтезу левану необхідно досягти 190 г/л концентрації сахарози. Таку кількість вуглецю вносити відразу недоцільно, бо це спричинятиме подовженню лаг-фази та появи катаболітної репресії. Вносять підживлювальний розчин у вигляді 40 % розчину. Останню порцію підживлювального розчину слід вносити за 12 год до закінчення культивування. Тобто, якщо загальна тривалість процесу культивування *Raenibacillus polytuxa* EJS – 3 60 год, то даний підживлювальний розчин

слід вносити з 24 год культивування до 48 год культивування, тобто кожні 8 год Розрахунок підживлення наведено нижче;

Розрахунок сахарозного підживлення

Вихідні дані:

Об'єм поживного середовища без посівного матеріалу $V_{\text{пс}} = 101,2$ л.

Коефіцієнт заповнення $K_z = 0,6$

Кінцева концентрація джерела вуглецю $C_k = 190$ г/л (кг/м³)

Початкова концентрація джерела вуглецю $C_{\text{п}} = 30$ г/л (кг/м³)

Концентрація розчину підживлення $C_{\text{ж}} = 400$ г/л (кг/м³)

Кількість етапів підживлення $n = 4$

1. Розрахунок початкової маси джерела вуглецю

$$m_{\text{п}} = V_{\text{р}} \cdot C_{\text{п}} = 0,1012 \cdot 30 = 3,036 \text{ кг}$$

2. Розрахунок сумарної кінцевої маси джерела вуглецю

$$m_{\text{к}} = V_{\text{р}} \cdot C_{\text{к}} = 0,1012 \cdot 190 = 19,228 \text{ кг}$$

3. Розрахунок сумарної маси джерела вуглецю в підживленні

$$m_{\text{ж.сум.}} = m_{\text{к}} - m_{\text{п}} = 19,228 - 3,036 = 16,192 \text{ кг}$$

4. Розрахунок сумарного об'єму розчину підживлення

$$V_{\text{ж.сум.}} = m_{\text{ж.сум.}} / C_{\text{ж}} = 16,192 / 400 = 40,5 \text{ л}$$

5. Розрахунок одноразового об'єму розчину підживлення

$$V_{\text{ж}} = V_{\text{ж.сум.}} / n = 40,5 / 4 = 10,125 \text{ л}$$

Ще для отримання максимального виходу левану, готують підживлюючий розчин 50 % дріжджового екстракту для додаткового підживлення. Аналогічно до розрахунків з підживлюючим розчином сахарози:

Вихідні дані:

Об'єм поживного середовища без посівного матеріалу $V_{\text{пс}} = 101,2$ л

Коефіцієнт заповнення $K_z = 0,6$

Кінцева концентрація дріжджового екстракту $C_k = 25$ г/л (кг/м³)

Початкова концентрація дріжджового екстаркту $C_{\text{п}} = 5$ (кг/м³)

Концентрація розчину підживлення $C_{\text{ж}} = 500$ г/л (кг/м³)

Кількість етапів підживлення $n = 4$

1. Розрахунок початкової маси дріжджового екстракту

$$m_{п} = V_{р} \cdot C_{п} = 0,1012 \cdot 5 = 0,506 \text{ кг}$$

2. Розрахунок сумарної кінцевої маси дріжджового екстракту

$$m_{к} = V_{р} \cdot C_{к} = 0,1012 \cdot 25 = 2,53 \text{ кг}$$

3. Розрахунок сумарної маси дріжджового екстракту в підживленні

$$m_{ж.сум.} = m_{к} - m_{п} = 2,53 - 0,506 = 2,024 \text{ кг}$$

4. Розрахунок сумарного об'єму розчину підживлення

$$V_{ж.сум.} = m_{ж.сум.} / C_{ж} = 2,024 / 500 = 4,05 \text{ л}$$

5. Розрахунок одноразового об'єму розчину підживлення

$$V_{ж} = V_{ж.сум.} / n = 4,05 / 4 = 1 \text{ л}$$

Отже, загальна кількість води на підживлення сахарозою, дріжджовим екстрактом, розчином солей становить - $V_{зпідм} (40,5 + 4,05 + 1,5) = 46,05 \text{ л}$.

Загальна кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде $V_{вф} = V_{пс} - G_{заг} - V_{фк} - V_{зпідм} = 101,2 - 3,846 - 8,55 - 46,05 = 42,75$.

Об'єм конденсату складає 8,55 , оскільки під час стерилізації підживлювального розчину буде утворюватися 4,45 л конденсату, а під час стерилізації поживного середовища він складе 4,1 л. Розчин солей буде стерилізуватися в автоклаві, тому конденсат не буде утворюватися. Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів поживного середовища приблизно дорівнює густині води, тобто 1 л = 1 кг.

42,75 л води необхідно розподілити між двома композиціями: термолабільними дріжджовим екстрактом та сахарозою (композиція А) та сіллю K_2HPO_4 (композиція Б). $C_{\Sigma} = 38$

Композиція А: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{Сахароза} - G_{1в} = G_{в} (C_1 / C_{\Sigma}) = 42,75 \cdot (30 / 38) = 33,75$$

$$\text{Дріжджовий екстракт} - G_{2в} = G_{в} (C_2 / C_{\Sigma}) = 42,75 \cdot (5 / 38) = 5,63$$

Отже, для приготування даної композиції використаємо 37,91 л води, стерилізація буде проходити в реакторі-змішувачі.

Композиція Б: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$K_2HPO_4 \quad G_{3B} = G_B(C_3/C_\Sigma) = 42,75 \cdot (3/38) = 3,37$$

Отже, для приготування даної композиції використаємо 3,25 л води, стерилізація буде проходити в ферментері.

Таблиця 6.1.

Композиції для стерилізації поживного середовища в ферментері

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 50,5 л середовища, кг (л)	Композиція	б'єм композиції, V, л
Сахароза	30	3,036	А	42,8
Дріжджовий екстракт	5	0,506		
Вода		39,38		
K_2HPO_4	3	0,304	Б	3,55
Вода		3,37		
Конденсат		4,1		4,1
Разом:		50,5		50,5

Підживлювальний розчин сахарози для дробного внесення в ферментері

Таблиця 6.2.

Компонент	Кількість у %	Кількість для дробного внесення кг(л)
Сахароза	40%	16,192
Конденсат	10%	4
Вода		24,3
Разом		44,5

**Підживлювальний розчин дріжджового екстракту для дробного
внесення в ферментері**

Таблиця 6.3

Компонент	Кількість у %	Кількість для дробного внесення кг(л)
Сахароза	50%	2,024
Конденсат	10%	0,4
Вода		2,03
Разом		4,45

**6.2.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для
вирощування в посівному апараті**

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{па}} = V_{\text{пмф}} / (1 - E_{\text{па}}) = 10,1 / (1 - 0,1) = 11,2 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті становить:

$$V_{\text{псп}} = V_{\text{па}} / (1 + X_{\text{па}}) = 11,2 / (1 + 0,1) = 10,2 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання посівного апарата:

$$V_{\text{пмп}} = V_{\text{па}} - V_{\text{псп}} = 11,2 - 10,2 = 1 \text{ л}$$

Згідно з прийнятим складом поживного середовища загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{псп}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{псп}} \cdot C_{\Sigma} = 10,2 \cdot 38 = 387,6 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г:}$$

Сахароза – $G_1 = G_{\text{заг}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 387,6 \cdot (30 / 38) = 306$

Дріжджовий екстракт – $G_2 = G_{\text{заг}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 387,6 \cdot (5 / 38) = 51$

K_2HPO_4^- – $G_3 = G_{\text{заг}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 387,6 \cdot (3 / 38) = 30,6$

Визначаємо кількість конденсату $V_{\text{інк}} = V_{\text{псп}} \cdot K_{\text{кон}} = 10,2 \cdot 0,1 = 1,02$

Кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде $V_{\text{вф}} = V_{\text{псп}} - G_{\text{заг}} - V_{\text{інк}} = 10,2 - 0,388 - 1,02 = 8,8$ л.

Дану кількість води необхідно розподілити між двома композиціями: термолабільним дріжджовим екстрактом та сахарозою (композиція А) та сіллю (композиція Б).

Композиція А: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

Сахароза – $G_{1в} = G_{в} (C_1/C_{\Sigma}) = 8,8 \cdot (30/38) = 6,95$

Дріжджовий екстракт – $G_{2в} = G_{в} (C_2/C_{\Sigma}) = 8,8 \cdot (5/38) = 1,15$

Отже, для приготування даної композиції використаємо 8,1 л води, стерилізація буде проходити в реакторі-змішувачі.

Композиція Б: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$K_2HPO_4^-$ – $G_{3в} = G_{в} (C_3/C_{\Sigma}) = 8,8 \cdot (3/38) = 0,7$

Отже, для приготування даної композиції використаємо 0,7 л води, стерилізація буде проходити в інокуляторі.

Таблиця 6.4.

Композиції для стерилізації поживного середовища в інокуляторі.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 10,2л середовища, кг(л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	30	0,306	А	8,46
Дріжджовий екстракт	5	0,05		
Вода		8,1		
K_2HPO_4	3	0,03	Б	0,73
Вода		0,7		
Конденсат		1,02		
Разом:		10,2		10,2

6.2.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування в колбах на качалках

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить: $V_{\text{псм}} = V_{\text{пма}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 1,01 / 0,99 = 1,02$ л.

Кількість поживного середовища в колбах становить:

$$V_{\text{пск}} = V_{\text{псм}} / (1 + X_{\text{кол}}) = 1,02 / (1 + 0,02) = 1 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання колб, л:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{псм}} - V_{\text{пск}} = 1,02 - 1 = 0,02 = 20 \text{ мл.}$$

Згідно з прийнятим складом поживного середовища загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{псп}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{пск}} \cdot C_{\Sigma} = 1 \cdot 38 = 38 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г:}$$

$$\text{Сахароза} - G_1 = G_{\text{заг}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 38 \cdot (30 / 38) = 30$$

$$\text{Дріжджовий екстракт} - G_2 = G_{\text{заг}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 38 \cdot (5 / 38) = 5$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 - G_3 = G_{\text{заг}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 38 \cdot (3 / 38) = 3$$

Враховуючи малу кількість компонентів їх стерилізація проводиться в колбах в автоклаві при цьому конденсат не утворюється. Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{пск}} - G_{\text{заг}} = 1000 - 38 = 962 \text{ мл}$$

Дану кількість води необхідно розподілити між двома композиціями: термолабільним дріжджовим екстрактом та сахарозою (композиція А) та сіллю (композиція Б).

