

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Грегірчак Н.М.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

« » червень 2021 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Пирог Т.П.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

« » червень 2021 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми _____

на тему: **«Одержання декстранази культивуванням *Penicillium piscarium*»**

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 2

Харченко Олександр Віталійович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Старовойтова Світлана Олександрівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти Клименко О.М.

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(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)

Київ – 2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальні 162 «Біотехнології та біоінженерія»

сть (код і
назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Пирог Т.П.

“ 01 ” квітня 2021 року

ЗАВДАННЯ НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Харченка Олександра Віталійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання декстранази культивуванням *Penicillium piscarium*

керівник роботи Старовойтова Світлана Олександрівна, к.б.н, доцент,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2021 року № 228-кс

2. Строк подання здобувачем роботи _____

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Penicillium piscarium*, цільовий продукт: декстраназа

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агенту. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва декстранази. РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля

5. Перелік графічного матеріалу:

Технологічна схема виробництва декстранази – 2 аркуши формату А,1, 1 аркуш

формату А0. Апаратурна схема виробництва декстранази – 3 аркуши формату А1

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
РОЗДІЛ 8. Автоматизація ділянки виробництва декстранази	Клименко О. М., доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.04.21-04.04.21	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	05.04.21-10.04.21	
3	Техніко-економічне обґрунтування	10.04.21-15.04.21	
4	Біосинтез цільового продукту	15.04.21-20.04.21	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	20.04.21-25.04.21	
6	Специфікація обладнання	25.04.21-30.04.21	
7	Опис технологічної схеми	01.05.21-05.05.21	
8	Контроль виробництва	05.05.21-10.05.21	
9	Автоматизація ділянки виробництва	10.05.21-15.05.21	
10	Охорона довкілля	15.05.21-20.05.21	
11	Оформлення пояснювальної записки	20.05.21-25.05.21	
12	Виконання графічної частини проекту	25.05.21-28.05.21	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Харченко О.В.
(прізвище та ініціали)

Старовойтова С.О.
(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці методики виробництва фермента декстранази на основі міцеліального гриба *Penicillium piscarium*.

Було проведено порівняння потенційних продуцентів ферменту декстранази та складу поживних середовищ для їх культивування, і прийнято рішення обрати штам *P.piscarium* БИМ Г-102, який порівнянно з іншими продуцентами синтезує фермент з найвищою активністю -290 од/л, а також має найнижчу умовну вартість 1 л середовища – 4,69 грн.

В кваліфікаційній роботі наведено розрахунок потужності виробництва (з розрахунком кількості циклів та необхідного об'єму ферментера), представлений повний опис технологічної схеми виробництва по стадіям. Також було обґрунтовано вибір післяферментаційних стадій виділення та інкапсуляції ферменту декстраназа, наведено методики контролю виробництва.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, 10 розділів, графічних матеріалів та списку використаної літератури з 53 найменувань. Загальний обсяг роботи – 120 сторінок, 12 рисунків, 21 таблиця.

Ключові слова: *Penicillium piscarium* БИМ Г-102, декстраназа, посівний матеріал, культуральна рідина, зубна паста, біосинтез, відділення біомаси, інкапсуляція, ультрафільтрація, УБС.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	6
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	9
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	18
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	28
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	31
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	68
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	74
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	88
РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА	99
РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	108
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	115

ВСТУП

Ферменти – білкові сполуки, які є біологічними каталізаторами. У сучасній ензимології відомо понад 3000 ферментів. Ферменти, як правило, класифікують за хімічним складом і за типом реакцій, на які вони впливають, додаючи суфікс –аза до назви субстрату (наприклад, декстраназа – фермент, що бере участь у перетворенні декстрану) [1].

У наш час фінансовий обіг на ринку ферментів становить сотні мільйонів доларів на рік. Потреба в цих білкових сполуках постійно підвищується. Сьогодні мікробіологічним способом отримують величезну кількість ферментів. Ферменти, які мають промислове значення: глюкозооксидаза (для збереження м'яса, соків, пива), амілаза (для розщеплення крохмалю до глюкози, яку зброджують дріжджі в процесі випікання хліба), ренін (виробництво сиру), пептидгідролази (для розм'якшення шкір і видалення з них шерсті), бактеріальні протеази (для прання білизни з допомогою біопорошків з ферментними добавками), целюлоза (кормові ферменти для збільшення поживної цінності кормів), калагенази (для омолодження шкіри в складі кремів і масок) [1].

Зростаючий попит на ферменти стимулює активний пошук високоефективних методів отримання і виділення цих сполук. Найбільш перспективним є мікробіологічний спосіб виробництва, що передбачає використання біологічного агента-продуцента.

Стоматологія, галузь медицини яка потребує великої кількості ферментів декстраназ. Декстраназа і мутаназа гідролізують полісахариди, синтезовані карієсогенними мікроорганізмами, а також розривають ланцюги декстрану, що виникають під дією стрептококів, з наступним утворенням водорозчинних сполук.

					<i>НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Харченко О.В.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Старовойтова С.О.</i>					5	120
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>						
								6

Ферменти в пастах застосовуються як самостійно, так і в комплексі один з одним. Концентрація ферментів регулюється в залежності від їх активності. Типовими представниками українських виробників ферментвмісних лікувально-профілактичних зубних паст є “Биокон” і “Пирана”. Саме ферментвмісні зубні пасти рекомендується використовувати для гігієни порожнини рота при лікуванні хвороб пародонта і слизової оболонки порожнини рота в період загострення.

Метою мого дипломного проекту є розробка нового методу внесення ферменту декстранази у склад ферментвмісних зубних паст.

Новизною даної роботи є сучасний експериментальний спосіб внесення ферментів у склад зубних паст без великої втрати їх активності, а саме, інкапсулювання ферменту в альгінатний матрикс.

					<i>НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Харченко О.В.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Старовойтова С.О.</i>					5	120
<i>Реценз.</i>								7
<i>Н. Контр.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>						

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

Декстраназа (1,6- α -D-глюкан-6-глюканогідролаза) каталізує розщеплення α -1,6-зв'язків в бактеріальному полісахариді декстрані. Серед продуцентів декстраназ слід зазначити *Bacillus Subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Lactobacillus befidus*, *Streptococcus mutans*, *Bravibacterium fuscum*, *Pseudomonas* UQM-733, різні ґрунтові бактерії, а також численні види мікроскопічних грибів роду *Penicillium*, *Aspergillus* і *Fusarium*.

Декстранази мають молекулярну масу від 35 до 71 кДа; вони є слабокислими білками. Ізоелектрична точка для всіх грибних декстраназ лежить в діапазоні від 4,0 до 4,6. Для більшості бактеріальних декстраназ оптимальна температура каталітичної дії 35-37 °С; для грибних продуцентів температура трохи вище - 55-60 °С. Оптимальне значення рН коливається в залежності від виду продуцента від 4,4 до 7,5. За допомогою ендодекстраназ можна отримувати з декстрану кровозамінники необхідної молекулярної маси; їх також використовують в стоматології для зняття зубних бляшок, що складаються з декстраноподібних глюканів [1].

Кристалічну структуру грибкової ендодекстранази вказано на Рис.1.1.

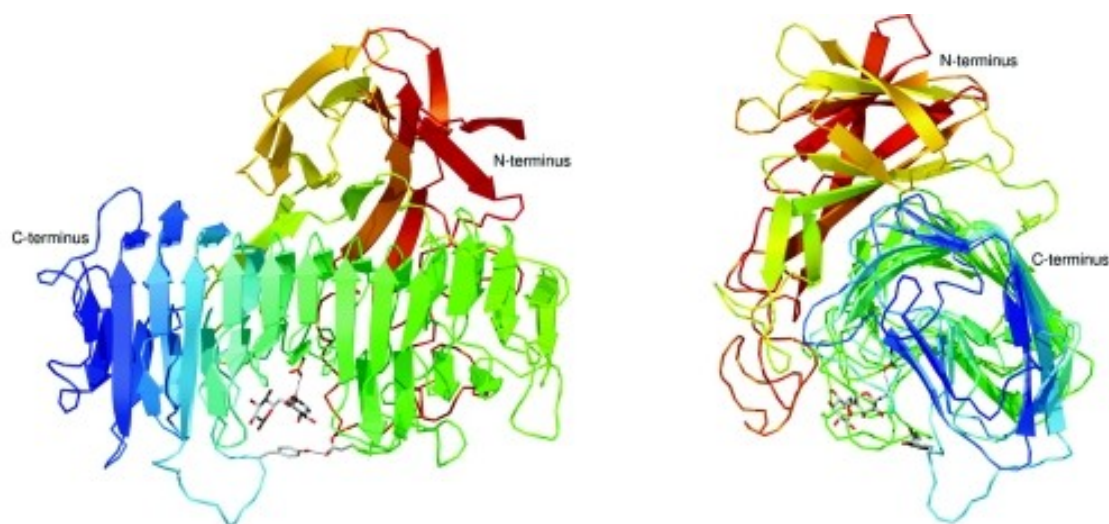


Рис.1.1. Кристалічна структура ендодекстранази DEX49A з *Penicillium minioluteum* [1]

					НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Харченко О.В.			РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					6	120
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Самі декстранази є полідисперсними і, як такі, в основному не підходять для технічних застосувань. Однак ферментативно оброблені фракціоновані декстранази становлять значну комерційну зацікавленість до косметичних засобів, лікарських препаратів і вакцин в якості кріопротекторів і стабілізаторів в харчовій промисловості. Відібрані фракції декстраназ в поєднанні з розчинами поліетиленгліколю утворюють двофазну систему.[2].

Початковий інтерес до ферментів які гідролізують декстран, виник з досліджень, спрямованих на з'ясування структури декстрану і отримання частково гідролізованих декстранових полімерів. Декстранази також мають інші важливі промислові застосування, оскільки ці ферменти можуть деполімеризувати різні проблемні мікробні відкладення декстрану. Присутність декстрану в зібраних цукрових очеретах і утворення декстрану мікробами на цукрових заводах призводять до зниження виходу сахарози. Той факт, що декстран є компонентом зубного нальоту, який, як вважається, сприяє розвитку карієсу, є однією з головних рушійних сил при дослідженні декстран-гідролізуючих ферментів. Гриби є найбільш важливим комерційним джерелом декстранази.

Декстраназа є досить важливим ферментом, який має широке застосування у діяльності людини. Фермент набуває все більшого значення в харчовій (пивоваріння, цукрове виробництво), стоматологічній (ефективний проти карієсу), хімічній промисловості (миючі засоби). Потреба у декстраназі і їй подібних буде постійно зростати, тому ведуться пошуки найбільш ефективних методів отримання цих сполук [2].

До препаратів які містять фермент декстраназу можна віднести пробіотики серії "Біовестин". Пробіотики в сучасному світі не примха, а гостра необхідність для людини. В основному виробники пропонують їх в сухому вигляді - таблетки або капсули. Але тільки в рідкому вигляді пробіотик здатний почати працювати відразу ж після прийому. У ньому міститися не просто живі, а й активні біфідобактерії, які негайно починають відновлювати мікрофлору кишечника. Біовестин - унікальний рідкий пробіотик, створений вченими з наукового міста Кольцово. Містить в живій

активній формі біфідобактерії штаму - *Bifidobacterium longum* МС-42. Виробником БАД є ООО “Био-Веста”.

Також, декстраназа міститься в ферментовмісних пастах, таких як “Paradontax”, “Biotene”, “Blend-a-med (Complit)”. Для профілактики карієсу і гінгівіту рекомендують застосовувати також декстраліз - препарат, який містить у якості активного діючого компонента декстраназу. Вона інтенсивно гідролізує декстрин зубного нальоту, має виражену антибактеріальну дію і високий протикаріозний ефект і поверхня зубів стає гладкою [3].