Композиція А: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, мл:

$$\text{Сахароза} - G_{1\text{в}} = G_{\text{в}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 962 \cdot (30 / 38) = 759,5$$

$$\text{Дріжджовий екстракт} - G_{2\text{в}} = G_{\text{в}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 962 \cdot (5 / 38) = 126,5$$

Отже, для приготування даної композиції використаємо 886 мл води.

Композиція Б: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, мл:



$$G_{3B} = G_B(C_3/C_\Sigma) = 968 \cdot (3/38) = 76$$

Таблиця 6.5.

Композиції для стерилізації поживного середовища в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Сахароза	30	30	А	921
Дріжджовий екстракт	5	5		
Вода		886		
K_2HPO_4	3	3	Б	79
Вода		76		
Разом:		1000		1000

6.3 Розрахунок матеріального балансу

Таблиця 6.6.

Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, л	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, л
1	2	3	4	5
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ			
1.1.	Сахароза	0.03	Нестерильне ПС	1
1.2.	Дріжджовий екстракт	0.05		
1.3.	K_2HPO_4	0.003		
1.4.	Вода	0,962		
	Всього:	1	Всього:	1
2	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ			
2.1.	Нестерильне ПС	1	Стерильне ПС	1
	Всього:	1	Всього:	1
3	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ			
3.1.	Стерильне ПС	1	Посівний матеріал	1.02
3.2.	Посівний матеріал з колби	0.02		
	Всього:	1.02	Всього:	1.02
4	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ			
4.1.	Глюкоза	0.306	Нестерильне ПС	9.18
4.2.	Дріжджовий екстракт	0.05		
4.3.	K_2HPO_4	0.03		
4.4.	Вода	8.8		
	Всього:	9.18	Всього:	9.18
5	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ			
5.1.	Нестерильне ПС	9.18	Стерильне ПС	10.2

Продовження табл. 6.6

5.2.	Конденсат	1,02	(втрат немає)	0,0
	Всього:	10,2	Всього:	10,2
6	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ			
6.1.	Стерильне ПС	10,2	Посівний матеріал	10,1
6.2.	Посівний матеріал з колб на качалках	1		
6.3.	Втрати (частка)	0,1		1.1
	Всього:	11,2	Всього:	11,2
7	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА			
7.1.	Сахароза	3,036	Нестерильне ПС	46,4
7.2.	Дріжджовий екстракт	0.506		
7.3.	K_2HPO_4	0.304		
7.4.	Вода	42,75		42,75
	Всього:	46,4	Всього:	46,4
8	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА			
8.1	Нестерильне ПС	46,4	Стерильне ПС	50,5
8.2	Конденсат	4.1	(втрат немає)	0,0
	Всього:	50,5	Всього:	50,5
9	ПРИГОТУВАННЯ ПІДЖИВЛЮВАЛЬНОГО РОЗЧИНУ САХАРОЗИ ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА			
9.1	Сахароза	16,2	Нестерильний ПР	40,5
9.2	Вода	24,3		24,3
	Всього:	40,5	Всього:	40,5
10.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПІДЖИВЛЮВАЛЬНОГО РОЗЧИНУ САХАРОЗИ ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА			
10.1	Нестерильний ПР	40,5	Стерильний ПР	44,5
10.2	Конденсат	4	(втрат немає)	0,0
	Всього:	44,5	Всього:	44,5

Продовження табл. 6.6

11.	ПРИГОТУВАННЯ ПІДЖИВЛЮВАЛЬНОГО РОЗЧИНУ ДРІЖДЖОВОГО ЕКСТРАКТУ ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА			
1.1	Дріжджовий екстракт	2,02	Нестерильний ПР	4,05
11.2	Вода	2,03		2,03
	Всього:	4,05	Всього:	4,05
	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПІДЖИВЛЮВАЛЬНОГО РОЗЧИНУ ДРІЖДЖОВОГО ЕКСТРАКТУ ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА			
12.1	Нестерильний ПР	4,05	Стерильний ПР	4,45
12.2	Конденсат	0,4	(втрат немає)	
	Всього:	4,45	Всього:	4,45
13.	ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНУ СОЛЕЙ ДЛЯ ПІДЖИВЛЕННЯ В ФЕРМЕНТЕРІ			
13.1	K_2HPO_4	0,304	Нестерильний ПР	1,5
13.2	$CaCl_2$	0,035		
13.3	Вода	1,161		
	Всього:	1,5	Всього:	1,5
14.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ РОЗЧИНУ СОЛЕЙ ДЛЯ ПІДЖИВЛЕННЯ В ФЕРМЕНТЕРІ			
14.1	Нестерильний ПР	1,5	Стерильний ПР	1,5
14.2	Всього:	1,5	Всього:	1,5
15.	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ			
15.1.	Стерильне поживне середовище	101,2	Культуральна рідина на фільтрацію	100. 2
15.2.	Посівний матеріал з посівного апарата	10,1		
15.3.	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	11,1
	Всього:	111,3	Всього:	111,3

6.4. Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання

Уточнюючий розрахунок проводиться на основі продуктового розрахунку та матеріального балансу з метою уточнення коефіцієнтів заповнення обладнання.

6.4.1 Уточнюючий розрахунок кількості ферментерів

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $K_3 = 0,6$:

$$V_{\text{гф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{K_3} = \frac{111,3}{0,6} = 186$$

Вибираємо з таблиці (див. *Додаток 4*) найближчий за номінальним об'ємом ферментер: $V_{\text{нф}} = 250$ л.

Кількість виробничих ферментерів при заданому K_3 :

$$N_{\text{фр}} = \frac{V_{\text{гф}}}{V_{\text{нф}}} = \frac{186}{250} = 0,75 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів:

$$K_{3\text{ф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{V_{\text{нф}} \cdot N_{\text{фр}}} = \frac{111,3}{250 \cdot 1} = 0,5$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення входить до заданих меж ($K_3 = 0,5-0,6$), то приймаємо до установки ферментерів $N_{\text{фр}} + 1$ запасний.

6.4.2 Уточнюючий розрахунок кількості посівних апаратів

Приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата при заданому $K_3 = 0,60$:

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{K_3} = \frac{10,1}{0,60} = 16,8 \text{ л}$$

Вибираємо з таблиці (див. *Додаток 4*) найближчий за номінальним об'ємом посівний апарат: $V_{\text{нпа}} = 20$ л.

Кількість посівних апаратів при заданому K_3 :

$$N_{\text{пар}} = \frac{V_{\text{гпа}}}{V_{\text{нпа}}} = \frac{16,8}{20} = 0,84$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці посівних апаратів:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{нпа}} \cdot N_{\text{пар}}} = \frac{10,1}{20 \cdot 1} = 0,505$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5 – 0,65), то приймаємо до установки посівних апаратів $N_{\text{пар}} + 1$ запасний.

6.4.3 Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб

Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому $K_{\text{колб}} = 0,2$:

$$V_{\text{гколб}} = \frac{V_{\text{колб}}}{K_{\text{колб}}} = \frac{1,01}{0,2} = 5,05 \text{ л}$$

Об'єм 1 качалочної колби $V_{\text{нколб}} = 0,750$ л.

Кількість качалочних колб при заданому $K_{\text{колб}} = 0,2$:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{гколб}}}{V_{\text{нколб}}} = \frac{5,05}{0,75} = 7$$

6.5. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування та стерилізації поживного середовища

6.5.1 Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 250 л

Приготування композиції А об'ємом 42,88 л буде відбуватися в реакторі змішувачі, приблизний геометричний об'єм якого при заданому $K_{\text{зб}} = 0,7$:

$$V_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{А}}}{K_{\text{зб}}} = \frac{42,88}{0,7} = 61 \text{ л}$$

Замовляємо у виробника реактор об'ємом: $V_{\text{нр}} = 60$ л. Кількість реакторів при заданому $K_{\text{зб}}$ становить:

$$N_{\text{ср}} = \frac{V_{\text{Ар}}}{V_{\text{нр}}} = \frac{61}{60} = 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зб} = \frac{V_{Ag}}{V_{нр} \cdot N_{ср}} = \frac{42,88}{60 \cdot 1} = 0,7$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування середовища $N_{ср} = 1, + 1$ запасний.

6.5.2 Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для посівного апарату об'ємом 20 л

Приготування композиції А об'ємом 8,46 л буде відбуватися в реакторі змішувачі, приблизний геометричний об'єм якого при заданому $K_{зб} = 0,7$:

$$V_{Ag} = \frac{V_A}{K_{зб}} = \frac{8,46}{0,7} = 12 \text{ л}$$

Замовляємо у виробника реактор об'ємом: $V_{нр} = 12$ л. Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить:

$$N_{ср} = \frac{V_{Ag}}{V_{нр}} = \frac{12}{12} = 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зб} = \frac{V_{Ag}}{V_{нр} \cdot N_{ср}} = \frac{8,46}{12 \cdot 1} = 0,705$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування середовища $N_{ср} = 1, + 1$ запасний.

6.5.3 Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування підживлювального розчину для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 250 л

Приготування підживлювального розчину сахарози і дріжджового екстракту об'ємом 44,55 л буде відбуватися в реакторі змішувачі, приблизний геометричний об'єм якого при заданому $K_{зб} = 0,7$:

$$V_{Ag} = \frac{V_A}{K_{зб}} = \frac{44,55}{0,7} = 63,6 \text{ л}$$

Замовляємо у виробника реактор об'ємом: $V_{нр} = 60$ л. Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить:

$$N_{\text{ср}} = \frac{V_{\text{Аг}}}{V_{\text{нр}}} = \frac{63,6}{60} = 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{\text{зб}} = \frac{V_{\text{Аг}}}{V_{\text{нр}} \cdot N_{\text{ср}}} = \frac{44,55}{60 \cdot 1} = 0,74$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування середовища $N_{\text{ср}} = 1$, + 1 запасний.

РОЗДІЛ 7 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 7.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2		4
3-1 3-3	Збірник для приготування миючого розчину	2	Реактор-змішувач оснащений перемішувачим пристроєм(роторна мішалка), та теплоізоляційною рубашкою. нержавіюча сталь(AISI 316L). Загальний об'єм 500 л, швидкість перемішування 100 об/хв [1]
Н-2 Н-5 Н-27 Н-30 Н-32 Н-36	Насоси	7	Відцентровий насос фірми DAB EURO продуктивністю від 25 до 80 л/хв матеріал корпусу і робочого колеса нержавіюча сталь: AISI 304, AISI 316 [2]
ПЗ-6	Повітрязбірник	1	Обладнаний металевією сіткою для видалення механічних забруднень.
Ф-7	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтруючий матеріал – поліестер, швидкість фільтрування – 0,45 м/с, E=90% [3]
К-8	Компресор	1	Компресор фірми «Airpol K7» (Польща), потужність 16 л/с, робочий тиск 1 МПа [4]
Т-9	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник охолоджувач Friulair AFR 11 (Італія) продуктивністю 66 м3/год [5]
Р-10	Ресивер	1	Ресивер серії Р270.600 фірми «ЭНТЕХ» (Україна), об'єм 50 л, робочий тиск – 1 МПа [6]
Т-11	Теплообмінник нагрівач	1	Теплообмінник Titan WHR 300x150-2 фірми ЛИССАНТ (Росія), він складається з алюмінієвих пластин, до яких приєднуються мідні трубки діаметром 9,52 мм [7].

				НУХТ БТЕК 04.01.14. КР ПЗ					
		№	Підпис	СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ		Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.	Щербина І.С.							78	4
Консультант						Кафедра БТМ			
Керівник	Стабніков В.П.								
Зав.кафедри	Пирог Т.П.								

Продовження Таблиці 7.1

Ф-12	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр ФВК клас F9, компанія Вэнт-электро (Росія), фільтруючий матеріал Nanomeltblown (поліпропіленові волокна), E = 95 % [8]
P-13	Реактор-змішувач для композиції А	1	Реактор об'ємом 12 л, з сорочкою, з перемішуючим пристроєм(4 лопатева мішалка), нержавіюча сталь(AISI 316L), швидкість перемішування 100 об/хв, внутрішній діаметр 260мм. [9]
Ф-14 Ф-17 Ф-22 Ф-24 Ф-26	Фільтри індивідуальної очистки	5	Фільтр РФМ-3,0, компанія ГеоСорб (Росія), фільтруючий матеріал – сополімер стирола , E = 99,99% [10]
Д -4 Д -15 Д-18 Д-20 Д- 29	Дозатори	5	Дозатор виробництва НВП "Техноаги" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1%.[11]
P-16	Реактор-змішувач для композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 60 л, обладнаний теплообмінною рубашкою , 4-х лопатевою пропелерною мішалкою, штуцером для подачі теплоносія DN25, матеріал робочої зони сталь AISI 316L , швидкість перемішування 300 об/хв, габаритні розміри 781*570*1400 [12]
P-19	Реактор-змішувач для композиції Б	1	Реактор об'ємом 12 л, з сорочкою, з перемішуючим пристроєм(4 лопатева мішалка), нержавіюча сталь(AISI 316L), швидкість перемішування 100 об/хв, внутрішній діаметр 200мм. [9]
P-21	Реактор-змішувач для підживлювального розчину	1	Реактор-змішувач об'ємом 60 л, обладнаний теплообмінною рубашкою , 4-х лопатевою пропелерною мішалкою, штуцером для подачі теплоносія DN25, матеріал робочої зони сталь AISI 316L , швидкість перемішування 300 об/хв, габаритні розміри 781*570*1400 [12]

I-23	Інокулятор	1	Ферментер барботажний об'ємом 20л , оснащений 6-ти лопатевою дисковою мішалкою, матеріал робочої зони сталь AISI 316L , для завантаження клапан DN 40, для вивантаження DN 25 санітарного типу, швидкість перемішування 180 об/хв, внутр. діаметр 250 мм. Додатково обладнаний: пробовідбірником, температурним датчиком, запобіжним клапаном. вбудованим модулем дозування газів[13]
ФР-25	Виробничий ферментер	1	Ферментер барботажний об'ємом 250 л, оснащений 6-ти лопатевою дисковою мішалкою, матеріал робочої зони сталь AISI 316L, на кришці ферментера встановлений клапан DN 40 для завантаження, вивантаження здійснюється через клапан DN 25 санітарного типу з патрубком зливу з клапана, швидкість перемішування 180 об/хв, внутр. діаметр 700 мм. Додатково обладнаний: оглядовим вікном, клапанами DN 25 та DN 32, температурним датчиком, пробовідбірником ``Коефіт``DN 5, запобіжним клапаном, вбудованим модулем дозування газів [14 ЦЕРБ 4.1]
Д - 35 Д - 40	Дозатор об'ємний	2	Дозатор виробництва "ІнтерАгро" призначений для дозування рідин заданими дозами. Точність дозування становить 0,1%[16]
3-28 3-31 3-34 3-39	Збірник	4	Збірники з нержавіючої сталі, з сорочкою та з перемішувачем, з вбудованою системою корегування температури фірми NORMIT[16]
Ц-37 Ц-42	Центрифуга	2	Сепаруюча центрифуга UNRF360, потужність мотора 7,5 кВт, габарити: 1500 x 1150 x 1500 мм[17]
Ц-33	Центрифуга	1	Фільтруюча центрифуга Biotechno SEPA TZ-5. 10000 об/хв, мах навантаження 50 кг, d барабана 600мм, висота 350мм[22].
УФ-38	Ультрафільтрація	1	Установка ультрафільтраційної очистки фірми Biotechno серії УФ-201 продуктивністю 37л/хв, матеріал нержавіюча сталь AISI 316, забезпечена ємністю 120 л, габарити 749.3×548.6×1300 мм [18]
ВВУ-43	Вакуум-випарна установка	1	Вакуум-випарна сушарка фірми Uoslab, серії СВ-80, оснащена 4 полицями з допустимим навантаженням по 14 кг на кожну, матеріал камери нержавіюча сталь AISI 304, макс. темп. роботи 200°C, Габарити: 620×720×797[19]

Д-44	Дробарка	1	Дробарка шокова приймає сировину розміром не більше 50 мм, продуктивність 200кг/год, потужність 1,1 кВт, габаритні розміри 640х340х600, маса апарату 160 кг, матеріал апарату сталь ЧХ16М2/110Г13Л [20].
ФМ-45	Фасувальна машина	1	Машина автоматичної фасовки в тришарові металізовані пакети 1кг ЛИНЕПАК Ф з системою автоматичної запайки, мах продуктивність 60 упак/хв, габарити: 3700×1000×1750 мм [21].

Примітка: підбір обладнання відбувався за допомогою таких електронних ресурсів:

1. <https://promvit.com.ua/emkost-dlya-moyushhix-rastvorov-obemom-500-l/>
2. http://www.pomp.com.ua/category_44.html
3. <https://air-filter.com.ua/filters/primary/pocket/tf25>
4. <http://www.airpol.com.pl/kategoria/3-kw-22-kw-wykonanie-standardowe/91>
5. https://www.agrcomp.ru/item/ohladitely_vozduha_friulair
6. <https://prom.ua/ua/p523000363-vozduhosbornik-resiver-dlya;all.html>
7. <https://www.climatik.su/ventiljacija/teploobmenniki/teploobmennik-titan-whr-300x150-2-dlya-pryamougolnykh-kanalov-vodyanoi.html>
8. <http://www.ventelectro.ru/ventilyaciya/fil-try/fil-try-tonkoj-ochistki/fil-tr-vozdushnyj-karmannyj-fvk-fyak-klass-f5-f9-material-iz-nan/>
9. <https://stprom.com.ua/p15745045-emkosti-nerzhaveyuschej-stali.html>
10. <https://www.mtkisorbent.ru/filtruyushchij-material-fpp-15-1-5-tkan-petryanova>
11. <http://technowagy.com.ua/product/dozatory-mnogokomponentnye/>
12. <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-zhidkosti-rs-50-ispolnenie-ex/>
13. http://www.sartogsm.ru/biostat_d50_d100.html
14. <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-prigotovleniya-rastvorov-s-donnoj-rotornoj-meshalkoj-i-parovoj-rubashkoj/>
15. http://www.iagro.com.ua/equipment/batcher_batch/weighers_for_bulk_products.php
16. https://normit.ru/product/otrasli/farmatsevticheskaya-produktsiya/item/okhladitel?category_id=187
17. <http://somy322.dgycgt.com/sell/itemid-300.shtml#message>
18. <https://biotechno.ru/chem/vydelenie-i-ochistka-produkta1/pilotnaya-sistema-dlya-mikro-i-ultrafiltratsii-uf-201/>
19. <https://ru.uoslab.com/sushilnoe-oborudovanie/vakuumnye-shkafy/vakuumnyj-sushilnyj-shkaf-sv-80>
20. <http://www.taurasfenix.com/manufacture/by-type-auto/gorizontalnye-upakovochnye-avtomaty/linepak-f/>
21. <https://biotechno.ru/catalog/filtruyushchie-tsentrifugi/pilotnye-filtruyushchie-tsentrifugi-сера-tzz/>

РОЗДІЛ 8

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу левану включає в себе допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, приготування розчинів реагентів для стадії виділення, підготовка і стерилізація поживних середовищ, приготування та стерилізація підживлювального розчину) , технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез левану за допомогою *Raenibacillus polytuxa EJS - 3*), та процес виділення та очищення левану.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка мийних та дезінфікуючих засобів

ДР 1.1.1. Приготування робочого розчину «Септоклін А11» для миття обладнання.

Для здійснення миття ємнісної апаратури, інокуляторів, посівного апарату та ферментера за допомогою сіп-мийки необхідно 400 л 1%-го «Септоклін А11».

Для його приготування у реактор змішувач (З-3), об'ємом 450 л, обладнаного перемішуючим пристроєм , через об'ємно-ваговий дозатор (Д-4) вносять 4 кг порошку «Септоклін А11» та додають 396 л питної води за допомогою об'ємно - вагового дозатора (Д-4) . Для повного розчинення воду підігрівають за допомогою електричного тону і вмикають перемішуючий пристрій, після чого за допомогою насосу (Н-5) мийний розчин перекачується для миття.

ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину «Дезактину» для щоденного прибирання

Для приготування 0,1% розчину «Дезактину» у відро, об'ємом 12 л додають 1 мл концентрату дезінфікуючого розчину та 10 л водопровідної води. Зміна відра відбувається через кожні 30 м² приміщення.

					НУХТ БТЕК 04.01.14. КР ПЗ		
		№	Підпис				
Розроб.	Щербина І.С.			ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						82	12
Керівник	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						

ДР 1.1.3. Приготування робочого розчину «Дезактину» для генерального прибирання

Для приготування 1 % розчину «Дезактину» у відро, об'ємом 12 л додають 10 мл концентрату дезінфікуючого розчину та 10 л водопровідної води. Зміна відра відбувається через кожні 30 м² приміщення.

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

На підприємстві з метою дотримання чистоти проводять щоденне та генеральне прибирання (1 раз на місяць) приміщень.