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента

При виборі біологічного агента для біосинтезу фермента нам потрібно враховувати такі показники:

1. Фермент бажано повинен бути екзогеним для полегшення його виділення з культуральної рідини;
2. Поживний субстрат який буде використовуватися для культивування мікроорганізма повинен бути дешевим, для забезпечення раціональності даного виробництва;
3. Біологічний агент повинен показувати адекватні показники активності фермента;
4. Цільовий продукт не повинен мати токсичності оскільки буде використовуватися у виробництві зубних паст.

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та середовища для його культивування

Декстран – полімер глюкози бактеріального походження із класу полісахаридів. Ферменти, що розщеплюють декстран називаються декстраназами. Декстран-руйнуючі ферменти були виділені з широкого спектру мікроорганізмів. При виробництві декстраназ біологічним агентом може виступати *Penicillium piscarium* [2]. Відомо, що декстранази крім *P. piscarium* здатні продукувати бактерії такі як *Bacteroides oralis*, *Thermoanaerobacter*, *S. sobinus*, *Cytophaga*, *B. fuscum*, *Arthrobacter globiformis*, та деякі види грибів і дріжджів: *Lipomyces lipofer*, *Lipomyces starkeyi*, *Sporotrix schencki*, *Chaetomium gracile*, *A. carneus*, *P. notatum*, *P. Lilacinum*.

В якості джерела вуглецю для синтезу декстраназ *P. piscarium*, як правило, використовують декстран.

Узагальнюючу характеристику біосинтезу декстраназ з використанням різних штамів мікроорганізмів для її синтезу наведено у табл. 2.1.

Вибір біологічного агента для синтезу фермента декстранази слід виконувати за критерієм дешевизни субстратів і активністю синтезованого фермента. За цими критеріями *P. piscarium* підходить найкраще.

					НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Харченко О.В.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					9	120
Реценз.						ІІ		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

Найвищий показник синтезу декстранази – 4,4 г/л – досягається при культивуванні *P. piscarium* БИМ Г-102. Друга за величиною концентрація (1,55 г/л) досягається при культивуванні *A. Insuetus* ВКПМ F-342. Тривалість культивування грибів *P. piscarium* БИМ Г-102 становить 120 год.

Проте така порівняльна характеристика технологічного процесу є недостатньою. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента порівнюємо вартість поживних середовищ, використовуваних продуцентами (табл. 2.2). Дані, наведені у табл. 2.2, засвідчують, що середовище для культивування *P. piscarium* БИМ Г-102 є дешевшим, ніж середовище для культивування *A. Insuetus* ВКПМ F-342. Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент, розраховуємо умовну вартість 1 г декстранази (табл.2.3).

Порівняльна характеристика продуцентів декстранази

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація продукту, г/л	Активність, Од/л	Умови культивування	Література
<i>Penicillium funiculosum</i> 258	Декстран 35 NaNO ₃ 10 Дріжджовий автолізат 2 K ₂ HPO ₄ 4 MgSO ₄ 0,6	0,7	64	96 год, 28°C, рН 8	Абдель-Наби М.А., Исмаил А.С., Абдель-Фаттах А.М., Абдель-Фаттах А.М. Приготовление и некоторые свойства иммобилизованной декстраназы <i>Penicillium funiculosum</i> 258. Процесс Биохим. 1999; 34 : 391. doi: 10.1016 / S0032-9592 (98) 00127 [4]
<i>Curvularia lunata</i> Штамм 160	Кукурудзяний екстракт 20 Декстран 10	0,3	7,7	96 год, 28°C, рН 5 – 6	Пат.№: 448220/ Способ получения декстраназы/ Силаев А.Б.; Виноградова К.А; Черкесова Г.В; / - Оpubл. 30.10.1974 – Режим доступу: https://findpatent.ru/img_show/4248134.html [5]
<i>Aspergillus insuetus</i> ВКПМ F-342	Поліглюкін 6 NaNO ₃ 3 KH ₂ PO ₄ 1 KCl 0,5 MgSO ₄ 0,5 Дріжджовий автолізат 5	1,55	100	96 год, 30°C, рН 5.0	Пат.№: 1756355/ Способ получения декстраназы/ Молодова; Зинченко; Данилова; Лобанок/ - Оpubл. 19.11.1986 [6]
<i>Penicillium piscarium</i> БИМ Г-102	Декстран 10 NaNO ₃ – 3 KH ₂ PO ₄ – 1 MgSO ₄ – 0,5 KCl – 0,5 FeSO ₄ – 0,01 Кукурудзяний екстракт - 5	4,4	290	120 год, 24°C, рН 5.0	Пат.№ 747889/ Штамм гриба бим г-102 продуцент декстраназы/ Зинченко, Лобанок/ - Оpubл. 15.07.80 [7]

Вартість компонентів поживного середовища для культивування *P.**piscarium* БИМ Г-102 та *A. insuetus* ВКПМ F-342

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2)*
<i>P. piscarium</i> БИМ Г-102	Декстран, 10	363	3,63	1
	NaNO ₃ , 3	19,50	0,06	1
	KH ₂ PO ₄ , 1	52,80	0,05	1
	MgSO ₄ , 0,5	13,2	0,0023	1
	KCl, 0,5	11,20	0,0056	1
	Кукурудзяний екстракт, 5	190	0,95	1
	Вартість 1 л середовища – 4,69 грн			
<i>A. insuetus</i> ВКПМ F-342	Поліглюкін 6	720	4,32	2
	NaNO ₃ , 3	19,50	0,06	1
	KH ₂ PO ₄ , 1	52,80	0,05	1
	KCl, 0,5	11,20	0,0056	1
	MgSO ₄ , 0,5	13,2	0,00023	1
	Дріжджовий автолізат, 5	250	1,25	1
	Вартість 1 л середовища – 5,62 грн			

Примітка. * – Ціни наведено станом на лютий 2021 р.

1. www.systopt.com.ua,

2. <https://a24.com.ua/>

Умовна вартість 1 г декстранази при культивуванні *A. insuetus* ВКПМ F-342 та *P. piscarium* БИМ Г-102

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Активність, Од/л	Умовна вартість 1 Од, грн/од	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного продукту за годину, Од/год
<i>A. insuetus</i> ВКПМ F-342	5,62	100	0,056	96	1,04
<i>P. piscarium</i> БИМ Г-102	4,69	290	0,016	120	2,4

Проаналізувавши всі дані, можна зробити висновок, що для одержання ферменту декстранази доцільніше використовувати гриби *P. piscarium* БИМ Г-102. Незважаючи на більшу тривалість культивування *P. piscarium* БИМ Г-102 переважає *A. insuetus* ВКПМ F-342 по всім іншим заданим критеріям, таким як активність синтезу ферменту мікроорганізмом на літр культуральної рідини і кількість утвореного ферменту за годину.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища для продуцента *P. piscarium* БИМ Г-102

Тривалість культивування 12 год, вихід цільового продукту 4,4 г/л або 290 Од/л.

Потреби для синтезу декстранази. Оскільки неможливо визначити вміст вуглецю у молекулі ферменту, даний розрахунок не проводиться.

Потреби для синтезу біомаси.

Розрахунок вмісту вуглецю в середовищі:

Вміст вуглецю у декстрані ($(C_6H_{10}O_5)_nOH$) становить 40%. У біомасі міститься 50 % вуглецю, отже вміст вуглецю у 2 г біомаси становить $2 \times 0,5 = 1$ г. Ця кількість вуглецю міститься у $(1 \times 100)/40 = 2,5$ г декстрану.

Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 2 г/л біомаси у середовище необхідно внести $(2,5 \times 0,4) + 2,5 = 3,5$ г/л декстрану.

Отже, вміст декстрану у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (2 г/л) становить 3,5 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення:

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 10 % азоту. Таким чином, у 2 г біомаси вміст азоту становить 0,2 г. Для одержання декстранази використовується середовище, яке містить як джерело органічного азоту кукурудзяний екстракт.

Для забезпечення мікроорганізму необхідними ростовими факторами концентрація кукурудзяного екстракту в середовищі повинна становити близько 5 г/л. Концентрація доступного для бактерій органічного азоту (за елементом N) у кукурудзяному екстракті становить 1,9 %. Отже, у 5 г кукурудзяного екстракту міститься $(1,9 \times 5) / 100 = 0,095$ г азоту.

Як джерело мінерального азоту мікроорганізм використовує NaNO_3 , його молекулярна маса становить 85. Отже, у 85 г нітрату натрію міститься 14 г азоту, тоді 0,2 г азоту буде міститись у $(85 \times 0,2) / 14 = 1,2$ г солі.

Оскільки 0,095 г азоту міститься у вигляді органічної солі, необхідно забезпечити лише 0,105 г у вигляді мінеральних солей. 0,105 г азоту буде міститись у $(85 \times 0,105) / 14 = 0,64$ г NaNO_3 .

Розрахунок вмісту фосфору у середовищі. У біомасі міститься близько 3 % фосфору. Отже, для синтезу 2 г/л біомаси вміст фосфору у середовищі повинен становити $2 \times 0,03 = 0,06$ г/л.

Джерелами фосфору в отриманні декстранази є двозаміщений калій фосфорнокислий – K_2HPO_4 . Розрахуємо в якій кількості K_2HPO_4 міститься 0,06 г фосфору. $X = 136 * 0,06 / 31 = 0,26$ г/л. Отже для синтезу 2 г/л біомаси в середовищі має міститись 0,26 г K_2HPO_4 .

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

2.3.1. Морфолого-культуральні ознаки

Загальний вигляд гриба *Penicillium piscarium* такий: конідієносці гладкі 26-60 мкм довжиною в групах від 5 до 8. Конідіогенез слабкий, сіро-зеленого відтінку. Міцелій дуже галузистий, септований.

При культивуванні в глибинних умовах з використанням розчинних субстратів(глюкоза, фруктоза, лактоза) утворюється міцелій зі слабкою пелетизацією. питома початкова швидкість росту міцелію складає $0,35 \text{ год}^{-1}$, в кінці культивування $0,1 \text{ год}^{-1}$.

P. piscarium є факультативним тонофілом. Його зростання відбувається в межах таких температур $8-42^{\circ}\text{C}$ з оптимумом при $25-28^{\circ}\text{C}$. Цей вид може витримувати нагрівання до 70°C протягом 30 хвилин. Також цей вид грибів являється факультативним ацидофілом (невибагливим до кислого середовища), нормально розвивається на ґрунтах при рН близько 2. Аналіз ДНК показує що штам має 49,5-50 GC вмісту [8].

Загальні морфолого-культуральні ознаки роблять його досить схожим на інші види роду *Penicillium*. Має округлі колонії 3-5 мм в діаметрі, в залежності від щільності посіву, можуть досягати 11 мм в діаметрі (див. *Рис.2.1.3*). Поверхня колоній слабо шорстка, пухка, консистенція м'яка. Повітряний міцелій має колір від білосніжно-білого до сірувато-зеленого. Тривалість розвитку гриба становить 36-40 днів. Репродуктивними органами є конідієносці з конідіями(спори), можливе також вегетативне розмноження(частинами міцелію). Конідії еліптичні в деяких штамів сферичні, гладкі.

При рості на МА(25°C) діаметр колоній досягає 36 мм на 7 добу росту. Колонії рівні, щільні з випуклим центром. Міцелій світлий, пухкий. Зворотна сторона палево-червонувато-оранжева, іноді жовтувата.

Колонії на СҮА на 7 добу мають 27-30 мм в діаметрі, складчасті, з рівним краєм, поверхня шорстка. Міцелій світлий, жовтуватий. Зворотня сторона палево-оранжева, іноді блідо-рожеве. Іноді колонії бархатисті.