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень

Для щоденного прибирання виробничих приміщень підприємства використовують воду та миючі засоби. При проведенні вологого прибирання виробничих приміщень користуються 0,1%-им розчином «Дезактину» (від ДР 1.1.2).

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання приміщень

При генеральному прибиранні виробничого приміщення застосовується 1 %-й розчин «Дезактину» (від ДР 1.1.3). Прибирання проводиться один раз на місяць. Миють двері, вікна, підлогу, контейнери для відходів, обробляють поверхні лабораторних приміщень: столи, підлогу, стіни і т.д.

ДР 1.3. Підготовка технічного обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття обладнання

Спочатку обладнання ополіскують водопровідною водою, після чого здійснюють миття за допомогою СІП-мийки протягом 10 хв при 30 °С для видалення всіх органічних та неорганічних залишків (від ДР 1.1.1.).

ДР 1.3.2. Ополіскування обладнання

Ополіскування здійснюють водою, протягом 30 хвилин, для виключення можливості нанесення шкоди здоров'ю персоналу розчином лугу.

ДР 1.3.3. Технічний огляд

Перед процесом стерилізації проводять технологічний огляд обладнання на наявність пошкоджень, вм'ятин, впадин, в яких можуть залишатись залишки можливого забруднення, що може призвести до перехресної контамінації. Всі знайдені несправності усувають.

ДР 1.3.4. Перевірка на герметичність

Після проведення миття, ополіскування та ремонтних робіт перевіряють обладнання на герметичність, для цього в апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (дифторхлорметан). Далі закривають усю запірну арматуру ємнісного обладнання і подають аераційне повітря до рівня надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Потім перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Після закінчення часу витримки звіряють покази манометра, якщо різниця менше 0,01 МПа, то апарат вважають герметичним. При більшому відхиленні за допомогою галогенного течієпошукача починають пошук неущільнень шляхом перевірки усіх місць з'єднань. При наближенні щупа течієпошукача до місця нещільності фіксуються пари галогенвмісної речовини, що засвідчує наявність нещільності. При знаходженні усіх таких місць їх усувають шляхом підтягування різьбових з'єднань або замінюють прокладки. Потім апарат знову перевіряють на герметичність.

ДР 1.3.5. Стерилізація обладнання

Для проведення стерилізації в сорочку апарата подають глуху пару і нагрівають його до 80–90 °С. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, при цьому обов'язково відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні температури стерилізації (130–135 °С) всю запірну арматуру, крім парової, закривають і витримують протягом 1 години. Після завершення витримки парову арматуру закривають, подають в апарат стерильне повітря, а в сорочку холодну воду. 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

При визначенні місця забору атмосферного повітря необхідно враховувати існуючі та можливі джерела газоподібних забруднень (димарі, автотранспорт, газоподібні промислові викиди та інші фактори).

Враховуючи висоту будівлі підприємства (близько 12 м), забір атмосферного повітря відбуватиметься на висоті близько 2–4 м над будівлею, тобто 15 м. Забір здійснюється повітрязбірником (ПЗ – 6).

ДР 2.2. Грубе очищення повітря від пилу та часточок

На цій стадії з повітря видаляється основна маса великих механічних часточок та пилу. Для цього використовують фільтри грубої очистки (Ф-7). Ступінь очищення 90 %.

ДР 2.3. Стиснення повітря

За допомогою турбокомпресора (К-8) повітря стискають до 0,35–0,5 МПа, при цьому повітря нагрівається до 120–250 °С.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Щоб запобігти випаданню вологи в крапле-вловлювачі, повітря «переохолоджують» до 25°С в теплообміннику (Т-8). Далі у ресивері (Р-10) відбувається стабілізація вологості повітря $W = 60$ %.

ДР 2.5. Стабілізація термодинамічних показників

Надалі, повітря підігрівають у теплообміннику (Т-11) для забезпечення надійної роботи фільтрів до температури 45-50°С. При таких температурах не відбувається конденсація пари на волокнах фільтра.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Подальше очищення повітря відбувається у фільтрі (Ф-12), як фільтрувальний матеріал використовують поліпропіленові волокна. Ступінь очистки такого повітря становить $E = 95$ %.

ДР 2.7. Очистка повітря в індивідуальному фільтрі

Кінцева стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальних фільтрах (Ф-14),(Ф-17). Як фільтрувальний матеріал використовують сополімер стирила. Ступінь очищення становить $E=99,999$

%. Далі стерильне аераційне повітря надходить на інші стадії виробничого процесу.

ДР 3. Приготування та стерилізація допоміжних розчинів

ДР 3.1 Приготування розчинів реагентів для стадії виділення

ДР 3.1.1. Приготування 10 л 0,5М розчину гідроксиду натрію

Для приготування 10 л 0,5М розчину лугу в збірнику (З-28) на ваговому дозаторі (Д-29) зважують 200 г гідроксиду натрію, відміряють 9,8 л питної води. Проводять перемішування протягом 10 хв до повного розчинення лугу. Розчин передають за допомогою насоса (Н-30) до збірника (З-34) через об'ємний дозатор (Д-35).

ДР 3.1.2 Приготування 96% етилового спирту.

Етиловий спирт надходить з складу у вже необхідній концентрації (96%) після чого 300 л спирту поміщається в збірник (З-31) для подальшого використання під час руйнування клітинної стінки та під час осадження левану. Розчин передають за допомогою насоса (Н-32) до збірника (З-39) через об'ємний дозатор (Д-40).

ДР 4. Приготування піждивлювального розчину

Також готують піждивлючий розчин для виробничого культивування *Raenibacillus polytuxa EJS* - з наступного складу:

Таблиця 8.1

Компо ненти поживного середовища	Концент рація, г/л	Вміст компонентів у 46 л, кг	Компо зиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	160	16,2	А	46

ДР 4.1 Приготування і стерилізація композиції А.

Через ваговий дозатор (Д-20) в збірник (Р-21) об'ємом 60 л вносять: 16,2 кг сахарози. В збірник додають 46 л питної води для кращого перемішування вмикають мішалку з частотою обертів 50 – 100 об/хв. Та в

сорочку збірника подають гостру пару для нагрівання суміші. Стерилізація проходить у збірнику при 112°C за тиску 0,05 МПа протягом 30 хв.

ДР 5. Приготування і стерилізація поживного середовища.

ДР 5.1 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах.

На цьому етапі необхідно приготувати 1 л поживного середовища, вміст компонентів для приготування наведений в табл 8.2

Таблиця 8.2

Вміст компонентів середовища, які необхідні для приготування 1 л поживного середовища.

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 1 л, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Сахароза	30	30	А	900
Дріжджовий екстракт	5	5		
K ₂ HPO ₄	3	3	Б	100

ДР 5.1.1 Приготування і стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують: 30 г сахарози та 5 г дріжджового екстракту після цього наважки переносять в колбу об'ємом 2 л. В колбу додають 900 мл дистильованої води і перемішують до розчинення. Потім колбу закривають ватно-марлевою пробкою і композицію стерилізують в автоклаві при 112°C за тиску 0,05 МПа протягом 30 хв.

ДР 5.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б.

Для приготування цієї композиції на технічних вагах зважують 3 г K₂HPO₄ і поміщають в колбу об'ємом 200 мл. Потім вносять 100 мл

дистильованої води. Перемішують до розчинення солі, після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 131°C, тиску 0,15 МПа протягом 30 хв.

ДР 5.2 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л.

На цьому етапі необхідно приготувати 10,2 л поживного середовища для вирощування інокуляту. Оскільки об'єм середовища на даному етапі складає 10,2 л, необхідно враховувати, що 10% припадає на посівний матеріал, тобто 1,02 л і ще 10% припадає на конденсат, який буде утворений під час стерилізації.

Таблиця 8.3

Вміст компонентів середовища, які необхідні для приготування 10,2 поживного середовища.

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 10,2 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	30	306	А	8,5
Дріжджовий екстракт	5	50		
K ₂ HPO ₄	3	30	Б	0,7

ДР 5.2.1 Приготування і стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують: 306 г сахарози та 50 г дріжджового екстракту після цього наважки переносять в збірник (Р-13) об'ємом 12 л. В збірник додають 8,1 л питної води для кращого перемішування вмикають мішалку з частотою обертів 50 – 100 об/хв. Після розчинення компонентів композиції, їх стерилізують у збірнику при 112°C за тиску 0,05 МПа протягом 30 хв. Після стерилізації композицію переносять в посівний апарат.

ДР 5.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б.

Для приготування цієї композиції на технічних вагах зважують 30 г K₂HPO₄. Після цього сіль поміщають в колбу об'ємом 2л , додаємо 0,7 л

води. Композицію стерилізують в автоклаві при 131°C, тиску 0,15 МПа протягом 30 хв. Після чого композиція буде перенесена в посівний апарат.

ДР 5.3 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 250 л.

На цьому етапі необхідно приготувати 101,2 л поживного середовища для вирощування інокуляту. Оскільки об'єм середовища на даному етапі складає 101,2 л, необхідно враховувати, що 10% припадає на посівний матеріал, тобто 10,1 л і ще 10% припадає на конденсат, який буде утворений під час стерилізації, об'єм якого складає 10,12 л. Також необхідно враховувати об'єм підживлювального розчину. Вміст компонентів середовища для приготування 101,2 л поживного середовища наведено в табл. 8.3

ДР 5.3.1 Приготування і стерилізація композиції А.

Через об'ємно - ваговий дозатор (Д-15) в збірник (Р-16) об'ємом 60 л вносять: 3036 г сахарози та 506 г дріжджового екстракту. В збірник додають 39,3 л питної води за допомогою об'ємно – вагового дозатора (Д-15) , для кращого перемішування вмикають мішалку з частотою обертів 50 – 100 об/хв. Після розчинення компонентів композиції, їх стерилізують у збірнику при 112°C за тиску 0,05 МПа протягом 30 хв. Після стерилізації композицію переносять в ферментер об'ємом 250 л.

Таблиця 8.4

Вміст компонентів середовища, які необхідні для приготування 101,2 л поживного середовища.

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 101,2 л, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	30	3,036	А	42,8
Дріжджовий екстракт	25	2,530		
K ₂ HPO ₄	5	0,506	Б	3,5

ДР 5.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б.

Через об'ємно - ваговий дозатор (Д-18) в збірник (Р-19) вносять 304 г K_2HPO_4 , додаємо 3,2 л води за допомогою об'ємно – вагового дозатора (Д-18), вмикаємо мішалку на 50 – 100 об/хв. Після чого композиція подається в ферментер. Композицію стерилізують при 131°C, тиску 0,15 МПа протягом 30 хв.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури.