При культивуванні на агарі Чапека(37°C) колонії мають 18 мм в діаметрі, складчасті, середньої щільності, зворотна сторона коливається від блідо-рожевого кольору до буро-червоного чи іноді коричнево-червоного. Також при рості на цьому середовищі, старі культури мають стійкий неприємний запах. Гриб не росте на середовищі з гліцерином і на агарі Чапека при 5°C.

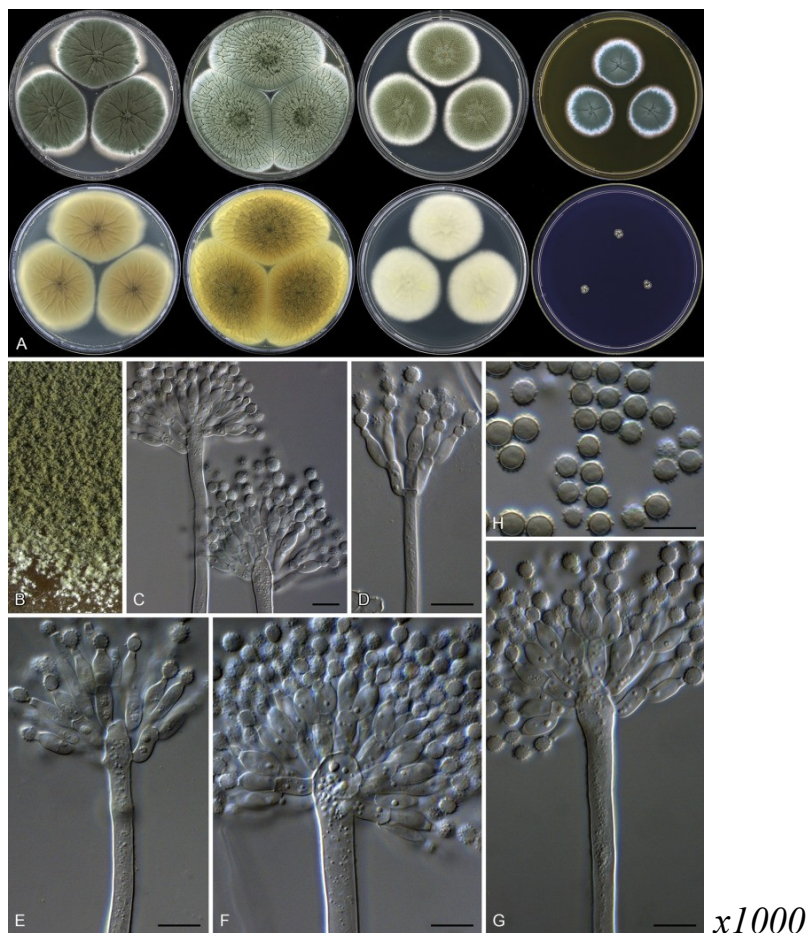


Рис.2.3.1. Вигляд *P. piscarium* в світловому мікроскопі [9]

2.3.2. Фізіолого-біохімічні ознаки

Так як всі гриби являються гетеротрофами, *P. piscarium* не є виключенням, для своєї життєдіяльності в якості джерела вуглецю він використовує [10]:

- глюкозу, сахарозу, мальтозу, крохмаль або галактозу.

В якості джерела азоту:

- гліцин, аспарагін, нітрат натрію чи калій нітрат.

Крім цього він може розкладати такі сполуки:

- саліцин з виходом бета-глюкозидази;
- декстран з виходом декстранази;

- целобіозу, ксилан, 1,2-бета-глюкан;
- манозу, глюкозу, крохмаль з виходом екзо-1,3-альфа-глюканази та бета-манозидази;

- вуглеводні;
- поліуретани(термопластичні смоли);

Також гриб може синтезувати багато органічних, корисних для людини сполук:

- оцтова-3-індол кислота;
- карбоксипептидазна кислота;
- антибіотики з невисокими бактерицидними та фунгіцидними властивостями;
- целюлази(1-бета-глюкозидаза, 2,1,4-бетаглюкан целлобіогідролаза, 3,1,4-бетаглюкан-глюканогідролаза);
- холестерин та інші стерини;
- гібереліни;
- парулін(мікотоксин);
- вортманнін.

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Згідно нової систематики даний вид розташований так [11]:

Царство	Гриби
Відділ	Аскоміцети
Клас	<i>Eurotiomycetes</i>
Порядок	<i>Eurotiales</i>
Родина	<i>Trichocomaceae</i>
Рід	<i>Penicillium</i>
Вид	<i>piscarium</i>

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба у цільовому продукті

Як вже було сказано, декстранази є полідисперсними і в основному не підходять для технічних застосувань. Однак ферментативно оброблені фракціоновані декстранази становлять значну комерційну зацікавленість до косметичних засобів, лікарських препаратів і вакцин в якості кріопротекторів і стабілізаторів в харчовій промисловості. Крім використання декстраназ для обробки декстранів, самі ферменти набувають все більшого значення в харчовій (пивоваріння, цукрове виробництво), стоматологічній (ефективний проти карієсу), хімічній промисловості (миючі засоби), текстильній та паперовій промисловості. Також декстранази слугують основою для отримання молекулярних сит (Сефадекс) [2].

Стоматологія, галузь медицини яка потребує великої кількості ферментів декстраназ. Декстраназа і мутаназа гідролізують полісахариди, синтезовані карієсогенними мікроорганізмами, а також розривають ланцюги декстрану, що виникають під дією стрептококів, з наступним утворенням водорозчинних сполук. Ферменти в пастах застосовуються як самостійно, так і в комплексі один з одним. Концентрація ферментів регулюється в залежності від їх активності. Типовим представником ферментвмісних лікувально-профілактичних зубних паст є "Пепсодент". Саме ферментвмісні зубні пасти рекомендується використовувати для гігієни порожнини рота при лікуванні хвороб пародонта і слизової оболонки порожнини рота в період загострення [3].

Згідно з результатами досліджень Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), причиною високої поширеності карієсу є порушення гігієнічного догляду за порожниною рота. З метою вивчення світових тенденцій захворюваності на карієс та інші стоматологічні хвороби в штаб-квартирі ВООЗ у 1969 році був створений Глобальний банк даних стоматологічного здоров'я, куди подаються дані епідеміологічних досліджень, проведених у різних країнах світу.

					НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Харченко О.В.			РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					18	120
Реценз.								20
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

У 2012 році ВООЗ повідомила, що 60–90 % дітей шкільного віку в усьому світі мають карієс [3].

Для визначення рівня захворюваності на нього, згідно з рекомендаціями ВООЗ, використовують показники поширеності та інтенсивності карієсу. Поширеність карієсу — це відсоток осіб, які мають каріозні, пломбовані та видалені зуби, а інтенсивність — це середнє число уражених карієсом зубів на одного обстеженого, яку вираховують за допомогою індексів КПВ (К — карієс, П — пломба, В — видалений постійний зуб) — для постійного прикусу, кп (к — карієс, п — пломба) — для тимчасового, КПВ + кп — для змінного [12].

Аналіз, проведений ВООЗ, виявив, що існує значна варіабельність показників інтенсивності карієсу: при обстеженні 12-річних дітей різних країн, навіть при високих чи дуже високих значеннях індексу КПВ, частина з них не мала карієсу [13].

Також привертає увагу значна відмінність показників карієсу не лише у різних регіонах проживання, але й серед жителів одного міста. Середні значення КПВ не дають можливості точно оцінити тяжкість ураження карієсом у цих групах населення та, відповідно, не створюють передумов для розробки ефективних карієспрофілактичних програм для таких хворих. Для більш точної інформації про середнє значення інтенсивності карієсу, щоб привернути увагу до осіб із високим рівнем ураження зубів карієсом, шведськими вченими (М. Nishi, D. Bratthall, J. Stjernswärd) у 2000 році було запропоновано індекс «найвища інтенсивність карієсу» (HIK, Significant Caries Index), що являє собою середню інтенсивність карієсу серед третини усіх обстежених, у яких зареєстровано найвище значення інтенсивності карієсу зубів [14,15,16].

Було обстежено 1106 дітей віком від 11 до 17 років (527 хлопців та 579 дівчат), які проживають у різних регіонах України, серед яких виділено такі вікові групи: 10–11, 12–14 та 15–17 років (див. таб. 3.1). Проведено стоматологічне обстеження 417 дітей (182 хлопців та 235 дівчат), які мешкають у регіонах промислового забруднення (міста Запоріжжя, Маріуполь та Оленівка Донецької обл.) — I група, а також 689 дітей (345 хлопців та 344 дівчини), які мешкають у фтордефіцитних районах Закарпатської області (м. Виноградів, смт Великий Бичків, с. Кобилецька Поляна та смт Дубове) — II група (див. таб. 3.2). Результати обстеження заносились

у реєстраційні карти, розроблені на основі карти ВООЗ для оцінки стоматологічного статусу. За даними реєстраційних карт визначали поширеність та інтенсивність карієсу. У 10–11-річних дітей (молодший шкільний вік) проводилось визначення індексів КПВ і КПВ + кп, у 12–14-річних (середній шкільний вік) та 15–17-річних (старший шкільний вік) ураховувалось ураження лише постійних зубів — визначався індекс КПВ [12,17,18].

Таблиця 3.1

Розподіл дітей за віком та місцем проживання

Вік, років	І група (міста Запоріжжя, Маріуполь та Оленівка Донецької обл.)		ІІ група (м. Виноградів, смт Великий Бичків, с. Кобилецька Поляна та смт Дубове)		Всього	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
10-11	70	6,3	203	18,4	328	24,7
12-14	200	18,1	282	25,5	567	43,6
15-17	147	13,3	204	18,4	411	31,7
Разом	417	37,7	689	62,3	1306	100

Таблиця 3.2

Поширеність карієсу зубів у дітей різних регіонів України, %

Групи обстежених	Вік, років		
	10-11	12-14	15-17
I	81,4	86,5	89,9
II	95,6	98,6	99,5

Отримані результати вказують на недостатню лікувально-профілактичну роботу та необхідність активації заходів, спрямованих на первинну та вторинну профілактику карієсу зубів. Для профілактики карієсу зубів використовують спеціальні ферментовмісні зубні пасти, такі як “Biotene”, “ First Teeth ”. Для профілактики карієсу і гінгівіту рекомендують застосовувати також декстраліз - препарат, який містить у якості активного діючого компоненту декстраназу. Вона

інтенсивно гідролізує декстрин зубного нальоту, має виражену антибактеріальну дію і високий протикаріозний ефект і поверхня зубів стає гладкою[7].

Декстраназу, також, використовують у цукровому виробництві. Численні дослідження протягом останніх років показали, що сировина у бурякоцукровому виробництві з мікробіологічної точки зору може мати три типи ураження: бактеріями роду *Leuconostoc* (з утворенням декстрану), слизовим бактеріозом і ураження гнилями. На бурякоцукрових заводах України, як правило, зустрічаються всі три типи ураження в комплексі, але з переважною часткою того чи іншого типу. Ймовірність ураження значною мірою залежить від місця розташування цукрового заводу. Перший тип ураження – бактеріями роду *Leuconostoc* – найчастіше зустрічається в південних та південно-західних областях країни. Для цих регіонів характерна відносно висока температура під час збирання цукрових буряків у поєднанні з дощами. Зараження ґрунтів лейконоостоком також є основним фактором ризику виникнення цього типу хвороб буряків. Що стосується власне декстрану, то його утворюють бактерії роду *Leuconostoc* (*L. mesenteroides* і *L. dextransicum*) – неспороутворюючі, факультативно-анаеробні коки, які мають форму ланцюжків. Характерною особливістю їх є здатність активно перетворювати сахарозу, глюкозу, фруктозу і рафінозу в декстран. Декстран – полісахарид, розгалужений полімер глюкози із α -1,6- та α -1,3- зв'язками. Залежно від ступеня полімерності декстран зустрічається в двох аморфних станах: у вигляді геля або желе та у вигляді ущільнених конгломератів (кльока). Низькомолекулярний декстран, розчинений в дифузійному соку, дає дуже в'язкі розчини гелю.