Колекційна культура *Raenibacillus polytuxa EJS-3* зберігається в пробірках з картопляним декстрозним агаром (PDA). [11] Згідно цього для збереження колекційної культури її пересівають кожні 2-3 місяці.

ТП 6.2. Одержання робочої культури.

Колекційну культуру зі скошеного декстрозного агару (PDA) за допомогою мікробіологічної петлі розсіюють на чашки Петрі з PDA. Вирощують даний штам протягом 1 доби за температури 28°C до утворення ізольованих колоній. Після цього ізольовані колонії за допомогою мікробіологічної петлі переносять в пробірки з скошеним PDA. Лише одна колонія буде використовуватись для засіву однієї пробірки. Тривалість вирощування на даному етапі складає 1 добу.

ТП 6.3 Вирощування культури в колбах

В колбу з композицією А (від ДР 5.1.1) вносять композицію Б (від ДР 5.1.2). Далі поживне середовище розливають в 10 качалочних колб об'ємом по 139 мл в качалочні, колби об'ємом 750 мл. Після в пробірку з робочою культурою *Raenibacillus polytuxa EJS-3*, яка вирощена на скошеному PDA, вносять 5 мл стерильної водопровідної води, суспендують клітини після чого стерильною піпеткою відбирають одержану суспензію і вносять в колбу з поживним середовищем (1 пробірка з робочою культурою на одну качалочну колбу). Всі проведені операції будуть проведені в асептичних умовах.

Вирощують *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 в колбах на качалках при 180 об/хв за температури 28°C протягом 18 годин. Після закінчення культивування обов'язково проводять мікробіологічний контроль та визначають концентрацію біомаси. Після закінчення проведення мікробіологічного контролю посівний матеріал переміщують в стерильну засівну колбу.

ТП 6.4 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 20 л.

У попередньо простерилізований інокулятор (I-23), через засівну колбу вносять композицію А (від ДР 5.2.1), композиції Б (від ДР 5.2.2), вмикають перемішуючий пристрій і перемішують упродовж 5 хв. Після перемішування через засівну колбу вносять 1,42 л інокуляту (від ТП 6.3).

Вирощування культури на даному етапі проходить за температури 24 °С протягом 18 год. Для мікробіологічного контролю з інокулятора кожні 3 години відбирають пробу культуральної рідини.

ТП 7 Виробничий біосинтез

ТП 7.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 250 л

В посівний апарат спочатку вносять композицію А (від ДР 5.3.1), після чого в асептичних умовах вносять композицію Б (від ДР 5.3.2). Системою трубопроводів з дотриманням умов асептики подають посівний матеріал об'ємом 14,1 з інокулятора (I-23) (від ТП 6.4) у ферментер (ФР- 25) за допомогою труби перетискання.

У апарат подають повітря під надлишковим тиском 0,02 – 0,03 МПа, після чого перекривають доступ повітря, оскільки *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 є факультативним анаеробом. Температуру регулюють подачею в рубашку апарату холодної води або насиченої пари, рН регулюють подачею стерильного 2 М NaOH.

Після цього проходить культивування протягом 60 год за температури 24 °С. На 24 год культивування починають вносити підживлювальний розчин (від ДР 4). Підживлення здійснюють через кожні 8 годин до 48 години культивування включно. Кожні 5 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю. Культивування буде проводитися до накопичення необхідної кількості цільового продукту (35,45 г/л).

ТП 8 Відділення біомаси

ТП 8.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина з ферментаційного процесу насосом (Н-27) подається у сепаруючу центрифугу (Ц-33), де відбувається центрифугування при 10000 об/хв, тривалість обробки кожної партії культуральної рідини становить 15 хв. Потім цикл повторюється.

ТП 9 Виділення екзополісахариду

ТП 9.1. Розчинення клітинних капсул

Відділена біомаса передається від центрифуги (Ц-33) через трубу перетискування подається у збірник (З-34), сюди ж насосом (Н-30) зі збірника (З-28) за допомогою об'ємного дозатора (Д-35) подається 0,5М розчину луку в необхідній пропорції. Вмикаємо мішалку і перемішуємо протягом 15 хвилин після чого залишаємо на годину.

ТП 9.2. Центрифугування

Після розчинення капсул вміст збірника (З-34) подається насосом (Н-36) на центрифугу (Ц-37) для відділення спиртового розчину екзополісахариду від залишків клітин. Центрифугування проводять при 5000 об/хв протягом 15 хв.

ТП 9.3. Ультрафільтрація.

Зі центрифуги (Ц-37) вміст подається на ультрафільтраційну установку(УФ-38) де полісахарид відділяється від спиртового розчину через пори діаметром 50 нм до повного розділення суміші.

ТП 9.4. Осадження полісахариду

З ультрафільтраційної установки (УФ-38) розчин передається до збірника (З-39) куди зі збірника (З-31) за допомогою насосу (Н-32) через об'ємний дозатор (Д-38) подається 96% етиловий спирт в необхідній пропорції. Вміст збірника (З-39) перемішують протягом 15 хвилин після чого залишають на годину.

ТП 9.5 Центрифугування

Після осадження вміст збірника (З-39) подається насосом (Н-41) на центрифугу (Ц-42) для відділення спиртового розчину від екзополісахариду . Центрифугування проводять при 5000 об/хв протягом 15 хв.

ТП 9.6. Сушіння полісахариду.

Після центрифугування полісахарид передають до вакуум-випарної установки (ВВУ-43), де проходить сушіння за допомогою тепла, яке проходить через полиці сушарки при температурі 105°C протягом 12 годин.

ТП 9.7. Подрібнення

Після сушіння сировину з вакуум випарної установки (ВВУ-43) поміщають у шокову дробарку ЩД 6М (Д-44) та подрібнюють матеріал з розміром щілини 2 мм після чого готовий подрібнений екзополісахарид передають на пакування та маркування до фасувальної машини (ФМ-45).

ПМВ 10. Пакування, маркування, відвантаження левану

ПМВ 10.1. Пакування та маркування

Після дроблення та просіювання (Д-44) леван передається на фасувальну машину (ФМ-45) де проходить фасування полісахариду у тришарові металізовані пакети по 1 кг та їх автоматичне запаювання і маркування.

ПМВ 10.2. Відвантаження

Запакований та промаркований полісахарид вручну поміщають в коробки та відвантажують відвантажують на склад.

ЗВ 11 Знищення відходів

ЗВ 11.1 Знешкодження рідких відходів

Стічні води біотехнологічних виробництв можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини. На виході з цеху стічні води стерилізують і нейтралізують. Надалі їх спрямовують на очисні споруди.

Спочатку проводять механічне очищення: проціджування крізь сітки, фільтрування, відстоювання, оброблення в гідроциклах, флотацію. Ступінь очищення досягає 50-70%.

Кінцевою стадією очищення може бути хімічна обробка води: оброблення вапном, хлорування, озонування. Ступінь очищення досягає 80-90%.

Замість хімічного оброблення може бути запропоновано фізико-хімічне очищення з використанням адсорбентів (вугілля, шлаки, тирси). Ступінь очищення досягає 92-95%.

ЗВ 11.2 Знешкодження твердих відходів

Для знешкодження та утилізації твердих відходів використовують термічні методи їх обробки на сміттєспалювальних заводах та полігонах. Незалежно від конструкції застосованих печей спалювання вони повинні забезпечувати:

1. хороше перемішування відходів в процесі горіння для забезпечення більш повного їх згорання;
2. збереження і підтримка достатньо високих температур, що забезпечить повне знешкодження токсичних компонентів.

Спалювання помірно та мало небезпечних відходів можна здійснювати в печах різної конструкції (камерні, барабанні, із зваженим шаром та інші), але в кожній із них повинні існувати різні температурні зони.

ЗВ 11.3. Знешкодження газоподібних відходів

Очищення викидів з ферментерів здійснюють у фільтрах з попереднім охолодження газів, зниженням вологості вологовідбійниках з подальшим нагрівання, щоб уникнути попадання крапельної вологи і змочування фільтрів.

Під час очищення повітря, що входить в вентиляційну систему, використовують різноманітні фільтри з волокнистих матеріалів.

РОЗДІЛ 9

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Основні точки контролю доферментаційної підготовки виробництва, процесу біосинтезу левану та процесу виділення наведено у табл. 9.1.

9.1. Карта постадійного контролю

Таблиця 9.1

Карта постадійного контролю виробництва левану *Paenibacillus*
polytuxa EJS – 3

					НУХТ БТЕК 04.01.14. КР ПЗ		
		№	Підпис				
Розроб.	Щербина І.С.			КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						95	11
Керівник	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх, 1.1.1. Приготування робочого розчину Септоклін А11 для миття обладнання	Концентрація робочого розчину Септоклін А11	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 1 \%$
Кх, 1.1.2. Приготування робочого розчину Дезактину для щоденного прибирання	Концентрація робочого розчину Дезактину	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 0,1 \%$
Кх, 1.1.3. Приготування робочого розчину Дезактину для генерального прибирання	Концентрація робочого розчину Дезактину	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 1 \%$
Кх 1.2.1. Щоденне прибирання	Підлога	Візуальний огляд,	Під час прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Км 1.2.2. Генеральне прибирання	Підлога, стіни, двері та вікна	Візуальний огляд	Під час прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кт 1.3.1. Миття обладнання	Мийний розчин, обладнання, температура робочого розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд після миття	$t = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 60 \text{ хв}$, чисте обладнання

Продовження табл.9.1

1	2	3	4	5
Кт 1.3.2. Ополіскування обладнання	Вода, обладнання, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд після ополіскування	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $\tau = 60$ хв, чисте обладнання
Кт 1.3.3. Технічний огляд	Технічний стан обладнання	Візуальний огляд	Перед процесом стерилізації	Справне обладнання
Кт 1.3.4. Перевірка обладнання на герметичність	Герметичність роботи обладнання, температура, тиск, час, перепад тиску	Манометр технічний, термометр, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність, перепад тиску визначають після проведення операції	$P = 0,07$ МПа, $\tau = 20\text{--}30$ хв, $\Delta P < 0,01$ Мпа
Кт 1.3.5. Стерилізація обладнання	Обладнання, час стерилізації, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	$\tau = 1$ год, $P = 0,15$ МПа
Кт 2.1. Забір атмосферного повітря	Висота забору повітря	Альтиметр	При проектуванні приміщень	$h = 20$ м
Кт 2.2. Грубе очищення повітря від пилу та часток	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 90$ %, тиск згідно паспорту
Кт 2.3. Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	$P = 0,35\text{--}0,5$ МПа, $t = 120\text{--}150^{\circ}\text{C}$
Кт 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи	Охолоджене повітря, після видалення зайвої вологи температура	Термометр технічний, психометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	$t = 25^{\circ}\text{C}$, $W = 60$ %
Кт2.5. Стабілізація термодинамічних показників	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 45\text{--}50^{\circ}\text{C}$
Кт 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Повітря на виході з головного фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	$E = 95$ %, тиск згідно паспорту