Високомолекулярний декстран при контакті з повітрям набуває різноманітних форм кльока – у вигляді «рисових зерен», «волокон» в дифузійному соку. На пульпоуловлювачах утворюються щільні плівки молочно-білого кольору. На поверхнях обладнання і в комунікаціях заводу зустрічаються масивні слизові утворення, які схожі на жаб'ячу ікру. Характерною особливістю ураження лейконоостоками є його проходження без симптомів на перших двох стадіях. На останніх стадіях, коли підприємство повністю уражено, відбувається швидке наростання проблем при очищенні і фільтруванні соків та в кристалізаційному

відділенні. На ранніх стадіях лейконостоки слабо продукують декстран, з цієї причини ранні стадії ураження залишаються для технолога непомітними і не дають можливості своєчасно та оперативно побороти інфекцію на верстаті заводу [19].

Отже, обираємо галузь виробництва зубних паст, де за допомогою додавання декстранази виробляють ферментвмісні зубні пасти для боротьби з хворобами парадонта. Проблема є і для її вирішення розробимо нову технологію внесення декстранази у зубну пасту у вигляді мікрокапсул.

3.2. Розрахунок потужності виробництва ферменту

Виробництво декстранази буде задовольняти потреби виробників ферментвмісних зубних паст.

На ринку України декстраназа відсутня, потреба виробників зубних паст в ній задовольняється імпортом з Китаю, переважно, компанією “Hunan Hong Ying Xiang Biochemistry”[20].

Незважаючи на поставки ферменту з-за кордону, враховуючи необхідність декстранази для різних галузей виробництва, Україна повинна розробити своє власне виробництво ферменту. Головною проблемою у створенні власного продукту є надзвичайно коштовні витрати на виробництво та малий попит.

Для боротьби з декстраном відносно часто застосовують фермент декстраназу, який додають у зубні пасти.

За результатами 2018/2019 років в Україні виготовлено 94 т зубної пасти, з них, лише 5 т тієї, що містить декстраназу. Ми будемо забезпечувати декстраназою лише двох передових українських виробників: компанії “Биокон” і “Пирана” тобто, 7,5 тис. упаковок зубної пасти, кожна вагою 100 г. Провівши аналіз кількісного складу ферментвмісних зубних паст встановлено, що на 100 г зубної пасти йде 5 тис. одиниць ферменту декстранази (17.24 л культуральної рідини).

Знаючи синтезувальну здатність продуцента *Penicillium piscarium* БИМ Г-102, можемо розрахувати кількість культуральної рідини, яку необхідно одержати, щоб забезпечити потреби двох виробників пасти на рік.

Кількість культуральної рідини, необхідної для отримання тієї кількості декстранази якої вистачить для виготовлення 7,5 тис. упаковок зубної пасти становить:

$$17,24 \times 7500 = 129300 \text{ л культуральної рідини}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (30 %), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{кр.} = 129300 / (1 - 0.3) = 184800 \text{ л}$$

$$\text{Тобто, } 184715 \times 4,4 = 813 \text{ кг декстранази}$$

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту і геометричного об'єму ферментера

Культивування *Penicillium piscarium* БИМ Г-102 триває протягом 120 годин. Також необхідно враховувати час на підготовку обладнання, що у даному проекті становить 8 годин, а саме: миття та огляд апарату – 1 год, перевірка на герметичність – 30 хв, підігрів апарату – 30 хв, стерилізація апарату – 1 год, охолодження апарату – 1 год 30 хв, завантаження середовища – 2 год 30 хв, засів культури – 0,5 год, звільнення ферментера від культуральної рідини 30 хв. Тому весь процес культивування з урахуванням часу на підготовку обладнання складає $120 + 8 = 128 \text{ год} \approx 5.3 \text{ доби}$.

Знаючи ці дані, можна розрахувати кількість виробничих циклів. Враховуючи те, що виробничий процес у нас триватиме 120 днів (рівно стільки нам потрібно для того щоб забезпечити ринок ферментом), а решта часу буде витратитися на проведення технічного обслуговування цеху, то маємо: $120 / 5.3 \approx 22,6$ циклів, де 120 – кількість робочих календарних днів, а 5.3 – це кількість діб, за яку проходить виробничий процес.

Кількість продукту на добу становитиме:

$$V_d = V_{гп} / T_{рд} = 184,8 / 120 = 1,54 \text{ м}^3$$

Далі необхідно підрахувати об'єм культуральної рідини, який ми отримаємо за один виробничий цикл. Він становитиме: $V_{кр} = (K_1 \times V_d \times T_{цф}) / 24 = (1,1 \times 1,54 \times 128) / 24 = 9,03 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

Оскільки, об'єм культуральної рідини, який нам потрібно отримати за один виробничий цикл складає $9,03 \text{ м}^3$, то ми можемо поставити ферментер з загальним об'ємом 16 м^3 та коефіцієнтом заповнення $0,6$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$K_{зф} = V_{цк} / V_{ф} = 9,03 / 16 = 0,564$, що не значно перевищує заданого значення.

Таким чином, пропонується проект виробництва фермента декстранази, який отримують у результаті культивування *Penicillium piscarium* БИМ Г-102, річна потреба у декстраназі на рік становить 813 кг .

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $9,03 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 15 до 30% .

Розрахуємо втрати культуральної рідини:

$V_{роб.1} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 9,03 / (1 - 0,30) = 12,9 \text{ м}^3$, де $E_{ф}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 12,9 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,5-0,6$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{ф}$), що становить $V_{ф} = V_{роб.1} / K_{зап} = 12,9 / 0,6 = 21,5 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 25 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап1} = V_{роб.1} / V_{сф} = 12,9 / 25 = 0,51.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно. Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити: $V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 12,9 / (1 + 0,1) = 11,7 \text{ м}^3$, де $X_{ф} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера. Кількість посівного матеріалу для ферментера становить $V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 12,9 - 11,7 = 1,2 \text{ м}^3$.

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

Для одержання $1,2 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 15 до 30%.

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

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 1,2 / (1 - 0,10) = 1,33 \text{ м}^3.$$

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

$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 1,33 / (1 + 0,1) = 1,2 \text{ м}^3$, де $X_{\text{па}} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить $V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 1,33 - 1,2 = 0,13 \text{ м}^3$ або 130 л.

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.2}} = 1,33 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування продуцента у посівному апараті геометричним об'ємом $V_{\text{па2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 1,33 / 0,6 = 2,2 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 2,5 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{з1}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф}} = 1,33 / 2,5 = 0,53.$$

3.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури у великому інокуляторі

Для одержання 130 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 15 до 30%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 130 / (1 - 0,3) = 186 \text{ л}.$$

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

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$V_{пс3} = V_{роб.3}/(1+X_{ин}) = 186/(1+0,1) = 169$ л , де $X_{ин} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить $V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 186 - 169 = 17$ л.

Кількість інокуляту $V_{роб.3} = 186$ л можна одержати під час культивування продуцента в інокуляторі геометричним об'ємом $V_{ин3} = V_{роб.3}/K_{зап} = 186/0,6 = 310$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 400$ л , уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.3}/V_{сф} = 186/400 = 0,46$$

3.4.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в малому інокуляторі

Для одержання 17 л посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 15 до 30%.

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

$$V_{роб.4} = V_{пм3}/(1-E_{ин}) = 17/(1-0,3) = 24,3$$
 л.

Кількість посівного матеріалу (доза) для малого інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища в малому інокуляторі

Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде становити :

$V_{пс4} = V_{роб.4}/(1+X_{ин}) = 24,3/(1+0,1) = 22,1$ л , де $X_{ин} = 0,10$ –доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить $V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 24,3 - 22,1 = 2,2$ л.

Кількість інокуляту $V_{роб.4} = 24,3$ л можна одержати під час культивування в малому інокуляторі геометричним об'ємом $V_{ин4} = V_{роб.4}/K_{зап} = 24,3/0,6 = 40,5$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 30$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.4}/V_{сф} = 24,3/30 = 0,81$$

3.4.4. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалках

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{ім4}} = 2,2$ л можна одержати культивуванням продуцента у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}}=0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{ім4}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 2200 / 750 \cdot 0,2 = 14,6.$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 15 колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу декстранази у ферментері об'ємом 25 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи (рис. 3.1).

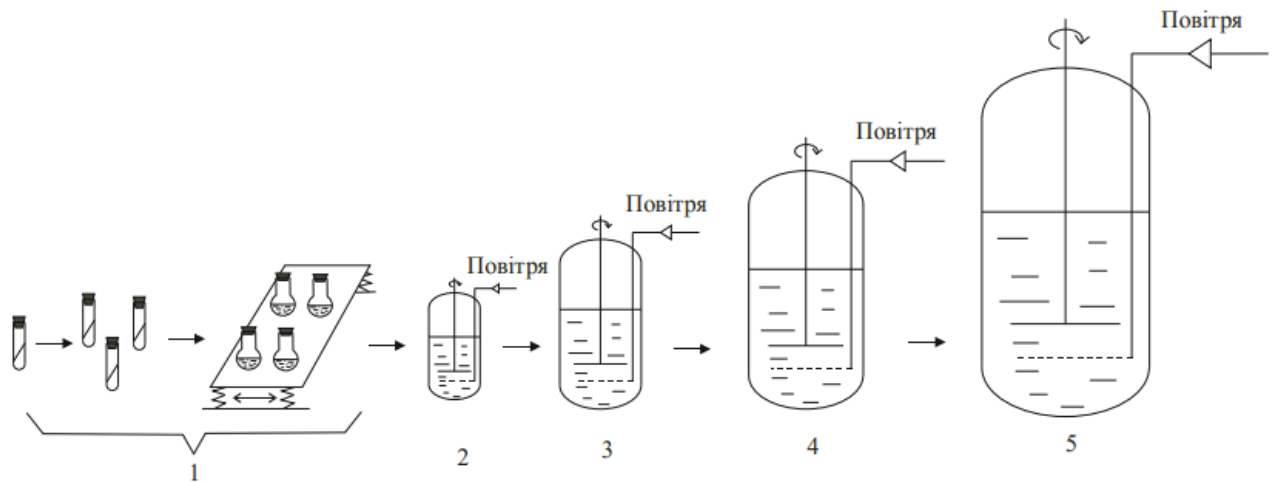


Рис. 3.1. Схема приготування посівного матеріалу *Penicillium piscarium* БИМ Г-102:

1 – вирощування в лабораторії (на скошеному агаризованому середовищі в пробірках і на рідкому поживному середовищі в колбах на качалці); 2–4 – вирощування в інокуляторах та посівному апараті об'ємом (м^3): 2 – 0,03; 3 – 0,4; 4 – 2,5; 5 – виробничий біосинтез 25 м^3 .

Таким чином, за результатами розрахунків для біосинтезу декстранази приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом 25 м^3 , один посівний апарат об'ємом $2,5 \text{ м}^3$, один великий інокулятор об'ємом $0,4 \text{ м}^3$ і один малий інокулятор об'ємом 30 л.

РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту

4.1. Катаболізм ростового субстрату

Біологічний агент споживає досить широкий спектр органічних речовин, серед яких: амінокислоти, жирні кислоти та вуглеводи. Але основним джерелом вуглецю є цукри. Пентозо-монофосфатний шлях виявився переважаючим у вуглеводному метаболізмі *P. piscarium*. Гриб здатен утворювати ферменти (декстрангідролази, глюкодекстрани, екзоізомальтогідролази, екзоізомальтотріогідрози і розгалужені декстран-екзо-1,2- α -глюкозидази) які розщеплюють полісахариди до глюкози, яка потім залучається до катаболізму за гліколітичним шляхом (див. додаток 1).

Ендодекстраназа з *Penicillium* розкладає циклодекстрини на ізомальтози і глюкозу. У процесі гліколізу утворюються дві молекули пірувату, які потім залучаються до циклу трикарбонових кислот (ЦТК) або на конструктивний метаболізм [2,21].

Для даного біологічного агента характерний повний ЦТК. Піруват окиснюється до ацетил-КоА завдяки ферменту піруватдегідрогеназа. Далі відбувається ряд перетворень з перенесенням відновлювальних еквівалентів на НАД, НАДФ і ФАД, та перетворення сукциніл-КоА на сукцинат ферментом сукцинаттіокіназою, яке спряжено з виділенням молекули АТФ [2].

Катаболізм глюкози у *P. piscarium* йде шляхом Ембдена-Мєєргофа-Парнаса, тобто через гліколіз (рис 4.1).

					НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Харченко О.В.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Старовойтова С.О.				28	120
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту					30		

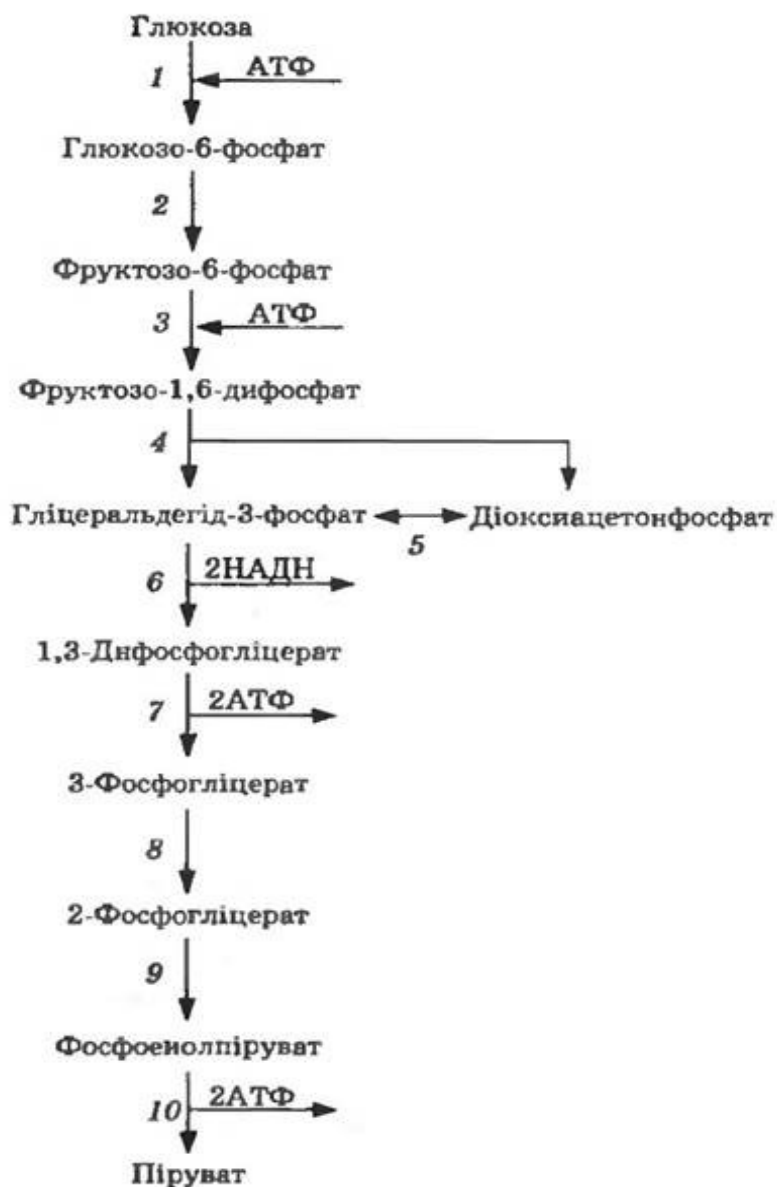


Рис 4.1. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Месейргофа-Парнаса [22]

Ферменти:

- 1 – глюконокіназа (КФ.2.7.1.1);
- 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9);
- 3 – фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11);
- 4 – фруктозодифосфатальдоза (КФ.4.1.2.13);
- 5 – триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1);
- 6 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12);
- 7 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3);
- 8 – фосфогліцератфосфомутаза (КФ.5.4.2.12);
- 9 – енолаза (КФ.4.2.1.11);
- 10 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *P. piscarium* з використанням декстрана як джерела вуглецю, внаслідок катаболізму, утворюється ацетил-КоА. Далі, ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Інформація стосовно амінокислотного складу білків з яких складається фермент відсутня, тому в схемі будуть зазначені всі амінокислоти.

Глюкозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу, в якому утворюються попередники ароматичних амінокислот – фосфорибозилпірофосфат (попередник гістидину) і еритрозо-4-фосфат. Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват – попередники фенілаланіну, тирозину і триптофану.

Амінокислоти аспартатної родини (аспартат, аспарагін, метіонін, треонін, ізолейцин) утворюються з оксалоацетату, який є інтермедіатом ЦТК.

Амінокислоти глутаматної родини (глутамат, глутамін, пролін, аргінін) утворюються з 2-оксоглутарату (інтермедіату ЦТК).

3-Фосфогліцерат є попередником серину, гліцину і цистеїну. Піруват – попередник аланіну, валіну і лейцину. Піруват утворюється з фосфоенолпірувату за допомогою піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

З 2-оксоглутарату і ацетил-КоА за допомогою гомоцитратсинтази (КФ 2.3.3.14) утворюється гомоцитрат, який далі за участю гомоаконітази (КФ 4.2.1.-), гомоаконітатгідратази (КФ 4.2.1.36), гомоізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.87), 2-аміноадипаттрансамінази (КФ 2.6.1.39) перетворюється на 2-аміноадипінову кислоту, з якої за допомогою L-2-аміноадипатредуктази (КФ 1.2.1.95), сахаропіндегідрогенази (НАДФ+ залежної) (КФ 1.5.1.10), сахаропіндегідрогенази (НАД+ залежної) (КФ 1.5.1.7) утворюється лізин.

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування

Для культивування недосконалих грибів *P. piscarium* БИМ Г-102 оптимальною температурою є 24°C, а оптимальним значенням рН 5. Такі умови є сприятливими для розвитку багатьох представників роду *Penicilium*. Середовище для вирощування цих мікроскопічних грибів містить кукурудзяний екстракт і декстран, тому є складним, що так само сприяє спробам розвитку на ньому різноманітних мікроорганізмів [5]. Ці фактори зумовлюють культивування *P. piscarium* БИМ Г-102 в стерильних умовах.

Для одержання продуктів життєдіяльності мікроорганізмів використовують методи глибинного чи поверхневого культивування.

Глибинний метод культивування полягає у вирощуванні мікроорганізмів в рідкому живильному середовищі. Він технічно більш досконалий, ніж поверхневий, так як легко піддається механізації і автоматизації.

Метод глибинного культивування відрізняється від поверхневого тим, що мікроорганізми-продуценти вирощуються не на поверхні поживного середовища, а у всій її товщі. Здійснюється глибинне культивування в спеціальних апаратах – ферментаторах, забезпечених мішалками і системою підведення стерильного повітря для забезпечення зростання аеробних мікроорганізмів [23].

Глибинне культивування має ряд переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно зменшити виробничі площі, виключити тяжку ручну працю, покращити гігієну праці, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва, робить можливий перехід на безперервний спосіб культивування. При глибинному способі культивування більш раціонально використовуються поживні середовища, що дає можливість більше зменшити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів та отримувати більш активні ферменти [24].

					НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Харченко О.В.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Старовойтова С.О.				31	120
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми					33		

Оскільки для синтезу ферменту декстранази, який виділяється в поживне середовище, необхідним є накопичення біомаси, методом культивування обирається глибинний, а не поверхневий.

Гриб *P. piscarium* БИМ Г-102 є облигатним аеробом, що вимагає аерації середовища в процесі культивування.

Постійне оновлення середовища під час безперервного культивування не дасть клітинам досягнути стаціонарної фази, під час якої відбувається максимальний синтез ферментів. Таким чином, періодичне культивування дасть можливість досягнути максимальної концентрації біомаси в культуральній рідині [23].

Отже, для виробничого біосинтезу ферментів декстраназ грибами *P. piscarium* БИМ Г-102 використовують глибинний метод культивування періодичним способом, що відбувається в стерильних умовах при аерації середовища.

5.1.2. Обґрунтування типу ферментера

Ферментери, або біореактори, є камери, у яких в рідкій або на твердому середовищі вирощують мікроорганізми. Оскільки саме в них відбувається біосинтез цільових продуктів, то їх якість і надійність визначають продуктивність усього технологічного процесу. Тип ферментерів для кожного біотехнологічного процесу вибирають з урахуванням специфіки продуцента, властивостей середовища та економічних міркувань. Тому для культивування *P. piscarium* БИМ Г-102 обрано глибинний періодичний спосіб культивування – у ферментері, в якому забезпечується аерація та перемішування поживного середовища.

Оскільки в процесі біосинтезу відбувається утворення міцелію, пропонується використовувати апарати з пневматичним перемішуванням (аерліфтний реактор), у якому ступінь аерації буде дорівнювати 2 л/л·хв, тому, що у такого типу апаратах мішалки відсутні і перемішування рідини здійснюється бульбашками газу. Біореактори з пневматичним перемішуванням характеризуються більш м'яким (плавним) перемішуванням вмісту [24].

5.1.3. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Аеробним мікроорганізмам, зокрема *P. piscarium* БИМ Г-102 під час виробничого процесу необхідна аерація. Враховуючи це, ми повинні під час

підготовки виробництва виокремити стадію підготовки очищеного аераційного повітря, яке виступає потенційним джерелом забруднення культуральної рідини і відповідно всього виробничого процесу [25, 26].

Забір атмосферного повітря здійснюється турбокомпресором через забірну шахту на висоті двох метрів над рівнем даху будівлі. Оскільки висота ферментера становить 3 м, то висота виробничої будівлі становить 8 м (6 м – висота стін, 0,5 м – фундамент, 1,5 м – дах), атмосферне повітря відбирається на висоті 10 м.

Найпростіший спосіб стерилізації повітря полягає у фізичному видаленні мікроорганізмів фільтрацією через волокнисті або мембранні фільтри. Процес підготовки очищеного аераційного повітря включає декілька стадій, а саме: забір повітря з атмосфери, попереднє очищення, стиснення повітря, стабілізацію термодинамічних показників, очищення на головних та індивідуальних фільтрах. За такого способу очищення вдається одержати повітря зі ступенем чистоти 99,9999 %. У результаті попереднього очищення аераційного повітря, яке відбувається на фільтрах грубого очищення, нам вдається отримати повітря з ступенем чистоти 80%. Очищення на головних фільтрах дає змогу отримати повітря з 95-99% ступенем чистоти, а на індивідуальних – 99,9999 % [25, 26, 27].