1	2	3	4	5
Кт 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Повітря на виході з індивідуального фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря у індивідуальному фільтрі	E = 99,99 %, тиск згідно паспорту
Кх, К _т 3.1.1 Приготування розчину NaOH	Концентрація, показники дозаторів	Дозатори	До початку процесу	V=10л C=0,5 М
Кх, К _т 3.1.2 Приготування розчину етилового спирту	Концентрація, показники дозаторів	Дозатори	До початку процесу	V=300л C=96%
Кх, К _т , К _м 4 Приготування і стерилізація композиції А підживлювального розчину	Композиція А, рН, тиск, температура стерилізації, час стерилізації, стерильність	Манометр, технічний, рН-метр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C, P = 0,05 МПа τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
К _т , К _м 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції А у колбах	Композиція А, та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
К _т , К _м 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б у колбах	Композиція Б, температура та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кх, К _т , К _м 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 25 л	Композиція А, рН, тиск, температура стерилізації, час стерилізації, стерильність	Манометр, технічний, рН-метр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C, P = 0,05 МПа τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5
Кх, Кт, Км 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 25 л	Композиція Б, рН, тиск, температура стерилізації, час стерилізації, стерильність	Манометр, технічний, датчик температури, годинник рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 250 л	Композиція А, тиск, температура стерилізації, час стерилізації, стерильність	Манометр, технічний, датчик температури, годинник рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, P = 0,05 МПа τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 250 л	Композиція Б, тиск, температура стерилізації, час стерилізації, стерильність	Манометр, технічний, датчик температури, годинник рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.1. Підтримання колекційної культури	Культура <i>P. polytuxa EJS-3</i> , тривалість, температура, мікробіологічна чистота	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль у процесі збереження	t = 4 °С, τ = 3-4 міс, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.2. Одержання робочої культури	Культура <i>P. polytuxa EJS 3</i> , тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 28 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 6.3. Вирощування інокуляту в колбах	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота.	Термометр технічний, тахометр, мікробіологічний контроль	Контролюється частота обертів перемішуючого пристрою, температура – безперервно, мікробіологічний контроль проводиться після вирощування	t = 28°С, n = 180 об/хв, τ = 18 год, відсутність сторонньої мікробіоти,

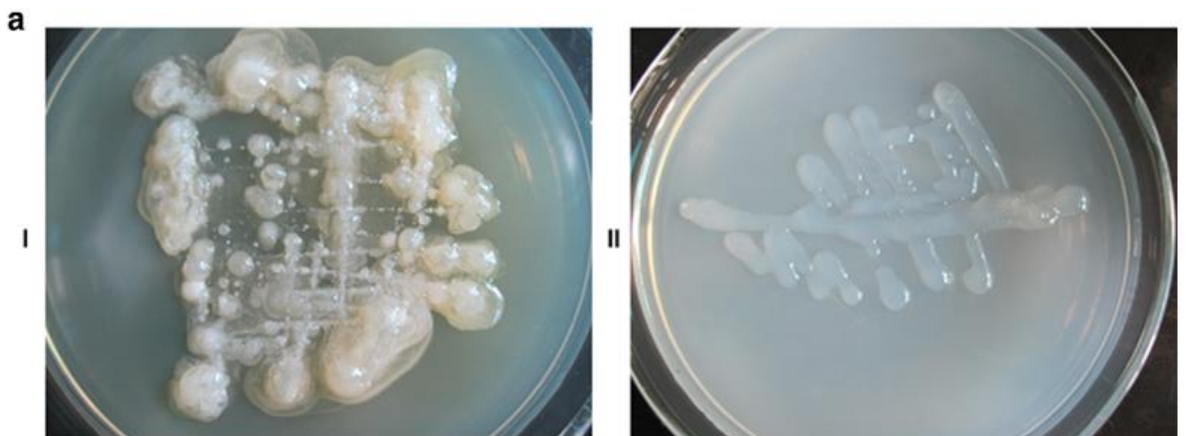
Кх, Кт, Км 6.4. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л	Посівний матеріал, рН, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси	Датчик рН та температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси відбираються кожні 10 годин	t = 24 °C, τ = 18 год, відсутність сторонньої мікробіоти,
Кх, Кт, Км 7.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 250 л	Культуральна рідина, рН, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси	Датчик рН та температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль, ваговий метод	рН визначається перед та в процесі культивування, температура визначається безперервно під час культивування. Визначається витрати стерильного аераційного повітря. Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, концентрації біомаси відбираються кожні 8 години	pH = 7,0 t = 24°C, τ = 60 год, Cп = 35,5 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти,
Кт 8.1 Центрифугування	Культуральна рідина, швидкість обертання, час процесу	Датчик Годинник	Під час процесу	n=10000 хв-1 τ = 15 хв
Кт 9.1 Розчинення клітинних капсул	Відфільтровані клітини, кількість спирту, час процесу	Датчик Годинник	Під час процесу	τ = 1 год 15 хв
Кт 9.2 Центрифугування	Розчин з клітинами, швидкість обертання, час процесу	Датчик Годинник	Під час процесу	n=5000 хв-1 τ = 15 хв
Кт 9.3 Ультрафільтрування	Суспензія		Під час процесу	
Кт 9.4 Осадження	Розчин, кількість кислоти, час процесу	Датчик Годинник	Під час процесу	τ = 1 год 15 хв
Кт 9.5 Центрифугування	Розчин з леваном, швидкість обертання, час процесу	Датчик Годинник	Під час процесу	n=5000 хв-1 τ = 15 хв

Кт 9.6 Вакуум випарна сушка	Полісахарид кремово-білого кольору, Температура	Термометр	Під час процесу	$t = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$
Кт 9.7 Подрібнення	Розмір подрібнених частинок	Сито	Після закінчення процесу	$d = 2\text{ мм}$
Кх Кт 10.1 Пакування маркування відвантаження	Вологість продукту,	Аналізатор вологості	Після процесу	$W = 5-7\%$

9.2. Мікробіологічний контроль.

Культивування *Paenibacillus polymyxa* EJS – 3 для ожерджання левану повинно проходити в асептичних умовах[11], а тому необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб запевнитись у відсутності контамінації. Для цього кожні 3 год з посівного апарату об'ємом 25 відбираються зразки культуральної рідини та кожні 5 год відбираються зразки з ферментера об'ємом 250 л для аналізу.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з триптон-соєвим агаром (ТСА) або м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) – для виявлення дріжджів і грибів. *P. polymyxa* на щільних поживних середовищах формує безбарвні або бліді, плоскі або опуклі, гладкі і слизові колонії з пільчатим краєм (за рН 4 – 7; температура 30⁰С). [17] (мал. 1.1 а I та а II)



9.3. Мікроскопіювання

Для цього використовують препарат «роздавлена крапля». Для приготування препаратів за методом роздавленої краплі на поверхню чистого сухого предметного скла наносять краплю води або фізіологічного розчину в разі перевірки посівного матеріалу, на наявність контамінації. Скляною паличкою або бактеріологічною петлею в краплю вносять невелику кількість досліджуваної культури і обережно розподіляють її в рідині для отримання однорідної суспензії. Якщо буде здійснюватися перевірка культуральної рідини на наявність сторонньої мікрофлори, то на поверхню чистого сухого предметного скельця буде вноситись декілька крапель культуральної рідини. Після чого приготовлену краплю накривають покривним склом, уникаючи

утворення бульбашок повітря. Якщо частина рідини виступає за краї покривного скла, надлишок середовища можна поглинути вузькою смужкою фільтрувального паперу. Готові препарати розглядають в сухих і іммерсійних системах[59].

При відсутності у зразку сторонньої мікрофлори під час мікроскопіювання можна побачити клітини паличкоподібної форми, які відрізняються доволі малими розмірами клітини, а саме довжиною від до 2 до 5 мкм та діаметром від 0,6 до 0,8 мкм [11] .

9.4. Визначення концентрації біомаси.

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод) з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка. У пробірки із 9 мл дистильованої води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтують, потім вимірюють оптичну густину (при 540 нм), отримані дані перераховують за калібрувальним графіком[60].

9.5. Концентрація цільового продукту (левану).

Екзополісахариди виділяються осадженням розчину культуральної рідини. Полісахарид може бути осаджений з супернатанту додаванням полярного органічного розчинника, що змішується з водою, наприклад спирт або ацетон. Пропорції розчинника можуть бути різні, це може бути один, два або три об'єми до об'єму культуральної рідини, хоча найчастіше використовуються два об'єми. Органічні розчинники викликають осадження, знижуючи розчинність екзополісахаридів в воді. Вони також можуть бути використані для знебарвлення і для екстракції низькомолекулярних продуктів ферментації і компонентів середовища. Під час осадження білки і солі середовища можуть також осідати разом з екзополісахаридами. Депротейнізація і видалення солей використовується для отримання чистого екзополісахариду [61].

Для визначення кількості екзополісахаридів (ЕПС) необхідно провести такі операції: довести маси фільтрів до постійної ваги, осадити ЕПС з супернатанту 96% етиловим спиртом, визначати масу сухого ЕПС.

Для осадження ЕПС беремо 5 мл супернатанту, до якого додаємо 10 мл 96% етилового спирту, після чого розчин витримуємо добу при кімнатній температурі. Далі центрифугуємо при 6000 об / хв протягом 15 хв з метою відокремлення осадженого екзополісахариду. Надоосадову рідину зливаємо. До осаду ЕПС додаємо 10 мл 96% етилового спирту, ретельно перемішуємо і знову центрифугуємо. Таку операцію повторювали двічі. В результаті отримуємо ЕПС від світло-коричневого до кремово-білого забарвлення. Потім отриманий осад ЕПС переносимо на попередньо зважені і висушені фільтри і висушуємо при 105°C до постійної маси. Потім чашку Петрі з фільтрами виймаємо із сушильної шафи і переносимо в ексікатор з безводним хлористим кальцієм (CaCl₂). Через годину фільтри зважуємо на аналітичних вагах з точністю до 0,0001 г. Режим висушування і зважування той же, який використовували при визначенні маси фільтрів. Кількість (масу) висушеного ЕПС визначали за формулою (1):

$$P = \frac{(A - B) * 1000}{V} \quad (1)$$

Де P – маса сухого ЕПС, г/л;

A – маса висушеного фільтра з осадом, г;

B – маса висушеного фільтру без осаду, г;

V – об'єм супернатанту, взятий для осаду ЕПС, мл.

9.6. Визначення вологості

Контроль вологості готового продукту проводять за допомогою аналізатора вологості MA 50/X — це сучасний лабораторний вимірювальний прилад який призначений для визначення відносної вологості і сухого залишку будь-яких сипучих і рідких продуктів.

За допомогою пропонованого *аналізатора вологості* провести необхідні вимірювання набагато простіше і швидше — всього за 5-20 хвилин можна

отримати готові результати. Нагадаємо: при способі визначення вологості були потрібні сушильна шафа, ваги і набагато більше часу. У конструкції *аналізатора вологості МА 50/Х* закладена можливість для підключення персонального комп'ютера, принтера КАФКА і клавіатури, а це, ясна річ, спрощує введення параметрів сушіння.

Бібліотека програми дозволяє користувачеві запрограмувати в прилад до 99 -ти власних унікальних програм сушіння. Для роботи системи необхідно буде тільки вибрати назву потрібного продукту, а не вводити кожен раз всі параметри сушки.

У бібліотеці пам'яті аналізатора вологості МА 50/Х зберігаються дані про останні 99 вимірах. Ці дані включають дату і час вимірювання, назва продукту, час сушіння, стартову та кінцеву масу, температуру і профіль сушки, результат (вміст вологи).

Загалом, аналізатор вологості МА 50/Х — це дуже зручний, практичний і, повторимося, сучасний прилад, який робить процес визначення вологості швидким і нескладним [62].

РОЗДІЛ 10

АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

10.1. Опис апаратурно-технологічної схеми виробничої дільниці.

Природні полісахариди присутні в складі рослинних і тваринних тканин у вигляді складно-побудованих систем. Хоча методи виділення полісахаридів з природної сировини надзвичайно різноманітні, і неможливо описати стандартну процедуру, існує ряд загальних вимог і підходів. Обраний спосіб виділення повинен відповідати двом основним вимогам. По-перше, процес повинен бути максимально ефективним, супроводжуватися незначними втратами на всіх етапах отримання. По-друге, в процесі виділення полісахарид повинен піддаватися можливо менших змін.

При виділенні індивідуальних полісахаридів доводиться вирішувати три завдання різного ступеня складності (слід зазначити, що вони рідко є послідовними етапами виділення) :

- 1) відділення низькомолекулярних речовин;
- 2) відділення біополімерів неуглеводної природи
- 3) поділ сумішей полісахаридів.

При виборі методу для вирішення чергового завдання слід враховувати ті властивості цільового біополімера, за якими він відрізняється від інших компонентів вихідної суміші; ці відмінності і повинні виявлятися за допомогою застосування шуканого методу. З огляду на різноманіття вивчених полісахаридів, розробка стандартної процедури їх виділення і очищення є неможливою. Проте, незалежно від природи цільового з'єднання процес повинен бути максимально ефективним,

					НУХТ БТЕК 04.01.14. КР ПЗ		
		№	Підпис				
Розроб.	Щербина І.С.			<i>АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант	Клименко О.М.					106	4
Керівник	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						

тобто забезпечувати максимальний вихід продукту; полісахарид не може бути піддано деструкції під впливом хімічних реагентів, використаних для його виділення, або ферментів, присутніх у складі сировини.

З наведених даних можна зробити висновок, що для висушування левану доцільніше застосовувати трьохкорпусну вакуум-випарну установку, оскільки в цього типу сушарок:

- проста експлуатація;
- достатня продуктивність;
- досить компактні;
- рівномірне висушування;
- вони добре підходять для висушування термостабільних продуктів.

10.2. Технологічні вимоги до системи автоматизації.

Таблиця 10.1

№ п/п	Місце відбору	Регульований параметр	Допустимі значення пар-ру	Вид автоматизації	Характер контролю чи керування	Додаткові вимоги
	2	3	4	5	6	7
1	Підігрівник	Температура	78 °С	Контроль Регулювання	Покази, запис, сигналізація	Дія на клапан подачі пари
2	Випарна установка 1	Температура	118 °С	Контроль Регулювання	Покази, запис, сигналізація	Дія на клапан подачі пари
3		Тиск	150 кПа	Контроль	Покази, сигналізація	Світлова сигналізація
4	Випарна установка 2	Температура	108 °С	Контроль Регулювання	Покази, запис, сигналізація	Дія на клапан подачі пари
5		Тиск	110 кПа	Контроль	Покази, сигналізація	Світлова сигналізація

10.3. Обґрунтування та вибір системи засобів автоматизації

Виходячи з умов виробництва обираються новітні засоби автоматизації, що мають похибку не більше 1%, задовольняють потреби в надійності та швидкодії. Для зручності підключення та економії на модулях контролера обираються датчики з уніфікованим вхідним сигналом 4-20 мА. Використовуються вихідні уніфіковані сигнали 0-10 В.

10.4. Опис схеми автоматизації об'єкта

На функціональній схемі автоматизації передбачено наступні контури.

1. Регулювання температури в підігрівнику реалізовано за допомогою мікропроцесорного вимірювального перетворювача Sitrans TF2 фірми Siemens. Він містить вбудований чутливий елемент – платиновий термометр опору Pt 100 та вторинний показуючий, самозапам'ятовуючий пристрій з уніфікованим вихідним сигналом 4-20 мА (позиція 1а). Далі сигнал надходить на ПЛК, де формується управляючий вихідний сигнал, який через електропневмо перетворювач ЕПП-3211 (позиція 1б) надходить на пневматичний виконавчий механізм МИМ-3077 (позиція 1в), який залежно від завдання відкриває чи закриває клапан подачі пари.

2. Регулювання температури у випарній установці 1 реалізовано за допомогою мікропроцесорного вимірювального перетворювача Sitrans TF2 фірми Siemens. Він містить вбудований чутливий елемент – платиновий термометр опору Pt 100 та вторинний показуючий, самозапам'ятовуючий пристрій з уніфікованим вихідним сигналом 4-20 мА (позиція 2а). Далі сигнал надходить на ПЛК, де формується управляючий вихідний сигнал, який через електропневмо перетворювач ЕПП-3211 (позиція 2б) надходить на пневматичний виконавчий механізм МИМ-3077 (позиція 2в), який залежно від завдання відкриває чи закриває клапан подачі пари.

3. Регулювання температури у випарній установці 2 реалізовано за допомогою мікропроцесорного вимірювального перетворювача Sitrans TF2 фірми Siemens. Він містить вбудований чутливий елемент – платиновий термометр опору Pt 100 та вторинний показуючий, самозапам'ятовуючий

пристрій з уніфікованим вихідним сигналом 4-20 мА (позиція 3а). Далі сигнал надходить на ПЛК, де формується управляючий вихідний сигнал, який через електропневмо перетворювач ЕПП-3211 (позиція 3б) надходить на пневматичний виконавчий механізм МИМ-3077 (позиція 3в), який залежно від завдання відкриває чи закриває клапан подачі води.

4. Контроль тиску у випарній установці 1 реалізовано за допомогою перетворювача тиску Сапфір 22ДВ з уніфікованим вихідним сигналом 4-20 мА (позиція 4а).

5. Контроль тиску у випарній установці 2 реалізовано за допомогою перетворювача тиску Сапфір 22ДВ з уніфікованим вихідним сигналом 4-20 мА (позиція 4а). [63]

10.5. Специфікація на засоби автоматизації

Таблиця 10.2

№ п/п	№ позиції за схемою	Найменування і технічна характеристика виробу	Тип, марка	Одиниця вимірювання	К-ть	Примітка
1	2	3	4	5	6	7
1	1а, 2а, 3а	Термометр опору з перетворювачем температури. Діапазон вимірювання - 200 до +8500С. Мінімальний інтервал вимірювання 100С. Цифрова точність 0,1 0С. Вихід 4...20мА, двохпроводний.	Pt100, SITRANS TF	Шт.	3	Siemens
2	4а, 5а	Безконтактний претворювач тиску. Межа вимірювання 1,5 МПа, вих. Сигнал 4-20мА, клас точності 0,25	Сапфір 22ДВ	Шт.	2	
3	1б – 3б	Електропневмо перетворювач перетворює сигнал з 4-20 мА в 0,2-1 кгс/см ² . Тиск живлення 1,4 кгс\см ² .	ЕП П-3211	Шт.	3	ООО «Саранские приборы»
4	1в – 3в	Пневматичний виконавчий механізм 2-х позиційний для одноходових прохідних клапанів Ду – 50 мм. В комплект входить клапан 2х позиційний 3257.	М ИМ-3077	Шт.	3	„Делис” м. Харків

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Е.В. Рудакова, Ревин В.В.* Характеристики й методи дослідження властивостей левану // ИСЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МОРДОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ. – 2017 – 50 С.
2. *Р.Г. Редькин.* Эффективность и безопасность применения снотворных препаратов различных групп. *Журнал неврологии імені Б.М. Баньковського* – 2013 (1) – ст.114 - 121.
3. *Joan Combie1, Ebru Toksoy Öner.* From healing wounds to resorbable electronics, levan can fill bioadhesive roles in scores of markets. *Bioinspiration & Biomimetics.* – 2018 – doi:10.[1088/1748-3190/aaed92]
4. *Бирюков В. В.* Основы промышленной биотехнологии: учеб. пособие для вузов / В. В. Бирюков. – М. : Колос. Химия, 2004. – 295 с.
5. Montana Polysaccharides Corp. 2015. Your source of levan. [Электронный ресурс] Режим доступа: www.polysaccharides.us.
6. *Öner E.T.* Review of levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects / E.T. Öner, L. Hernández, J. Combie // *Biotechnology advances.* – 2016. – Vol.34, № 5. - P. 827-844.
7. *Beine R.* Synthesis of novel fructooligosaccharides by substrate and enzyme engineering / R. Beine, R. Moraru, M. Nimtz et al. // *Journal of Biotechnology.* – 2008. – Vol. 138, № 1–2. – P. 33–41.
8. *Хамагаева И. С.* Использование пробиотических культур для производства колбасных изделий / И. С. Хамагаева, И. А. Ханхалаева, Л. И. Заиграева. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2006. – 204 с.
9. *Kim K. H.* Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis* / K. H. Kim, C. B. Chung, Y. H. Kim et al. // *International Journal of Cosmetic Science.* – 2006. – Vol. 28, № 3. – P. 231–231.]