Матеріалом для фільтрів грубої очистки повітря може бути базальтове грубе волокно, скловата, лавсан, поліпропілен, полівінілхлорид та ін. Також використовують металокерамічні фільтри з нержавіючої сталі та титану. Саме такі фільтри є найбільш ефективними (90–95 %), оскільки мають здатність витримувати температуру до 700 °С, а швидкість фільтрування становить 0,1 м/с.

У представленому проекті запропоновано використовувати фільтри грубого очищення типу ФВП [27].

ФВП – це ячейкові повітряні фільтри, які призначені для очищення повітря від пилу в різних технологічних системах. Ступінь очищення повітря даними фільтрами становить близько 80 %.

Ці фільтри складаються з металевого каркасу, в який вставляють касети з скловолокна. Продуктивність по повітрю кожного фільтра не більше 7600 м³/год.

Для збільшення продуктивності фільтрів до необхідної величини, каркаси фільтрів скручують між собою і вставляють в загальну панель.

Для індивідуального очищення повітря пропонується використовувати фільтри типу ХР4, які випускає німецька фірма «ZANDER» (рис.5.1). Такі фільтри складаються з корпусу і фільтруючого матеріалу (фторопласту), який дає змогу уловлювати частинки розміром 0,04–0,06 мкм [28].

Фільтруючі елементи фторопластових фільтрів виготовляються з фторопласту-4 (тефлону) шляхом формувань під тиском і спіканням в виробничо-заданої форми і розмірів.

Відпрацьоване повітря через колектори подається на головні фільтри для очищення та знешкодження. У разі невеликих витрат повітря такі фільтри встановлюють безпосередньо на ферментері, тому запропоновано використовувати фільтри типу НЕРА класу Н14, зі ступенем очищення 99.995% з ультра і мікро тонких скляних волокон.



Рис. 5.1. Фільтр типу ХР4

Отже, характеристика та будова фторопластових фільтрів повністю задовольняє дане біотехнологічне виробництво та забезпечує стерильність аераційного повітря.

5.1.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Об'єкти дослідження: обладнання, інвентар, комунікації, тара, стіни, підлога, вікна та двері.

Миючі засоби застосовуються для санітарної обробки обладнання та комунікацій, приміщень, інвентарю та ін. Вони повинні бути нешкідливими та

хімічно стійкими, оскільки за допомогою них відбувається звільнення обладнання, різних поверхонь, стін, стель від забруднень різного типу, а саме: жирових, механічних та білкових [29].

Розглянемо деякі миючі засоби, що використовуються у біотехнологічному виробництві.

Каустична сода (NaOH) – біла, тверда, гігроскопічна речовина, яка добре розчиняється у воді. Розчини каустичної соди добре омилують жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. При зменшенні температури розчинів до (45 ± 5) °С їх мийна здатність різко падає. Розчини даної соди викликають корозію [29].

Для миття технологічного обладнання рекомендується використовувати 1–2 % розчини каустичної соди температурою 45 ± 5 °С, а для циркуляційного 1–2 % розчини при температурі 55 ± 5 °С.

Термін зберігання 1 рік з дати виготовлення, у щільно закритій тарі, в недоступному для дітей та тварин місці.

Біосан – концентрований, прозорий, рідкий миючий засіб з характерним запахом. Даний миючий засіб ефективно видаляє застарілі відкладення, вапняний наліт та іржу. При правильному застосуванні не руйнує оброблювані поверхні, не містить абразивів. Видаляє неприємні запахи. «Біосан» не розкладається з виділенням шкідливих речовин та є негорючою рідиною, яка навіть при розморожуванні зберігає миючу здатність. При потраплянні на шкіру та слизові оболонки ока викликає хімічні опіки. Рекомендується використовувати 1 % розчин «Біосан» для миття обладнання та інвентарю. Даний миючий засіб належить до речовин другого класу небезпеки (по ГОСТ 12.1.007–76).

Гарантійний термін зберігання 2 роки з дати виготовлення. Миючий засіб «Біосан» зберігають у темному прохолодному місці при температурі від +10 до +20 °С, у щільно закритих ємності в місцях, недоступних для дітей. Не допускається тривале заморожування і перегрів розчину [30].

Біомой – це багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб, який являє собою порошок, світлих тонів, проте допускається присутність забарвлених включень ензимів. Добре розчиняється у воді (розчинність не менше 30

г/дм³).

Робочі розчини «**Біомою**» безбарвні, не ушкоджують оброблювані поверхні обладнання та інвентарю і володіють вираженими емульгуючими і миючими властивостями, легко видаляють білково-жирову плівку, добре змиваються, не залишаючи нальоту на оброблених поверхнях. Даний миючий засіб не містить синтетичні поверхнево-активні речовини [31].

На відміну від інших засобів, «**Біомой**» виявляє високу миючу активність при температурі не вище (40 ± 5) °С. Його розчини не ушкоджують об'єкти з нержавіючої сталі, чорного металу з антикорозійним покриттям, алюмінію, скла, гуми, полімерних матеріалів, кахлю, емалі.

Рекомендується використовувати 0,5 % розчин «**Біомою**» температурою (40 ± 5) °С для миття технологічного устаткування, скляної і полімерної тари та інвентарю, а також $(0,15-0,3)$ % розчини температурою (40 ± 5) °С для циркуляційного миття технологічного обладнання і комунікацій та миття скляної і полімерної тари [29,31].

«**Біомой**» належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007–76) при попаданні в шлунок і на шкіру не проявляють кумулятивних, шкіроподразнюючих і сенсебілізуєчих властивостей. У концентраціях рекомендованих до застосування $(0,15-0,5 \%)$, не подразнює слизову оболонку очей.

Завдяки вдало збалансованій рецептурі, яка включає ряд миючих компонентів та ферментів з високою протеолітичною активністю «**Біомой**» має виражені властивості по очищенню поверхонь, які обробляються, від жирів та білків.

Термін придатності 1 рік з дати виготовлення [31].

Супераль К – це концентрований кислотно-миючий засіб, який призначений для видалення органічних і неорганічних (іржа, вапняний наліт, молочний камінь, сольові відкладення) забруднень з емностей, обладнання, підлог, стін, виробничих приміщень на підприємствах харчової промисловості [32].

До складу даного миючого засобу входять: ПАР, суміш органічних та неорганічних кислот, інгібітор корозії, комплексоутворювачі. Даний засіб не викликає пошкодження гуми, алюмінію і поверхонь, але за умови дотримання рекомендованого дозування, часу обробки і температурного режиму. Для миття

обладнання готують 0,5% робочий розчин «Супераль К» [32].

Для його виробництва використовуються поверхнево-активні речовини, які посилюють мийні властивості препаратів, комплексоутворювачі, пом'якшувачі води, що зв'язують солі твердості у водорозчинні сполуки, інгібітори корозії, які захищають обладнання від передчасного «зношування», а також спеціальні функціональні домішки, завдяки яким деякі засоби можна використовувати при митті водою низьких температур. Даний миючий розчин за ступенем токсичності належить до 2 класу мало небезпечних по ГОСТ 12.1.007–76.

Термін зберігання миючого засобу «Супераль К» 12 місяців при температурі від –10 до +30⁰С.

Дезактін – дезінфекційний засіб з миючим ефектом. «Дезактін» являє собою порошок від білого кольору із слабким запахом хлору. Розчинність у воді становить не менше 20 мг/дм³. Дезактін має широкий спектр антимікробної активності: бактерицидні (в т.ч. туберкулоцидні), віруліцидні (включаючи парентеріальні вірусні гепатити, ВІЛ-інфекцію, рота-, паповавіруси), фунгіцидні (в т.ч. гриби роду *Candida*) властивості.

Склад засобу, %: дихлорантин – 21,0–23,0; 5,5-діметілгідантоїн – 12,4– 16,4; диспергатор – 9,0–12,0; аніонні поверхнево-активні речовини – 3,2–5,0; інгібітор корозії до 10,0; наповнювач до 100,0. Вміст активного хлору становить не менше 14,0 %.

Засіб належить до речовин 3 класу небезпек по ГОСТ 12.1.007–76. Не виявляє кумулятивних, шкірно-подразнюючих, сенсibiliзуючих властивостей. Для дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері) рекомендується використовувати робочий розчин з концентрацією 0,2 %. Гарантійний термін зберігання 3 роки з дати виготовлення [33].

«Ніка-екстра М Профі» – це прозорий миючо-дезінфікуючий засіб, який володіє антимікробною активністю відносно грамнегативних і грампозитивних (включаючи мікобактерії туберкульозу) мікроорганізмів, вірусів (щодо всіх відомих вірусів-патогенів людини, в тому числі вірусів ентєральних і парентеральних гепатитів (в т.ч. гепатиту, А, В і С), ВІЛ, поліомієліту, аденовірусів, вірусів

«атипової пневмонії» (SARS), «пташиного» грипу H5N1, «свинячого» грипу, грипу людини, герпесу та ін.), анаеробної інфекції.

Склад даного засобу: N, N-біс (3-амінопропіл) додеціламін 0,7 %, дідецилдиметиламоній хлорид 2,7 %, полігексаметиленгуанідин гідрохлорид 0,7 %.

Даний засіб володіє хорошими миючо-дезінфікуючими властивостями, не псує оброблювані об'єкти, не фіксує органічні забруднення, не викликає корозії металів. Засіб зберігає свої властивості після замерзання і подальшого відтавання. Робочі розчини негорючі, пожежо- і вибухобезпечні. За параметрами гострої токсичності по ГОСТ 12.1.007–76 належить до 4 класу мало небезпечних речовин при введенні в шлунок, до 4 класу малонебезпечних речовин при нанесенні на шкіру.

«Ніка-екстра М Профі» має слабку подразнюючу дію при контакті зі шкірою і помірно подразнюючу дію на слизові оболонки ока, не володіє шкіро-резорбтивною і сенсibiliзуючою активностями. Концентрація робочого розчину для дезінфекції приміщення становить 0,5 %.

Термін зберігання 3 роки, робочих розчинів – 28 діб за умови їх зберігання у закритих ємностях [34].

Клорсепт 25 – це миючо-дезінфікуючий засіб, що має бактерицидну (у тому числі туберкулоцидну), віруліцидну (у тому числі відносно вірусів гепатиту В і ВІЛ) і фунгіцидну (кандидози та дерматомікози) дії [35].

За параметрами гострої токсичності «Клорсепт 25» відноситься до 3 класу помірно-небезпечних речовин (ГОСТ 12.1.007–76) при введенні в шлунок, має слабку місцево-подразнюючу дію на шкіру та слизові оболонки очей. При використанні робочих розчинів, що містять 0,1 % і більш активного хлору, викликає подразнення органів дихання [35].

Для дезінфекції використовують 0,015–1,5% за активним хлором розчини. Для приготування 0,015% розчину 1 таблетку «Клорсепт 25» розчиняють у 10 л води [35].

Термін придатності «Клорсепт 25» – 3 роки, у захищеному від світла місці, при температурі не вище 20 °С .

Розрахунок витрат миючих та деззасобів

Розрахуємо витрати миючих та дезінфікуючих засобів для прибирання приміщення.

Враховуємо що підприємство має крок колон (6×6 м), звідси обираємо орієнтовну площу виробничого приміщення цеху біосинтезу $18 \times 36 = 648 \text{ м}^2$.

Враховуємо також те, що:

- підлога повністю обробляється миючо-дезінфікуючим засобами;
- стіни, робоча зона 2 м висотою;
- стелі обробляються коли генеральне прибирання, тобто 1 раз на місяць.

Враховуючи висоту стіни 2 м, розрахуємо площу стін $(18 \times 2) + (36 \times 2) = 108 \text{ м}^2$. А оскільки площа двох стін $108 \times 2 = 216 \text{ м}^2$. Загальна площа оброблювальної поверхні становить $648 + 216 = 864 \text{ м}^2$, також потрібно врахувати площу стелі, яка буде проходити стадію дезінфекції лише під час генерального прибирання (1 раз/місяць). Деякі порівняльні характеристики миючих та дезінфікуючих засобів представлено у таблиці 5.1.

Таблиця 5.1.

Порівняльна характеристика дезінфікуючих засобів

Назва де-ззасобу та виробник.	Склад	Спектр дії	Необхідна кількість для обробки 1 м ²	Термін зберігання. Вартість	Ступінь безпеки
1	2	3	4	5	6
«Біомой», "Фармакос", Україна		миття та дезінфекції виробничого обладнання і комунікацій, дезінфекції поверхонь приміщення, санітарно-технічного обладнання, гумових килимків, лабораторного посуду, санітарного	0,5 % розчин для миття технологічного устаткування 0,15–0,3 % розчини для циркуляційного миття технологічного обладнання і комунікацій та миття скляної і полімерної тари	1 рік з дати виготовлення, Термін зберігання робочих розчинів - до 3-х днів. Вартість – 130 грн/л.	мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру (4 клас небезпеки)

		транспорту			
Дезактин, ООО «Делана» (Україна)	Дихлоран-тін - 21,0-23,0; 5,5-диметилгідантоїн - 12,4-16,4; дисперга-тор - 9,0-12,0; аніонні поверхнево-активні речовини - 3,2-5,0; інгібітор корозії 10,0	Засіб володіє бактерицидною (в т.ч. туберкулоцидні), віруліцидні (включаючи парентеральні вірусні гепатити, ВІЛ-інфекцію, ротавіруси), фунгіцидні (в т.ч. гриби роду <i>Candida</i>) властивості	Норма витрати 100 мл робочого розчину на 1 м ² оброблюваної площі. Проти бактеріальних і вірусних інфекцій в 0,1-0,2% при експозиції 60 хв, грибкових інфекцій і туберкульозі в 1% при експозиції 60-90 хв.	Термін зберігання - 3 роки. Термін зберігання робочих розчинів - до 3-х днів. Вартість – 340 грн/л.	Належать до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки) при введенні в шлунок та до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру (4 клас небезпеки).
Каустична сода	Їдкий натр	Для миття та дезінфекції виробничого обладнання і комунікацій	Концентрація робочого розчину – 2%, що еквівалентно 20 г в 1 л води	Строк зберігання – 1 рік з моменту виготовлення. Вартість – 32 грн/кг	Сода каустична (гранульована) - їдка речовина. Необхідна захист шкіри та очей.

Ніка-екстра М Профі	37,5% комплексу чотирьох четвертичних аммонієвих соєдинєний (ЧАС) (алкілдіметилбензіламмоній хлорид – 15,00%, октилдецилдіметиламмоній хлорид – 11,25%, діоктилдіметиламмоній хлорид – 4,50%, дидецилдіметиламмоній хлорид – 6,75%) і 12,5% глутарового альдегіда	дезінфекції поверхонь приміщеннях, санітарно-технічного обладнання, гумових килимків, лабораторного посуду, санітарного транспорту при вірусних, бактеріальних (включаючи туберкульоз) і грибкових (кандидози, дерматофітії) інфекціях лікувально-профілактичних установах та інфекційних вогнищах, а так само для проведення генеральних прибирань	Норма витрати розчину засобу при протиранні - 100 мл / м ² поверхні. Концентрація робочого розчину – 0,4%, що еквівалентно 4 г в 1 л води	Термін придатності: 5 років, для робочих розчинів становить 14 діб за умови зберігання в закритих ємкостях. Вартість – 180 грн/л	належить до 3 класу помірно-небезпечних речовин при введенні в шлунок і 4 класу малонебезпечних з'єднань при одноразовому інгаляційному впливі парів, чинить місцево-подразнюючу дію на шкіру і різко виражене - на слизові оболонки очей.
---------------------	---	---	--	--	--

Отже, проаналізувавши дані можна зробити висновок, що для миття обладнання, інвентарю, комунікацій, тари доцільно використовувати миючий розчин каустичної соди, так як він є найдешевшим миючим засобом, а для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей – «Біомой» та «Ніка-екстра М Профі», так як вони є миючо-дезінфікуючими засобами, то це дозволить значно заощадити кошти. Дані засоби використовують з інтервалом в 3 місяці, що дозволяє запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів.

5.1.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для стерилізації поживних середовищ можливе використання різноманітних методів, наприклад, використання іонізуючого випромінювання, ультрафіолетового випромінювання, ультразвуку, рентгенівських променів, обробки середовищ різними антисептиками (окис етилену, перекис водню, β-лактон пропіонової кислоти і т. д.).

Ультразвукові хвилі мають бактерицидну дію у відношенні мікроорганізмів. Під його впливом відбувається зміна біохімічної активності бактерій, порушується

проникність клітинних стінок, руйнуються клітинні структури.

Стерилізація з використанням гамма-випромінювання в наш час рідко використовується, тому що при радіаційно-індукуючій гемолітичній дисоціації хімічних зв'язків виникають вільно радикальні стани, які в результаті вторинних пострадіаційних процесів призводять до процесів, відмінних від вихідних речовин, в тому числі і токсичних.

Ультрафіолетовий спосіб стерилізації ґрунтується на використанні хвиль з довжиною хвилі 260 нм, проникаючи через стінку клітини, поглинається ДНК, в результаті чого процес відтворення мікроорганізму зупиняється. Даний метод не дозволяє ефективно забезпечити стерилізацію середовища [17].

Пропоную проводити стерилізацію поживного середовища методом *нагрівання*, який є одним з найрозповсюдженіших методів на сьогоднішній день. Найефективнішим методом теплової стерилізації є безперервна стерилізація. Перевагами даного методу є можливість автоматизованого регулювання процесу, рівномірного і швидкого прогріву середовища, збереження вихідних властивостей, компактності установки і зручності її обслуговування. Стерилізація системи безперервної стерилізації поживного середовища проводиться гострим паром при температурі 125-130 °С і тиску 0,15-0,18 МПа [17].

Окремі компоненти поживних середовищ по-різному реагують на термічний вплив. Відомо, що оліго- і полісахариди при певних умовах піддаються частковому гідролізу. Ступінь гідролізу залежить від джерела вуглеводу, температури і тривалості термічного впливу, рН середовища. Нагрівання їх при температурах вище 100 °С і тривала витримка призводять до карамелізації – конденсації з відщепленням 2-х і більше молекул H₂O з утворенням забарвлених продуктів. Глюкоза при нагріванні в лужному середовищі піддається ізомеризації в фруктозу. Саме тому дані компоненти стерилізуються окремо. Стерилізацію проводять при наступних умовах: $t = 112 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,05 \text{ МПа}$, тривалість – 0,5 год. Процес здійснюється в окремому апараті. Стерилізація проводиться періодичним способом протягом години після досягнення 112 °С. По закінченню стерилізації середовище охолоджується до 27 °С подачею холодної води в сорочку апарата [17].

Якщо до складу середовища входять термолабільні компоненти, вони стерилізуються окремо в умовах більш м'якого режиму, і після стерилізації подаються у ферментер [17].

Отже, пропонується всі компоненти поживного середовища розділити на окремі композиції (табл. 5.2, 5.3). Розчин кукурудзяного екстракту готують окремо і поміщують у термостат.

Таблиця 5.2

**Склад композицій поживного середовища для накопичення біомаси
продуцента *P. piscarium* БИМ Г-102**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Композиція
Декстран	10	1
Кукурудзяний екстракт	5	
NaNO ₃	3	2
KH ₂ PO ₄	1	
KCl	0,5	
MgSO ₄	0,5	3

Композиція №1: режим стерилізації 112 °С, 30 хв.

Композиція №2: режим стерилізації 131 °С, 40 хв.

Композиція №3: режим стерилізації 131 °С, 40 хв.

Солі композицій 2 і 3 стерилізують окремо для запобігання утворення нерозчинних фосфатів магнію.

5.1.5.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Для цього етапу використовуються колби місткістю 750 мл, які заповнюються 200 мл поживного середовища. Оскільки об'єм середовища невеликий, стерилізація відбувається в автоклаві. Проаналізувавши склад поживного середовища для

вирощування *P. piscarium* БИМ Г-102, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Підготовка розчину кукурудзяного екстракту: На технічних вагах зважують 11 г кукурудзяного екстракту і поміщають в колбу, додають 100 мл питної води і поміщають у термостат на 24 год при температурі 37 °С.

Композиція 1: На технічних вагах зважують 22 г декстрану і поміщають у колбу з розведеним кукурудзяним екстрактом, додають 200 мл питної води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

Композиція 2: KH_2PO_4 , KCl , NaNO_3 - режим стерилізації: 131 °С, 40 хв.

Композиція 3: MgSO_4 - режим стерилізації: 131 °С, 40 хв.

Композиції 1 об'єднують, оскільки вони є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації. Солі композицій 2 і 3 стерилізують окремо для запобігання утворення нерозчинних фосфатів магнію.

Для вирощування інокуляту необхідно 2,2 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 2,2 л середовища наведено в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2,2 л середовища в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 2,2 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Декстран	10	22	1	1600
Кукурудзяний екстракт	5	11		
NaNO_3	3	6,6	2	400
KH_2PO_4	1	2,2		
KCl	0,5	1,1		
MgSO_4	0,5	1,1	3	200

5.1.5.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в малому інокуляторі об'ємом 30 л

22,1 л поживного середовища, необхідного для цієї стадії культивування, треба стерилізувати в інокуляторі, тому що об'єм є надто великим для стерилізації в автоклаві. Для цього необхідно перескласти композиції поживного середовища.

Композиція 1: кукурудзяний екстракт і декстран. Наважку кукурудзяного екстракту попередньо розводять водою в 2-5 разів і витримують у збірнику об'ємом 10 л, 18-24 год при температурі 35-37°C. Після витримання екстракту у збірник подається попередньо зважений декстран - режим стерилізації: 112 °C, 30 хв.

Композиція 2: K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , MgSO_4 - режим стерилізації: 131 °C, 40 хв при $\text{pH} = 4,5$.

Стерилізація **композиції 2** відбувається в апараті, тому що умови стерилізації є жорсткішими, ніж для композиції 1. Солі розводять в окремому збірнику і потім переносять в посівний апарат. На етапі стерилізації даних компонентів поживного середовища необхідно додати розчин титрувального агента (6%-й розчин соляної кислоти). Це обумовлено двома причинами:

По-перше, для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію необхідно понизити pH до рівня 4,5 (при такому значенні pH солі не випадають в осад).

По-друге, продуцент декстранази, *P. piscarium* БИМ Г-102 є ацидофільним мікроорганізмом (оптимальний pH становить 4,5-5,0). Зважаючи на це, немає необхідності доводити pH до значення 7,0 після закінчення стерилізації.

Розрахувати необхідну кількість титрувального агента можна, виходячи з пропорції 2 мл розчину на 1 л середовища.

Отже, для 22,1 л середовища необхідно 45 мл соляної кислоти. Розчин не потребує стерилізації, готується в лабораторних умовах, в стерильній колбі об'ємом 250 мл.

Для вирощування інокуляту необхідно 22,1 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 22,1 л середовища наведено в табл. 5.4.

Таблиця 5.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 22,1 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 22,1 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Декстран	10	221	1	4,1
Кукурудзяний екстракт	5	110,5		
NaNO ₃	3	66,3	2	18
KH ₂ PO ₄	1	22,1		
KCl	0,5	11,05		
MgSO ₄	0,5	11,05		
Вода	-	19,5	-	-
Конденсат	-	2,21	-	-

5.1.5.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в великому інокуляторі об'ємом 400 л

Для об'єму середовища 169 л композиції складаються відповідно до пункту 5.1.5.2. Стерилізація композицій Б та В відбувається відповідно до пункту 5.1.5.2. Для вирощування інокуляту необхідно 169 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 169 л середовища наведено в табл. 5.5.