10. Аркадьева З. А. М. Безбородов, И. Н. Блохина и др
Промышленная микробиология / З. А. Аркадьева, . – М. : Высшая школа, 1989. – 688 с.
11. Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., & Zeng, X. Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydrate Polymers* – 2010 – doi:10.1016/j.carbpol.2009.07.055
12. Küçükaşık, F., Kazak, H., Güney, D., Finore, I., Poli, A., Yenigün, O., ... Öner, E. T. (2010). Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(6), 1729–1740. doi:10.1007/s00253-010-3055-8
13. Bekers, M., Laukevics, J., Karsakevich, A., Ventina, E., Kaminska, E., Upite, D., ... Scherbaka, R. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. *Process Biochemistry*, - 2007 - 36(10), 979–986. doi:10.1016/s0032-9592(01)00140-6.
14. Lal, S. and S. Tabacchioni. 2009. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. *Indian Journal of Microbiology*. 49(1): 2-10.
15. Vijayalakshmi, S.P. and A.M. Raichur. 2002. Bioflocculation of high-ash Indian coals using “*Paenibacillus polymyxa*”. “*International Journal of Mineral Processing*”. 67(1-4): 199-210.
16. Mokaddem, H., Z. Sadaoui, N. Boukhelata, N. Azouaou, and Y. Kaci. 2009. Removal of Cadmium from aqueous solution by polysaccharide produced from *Paenibacillus polymyxa*. *Journal of Hazardous Materials*. 172(2-3): 1150-1155.
17. Zengguo, H., D. Kisla, L. Zhang, C. Yuan, K.B. Green-Church, and A.E. Yousef. 2007. Isolation and Identification of a *Paenibacillus polymyxa* Strain That Coproduces a Novel Lantibiotic and Polymyxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(1): 168-178

18. Huo, Z., X. Yang, W. Raza, Q. Huang, Y. Xu, and Q. Shen. 2010. Investigation of factors influencing spore germination of *Paenibacillus polymyxa* ACCC10252 and SQR-21. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(2): 527-536.
19. Casadei, M.A., R. Ingram, R.J. Skinner, and J.E. Gaze. 2000. Heat resistance of *Paenibacillus polymyxa* in relation to pH and acidulants. *Journal of Applied Microbiology*. 89(5): 801-806.
20. Zhenhua Huo, Nan Zhang, Waseem Raza, Xinqi Huang. 2012. Comparison of the spores of *Paenibacillus polymyxa* prepared at different temperatures. 89(5): 925-933
21. Pu, X., Chen, F., Yang, Y., Qu, X., Zhang, G., & Luo, Y. (2015). Isolation and characterization of *Paenibacillus polymyxa* LY214, a camptothecin-producing endophytic bacterium from *Camptotheca acuminata*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(8), 1197–1202.
22. Vasan, S.S., J.M. Modak, and K.A. Natarajan. 2001. Some recent advances in the bioprocessing of bauxite. *International Journal of Mineral Processing*. 62(1-4): 173-186.
23. de Mas, C., N.B. Jansen, and G.T. Tsao. 1988. Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnology and Bioengineering*. 31(4): 366-377.
24. Choi, S.K., S.Y. Park, R. Kim, C.H. Lee, J.F. Kim, and S.H. Park. 2008. Identification and functional analysis of the fusaricidin biosynthetic gene of *Paenibacillus polymyxa* E681. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 365(1): 89-95.
25. Ash, C., F.G. Priest, and M.D. Collins. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 64(3-4): 253-260
26. Weselowski, B., Nathoo, N., Eastman, A. W., MacDonald, J., & Yuan, Z.-C. (2016). Isolation, identification and characterization of

Paenibacillus polymyxa CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. BMC Microbiology, 16(1). doi:10.1186/s12866-016-0860-y

27. PROTEOLEA® Електронний ресурс // Режим доступу: <https://www.ulprospector.com/documents/1151957.pdf?bs=2392&b=204870&st=20&r=eu&ind=personalcare>
28. Байцар Р. І., Кордіяка Ю. М., Актуальні проблеми та перспективи розвитку косметологічної галузі . - 2015. - № 821. - С. 44-49. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/VNULP_2015_821_10
29. Technical Data File PROTEOLEA® Електронний ресурс // Режим доступу: <https://www.ulprospector.com/documents/1141022.pdf?bs=2392&b=204870&st=1&sl=83033179&crit=a2V5d29yZDpbIFBST1RFT0xFQV0%3d&k=|PROTEOLEA&r=eu&ind=personalcare>
30. ДЕРЖАВНА СЛУЖБА СТАТИСТИКИ УКРАЇНИ, РОЗПОДІЛ ПОСТІЙНОГО НАСЕЛЕННЯ УКРАЇНИ ЗА СТАТТЮ ТА ВІКОМ Електронний ресурс // Режим доступу: https://ukrstat.org/uk/druk/publicat/kat_u/2019/zb/07/zb_rpn2019.pdf
31. KEGG Starch and sucrose metabolism - Paenibacillus polymyxa [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=ppy00500&keyword=levan
32. Зав'ялов В.Л., Зоткіна Л.В., Немирович П.М., Бодров В.С., Запорожець Ю.В., Попова Н.В., Мисюра Т.Г. Процеси і апарати біотехнологічних виробництв: Метод. рекомендації до вивчення дисципліни, виконання курсових і контрольних робіт для студ. напрямку 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / Уклад.:. – К.: НУХТ, 2012. – 98 с.
33. Мосичев М.С. Общая технология микробиологических производств : учеб./ М.С. Мосичев, А.А. Складнев, В.Б. Котов – М.: Лёгкая и пищевая промышленность, – 264 с.

34. Забор – атмосферный воздух. Большая Энциклопедия Нефти и Газа. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ngpedia.ru/id20748p1.html>
35. Блейхер И.Г. Компрессорные станции: учеб./ И.Г. Блейхер, В.П. Лисеев – М.: Машгиз, . – 323 с.
36. Калунянец К.А. Микробные ферментные препараты: учеб./ К.А. Калунянец, Л.И. Голгер – М.: Пищевая промышленность,. – 302 с.
37. Міністерство охорони здоров'я [Электронный ресурс] // Методичні вказівки. – Режим доступа: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20011214_502.html
38. Биомой [Режим доступа]: https://dezplus.com.ua/catalogue/disinfection/pre-sterilized-cleansing/pre-sterilized-cleansing_48.html
39. Средство для ручной мойки оборудования А11 [Режим доступа]: <https://energomash.net.ua/p13141309-sredstvo-dlya-ruchnoj.html>
40. Сода каустическая [Режим доступа]: <https://www.systopt.com.ua/ru/soda-kaustycheskaya-zhydkaya-46-zhydkyj-kaustyk/>
41. Полиdez 20 [Режим доступа]: <http://www.agrovita.org.ua/sredstva-zashchity-rastenij/sredstva-dezinfektsii/item/polidez-20>
42. Гембар - універсальний сучасний дезінфікуючий засіб із пролонгованою дією [Режим доступа]: <http://www.attis.com.ua/site/liquid/gembar.html>
43. Клорсепт – 25 [Режим доступа]: <https://ekohimiya.com.ua/p59528695-klorsept.html>
44. Дезактин [Режим доступа]: http://laverna.kiev.ua/e-store/xml_catalog/index.php?SECTION_ID=94&ELEMENT_ID=488
45. *Веткина И.Ф., Комаринская Л.В., Ильин И.Ю., Соловьева М.В.* Современный подход к выбору дезинфицирующих средств в системе профилактики внутрибольничных инфекций (ВБИ) // ФАРМиндекс-Практик. – 2005.- № 7. – с. 13-20\

46. Дезекон ОМ - дезинфицирующее средство на основе композиции ЧАС [Режим доступа]: <https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-desekon-om-baltiachemi-kiev>
47. Дезэфект УНВЦПД – средство для дезинфекции, ПСО и санитарной обработки [Режим доступа]: <https://interdez.com.ua/product/dezefekt-unvcpd>
48. Larsen B. Biosynthesis of alginate. Tritium incorporation with polymannuronic acid 5-epimerase from *Azotobacter vinelandii* / B. Larsen, A. Naug // *Carbohydr Res.* – 1971. - Vol. 20. – P. 225–232.
49. Глембоцкий В. А. Классен В. И. Флотация — М., 1973
50. Ю.В. Карлаш. Основы проектирования биотехнологических производств: Конспект лекций для студентов напрямую 6.051401 «Биотехнология» дневной заочной форм обучения / Уклад.: Ю.В.Карлаш - К: НУХТ, 2013 – 143 с.
51. Системы очищения Raifil. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://raifil.ua/uk/faq/shcho-take-ultrafiltraciya>
52. Фильтрующие центрифуги СЕРА TZ [Электронный ресурс]//. – Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/filtruyushchie-tsentrifugi/pilotnye-filtruyushchie-tsentrifugi-sera-tz/>
53. Пилотная система для микро- и ультрафильтрации УФ-201 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://biotechno.ru/chem/vydelenie-i-ochistka-produkta1/pilotnaya-sistema-dlya-mikro-i-ultrafiltratsii-uf-201/>
54. Шиповская А. Б. Методы выделения и физико-химические свойства природных полисахаридов: учебно-методическое пособие / А. Б. Шиповская. – Саратов : Саратовск. госуниверситет, 2015. – 64 с.
55. Блинов В. А. Биологическая химия: курс лекций / В. А. Блинов, И. А. Сазонова. - Саратов : СГАУ, 2007. – 398 с.

56. Конвективні сушарки. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://poznayka.org/s1542t1.html>
57. Розрахунок і принцип роботи розпилювальної сушарки. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://ua-referat.com/Розрахунок_і_принцип_роботи_розпилювальної_сушарки
58. Uoslab СВ-80 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://ru.uoslab.com/sushilnoe-oborudovanie/vakuumnye-shkafy/vakuumnyj-sushilnyj-shkaf-sv-80>
59. Роздавлена крапля [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://ukrhealth.ru/rizne/49852-rozdavlena-%20%20kraplja.html>.
60. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. / Т. П. Пирог. – К.: НУХТ, 2010. – 217 с.
61. Vina I. Bacterial polysaccharide levan: chemical modification and structure investigations / I. Vina, A. Karsakevich, M. Bekers et al. // Book of Abstracts of XVth EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry. – Edinburgh, Scotland, - 1998. – 170 p
62. Аналізатор вологості (Вологомір) Radwag MA 50X [Електронний ресурс]//. – Режим доступу: http://chemtest.com.ua/ua/product_print.php?item_id=1851
63. Методичні рекомендації до виконання курсової роботи для студентів за напрямом підготовки 6.051010 «Харчова технологія та інженерія» всіх форм навчання. К.: НУХТ, 2013р.