Таблиця 5.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 169 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 169 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Декстран	10	1690	1	49
Кукурудзяний екстракт	5	845		
NaNO ₃	3	507	2	120
KH ₂ PO ₄	1	169		

KCl	0,5	84,5		
MgSO ₄	0,5	84,5		
Вода	-	149	-	-
Конденсат	-	16,9	-	-

5.1.5.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в посівному апараті об'ємом 2,5 м³

Стерилізація буде відбуватись відповідно до пункту 5.1.5.2. Для стерилізації композиції 1 передбачено використання збірника об'ємом 60 л. Для вирощування інокуляту необхідно 1,2 м³ поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 1,2 м³ середовища наведено в табл. 5.6.

Таблиця 5.6

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1,2 м³ середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 1200 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Декстран	10	12	1	300
Кукурудзяний екстракт	5	6		
NaNO ₃	3	3,6	2	900
KH ₂ PO ₄	1	1,2		
KCl	0,5	0,6		
MgSO ₄	0,5	0,6		
Вода	-	1056	-	-
Конденсат	-	120	-	-

5.1.5.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для УБС

Об'єм середовища становить 11700 л. Оскільки об'єм поживного середовища становить більше 5 м³, з економічної точки зору доцільно провести стерилізацію в

установці безперервної стерилізації УБС-5. Загальний час стерилізації при цьому становить 2,3 год, що в межах норми (1,5-3 год).

Композиція 1: кукурудзяний екстракт, декстран, NaNO_3 , KH_2PO_4 , KCl , MgSO_4 . Для стерилізації в УБС усі компоненти спочатку розчиняються в збірнику 25 м^3 , а потім подаються в реактор–змішувач (16 м^3), що вже є елементом УБС.

Таблиця 5.7

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 11700 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 11700 л середовища, кг	Об'єм композиції, м^3
Декстран	10	117	11,7
Кукурудзяний екстракт	5	58,5	
NaNO_3	3	35,1	
KH_2PO_4	1	11,7	
KCl	0,5	5,85	
MgSO_4	0,5	5,85	
Вода	-	10296	-
Конденсат	-	1170	-

5.2. Обґрунтування стадій виділення та очищення цільового продукту

Даний підрозділ присвячений обґрунтуванню стадій виділення ферменту декстранази, для його застосування при виробництві зубних паст, як ферменту, що каталізує розщеплення α -1,6-зв'язків в бактеріальному полісахариді декстрані.

Основа цільового комерційного продукту – зубної пасти, являється композит зволожувача, консерванту, підсолоджувача, абразиву, барвника та миючого засобу, та ферментних мікрокапсул. Фермент поставляється на виробництво зубних паст у формі інкапсуляту у альгінатному матриксі й складає 2 % (за масою) або 20 г на 1 кг пасти [36].

Декстранази мають молекулярну масу від 35 до 71 кДа; вони є слабокислими білками. Ізоелектрична точка для всіх грибних декстраназ лежить в діапазоні від 4,0 до 4,6. Для більшості бактеріальних декстраназ оптимальна температура

каталітичної дії 35-37 °С; для грибних продуцентів температура трохи вище - 55-60 °С. Оптимальне значення рН коливається в залежності від виду продуцента від 4,4 до 7,5.

Завданням виробництва ферменту являється максимальне накопичення цільового продукту, його виділення, підтримання стабільності і високої активності.

Цільовий продукт є екзометаболітом і під час синтезу продуцентом *Penicillium piscarium* БИМ Г-102 виділяється у поживне середовище. Після закінчення біосинтезу у культуральній рідині міститься цільовий продукт, клітини продуцента та компоненти поживного середовища.

При виборі методу виділення необхідно враховувати наступні фактори:

1. Фізико-хімічні властивості культуральної рідини;
2. Властивості продукту (термолабільність, стійкість до різних хімічних агентів);
3. Вимоги до кінцевої форми продукту (ступінь чистоти).

5.2.1. Обґрунтування способу відділення біомаси

Культуральна рідина після біосинтезу містить, окрім декстранази, біомасу продуцента і продукти його життєдіяльності. Тому першою стадією для виділення цільового продукту є відділення біомаси продуцента, адже основну увагу для нас становить культуральна рідина, а не біомаса[37].

При отриманні очищених ферментних препаратів нерозчинну частину середовища разом з біомасою продуцента відділяють на фільтрах, центрифугах чи сепараторах.

Центрифугування - це примусове осадження клітин за рахунок зростання дії відцентрових сил.

Даний метод потребує більш дорогого устаткування, ніж фільтрування. Тому він виправдовує себе, якщо: а) суспензія фільтрується повільно; б) поставлене завдання максимального звільнення культуральної рідини від клітин.

Сепарування – це процес розділення змішаних об'ємів сумішей різної густини, емульсій, суспензій твердих частинок або краплинок в газі. Сепарація можлива, якщо розчин має відмінності в характеристиках компонентів у суміші: розмірах або формі твердих частинок, їх масах, густині, коефіцієнтів тертя, міцності, пружності,

змочуваності поверхні, магнітної сприйнятливості, електропровідності, радіоактивності[37].

В даний час фільтруючі системи бувають різного застосування (барабанні, стрічкові, тарілчасті фільтри, вакуум-фільтри, фільтри-преси, мембранні фільтри) засновані на однаковому принципі – затримці біомаси на пористій фільтруючій перегородці. Недоліком способу є налипання клітин на фільтрі, шар яких знижує швидкість потоку рідини в процесі фільтрування. Для фільтрів безперервної дії передбачаються системи автоматичного очищення від біомаси, що забиває пори. Вона може здуватися з поверхні фільтрів стисненим повітрям або віддалятися спеціальними «ножами». Існують також фільтри для багаторазового або одноразового періодичного використання. Наприклад, мембранні фільтри, що дозволяють фільтрувати дуже розбавлені клітинні суспензії. Однак проблемою їх використання є швидка закупорка пір клітинами, білками і іншими колоїдними частинками.

Стрічковий вакуум-фільтр. Фільтр являє собою працюючий під вакуумом апарат безперервної дії, в якому напрямок сили тяжіння і рух фільтрату збігаються. Недоліком є низька ефективність процесу, яка обумовлена невеликою поверхнею фільтрування, наявністю невикористаних зон на фільтрувальній стрічці, досить швидкий знос фільтруючої стрічки, громіздкість апарату, складність герметизації та дороговартість, тому виключаємо використання данного апарату [38].

Сепаратори дозволяють сконцентрувати осад до вологості 60-90%. В останні роки з'явилися спеціальні герметичні сепаратори, що дозволяють вести процес сепарування в автоматизованому режимі, оптимально підібраному для специфічних умов конкретних культуральних рідин.

Сепаратори поділяються на: сепаратор-роздільник, сепаратор-згущувач, сепаратор-прояснювач. Залежно від об'єму є сепаратори з різною системою видалення осаду: з ручним вивантаженням, з періодичним та безперервним[38].

При фільтрації культуральної рідини питомий опір драглистого осаду, що утворюється у процесі є великим. Навіть тонкий шар осаду, що залишається після зрізання ножом, може призвести до різкого зниження швидкості процесу фільтрації.

Для фільтрації традиційно використовуються: фільтрпрес, нутч-фільтр, друк-фільтр, вакуум-фільтр, центрифуги, сепаратори[38].

Автоматичні фільтр-преси ФПАКМ цілком відповідають GMP. Робоча поверхня типових фільтр-пресів: 25...800 м² ; тобто, вони призначені для високопродуктивних процесів. Фільтр споряджений маслонасосною станцією, пультом керування, водонасосною станцією, насосами для відведення фільтрату та промивної рідини, які на схемах не показано.

Недоліки фільтр-преса в значній мірі усунені в конструкції з горизонтальними камерами типу ФПАКМ. Він складається з ряду розташованих одна над іншою горизонтальних фільтрувальних плит, між якими натягнута фільтрувальна тканина . Фільтрувальні плити розміщені між верхньою і нижньою підтримують плитами , а фільтрувальна тканина натягнута на напрямні ролики . Цикл роботи фільтр-преса складається з стиснення плит, фільтрування, промивання і зневоднення осаду, розсовування плит і розвантаження осаду одночасно з переміщенням тканини і її промиванням. Робота фільтр-преса ФПАКМ повністю автоматизована. Ці фільтри мають розвинену систему фільтрів поверхню (на 8 м² площі, займаної установкою, доводиться до 25 м² поверхні, що фільтрує); осад віджимається під тиском 0,8-1,5 МПа і має вологість не більше 60-70%; порівняно невеликі енерговитрати (0,8-1 кВт-ч на 1 м² поверхні, що фільтрує); питома продуктивність його в 6-8 разів вище, ніж у інших фільтр-пресів [втрати активності не перевищують 4-5%]. Установки ФПАКМ випускаються з площею поверхні, що фільтрує від 2,5 до 50 м²[38,39].

Таблиця 5.8.

Порівняльна характеристика методів відділення біомаси

Назва методу	Переваги	Недоліки	Джерело
Центрифугування	Висока продуктивність, ефективність розділення неоднорідних систем, можливість	Складність конструкції промислових центрифуг, висока вартість та енергоємність,	[38,39]

	отримати чисту надосадову рідину, незабруднену фільтратом	складність герметизації та асептики, нагрівання мікроорганізмів.	
Сепарування	Можливість автоматизації, висока ефективність	Висока вартість, складність конструкції	[40]
Фільтрація	Невисока енергозатратність, простота конструкції, невисока вартість компонентів	Налипання клітин на фільтрі, порівняно невисока продуктивність	[38]

Оскільки біологічний агент є міцеліальним грибом, то найбільш доцільно відділення біомаси проводити шляхом фільтрування, оскільки міцелій грибів відділяється від рідкої фази без особливих труднощів[41].

Отже, перша стадія для отримання ферменту: осад відокремлюють фільтруванням за допомогою автоматичного фільтр-преса, оскільки, він має малу енергозатратність і достатньо просту конструкцію.

5.2.2. Концентрування

Концентрація - одна з основних стадій технологічного процесу виділення позаклітинних ферментів. При концентруванні ферментів може використовуватись обладнання, що забезпечує випаровування вологи з матеріалу при знижених температурах.

Для того щоб збільшити концентрацію цільового продукту нам потрібно видалити зайву вологу в супернатанті. Потрібно обрати спосіб концентрування. Спосібів концентрування відомо кілька: мембранні, ультрафільтрація, виморожування, випарювання, вакуум-випарюванням[39].

Очищення продукту від домішок (баластних низькомолекулярних домішок та макрочастинок) зумовлене низкою технічних складностей, пов'язаних, в основному,

з нестабільністю (лабільністю) ферментів, втратою активності під впливом незначних змін зовнішніх умов[39].

Випарювання – це технологічний процес концентрування розчинів шляхом виділення розчинника і перетворення його на пару.

Існує три види випарювання: під надлишковим тиском, при атмосферному тиску, під вакуумом.

Випарювання під вакуумом має багато переваг порівняно із випарюванням при атмосферному тиску. При використанні вакуумного способу знижується температура кипіння розчину, що дозволяє ефективно проводити видалення вологи з розчинів термолабільних речовин.

Ферменти дуже чутливі до термічних обробок і потребують м'яких режимів концентрування. При подальших дослідженнях було встановлено, що не тільки температура кипіння концентрованих розчинів має велике значення, але і температура пари, що гріє (теплоносія). Так, навіть при дуже низькій температурі кипіння (25-30 ° С), відбувається помітна інактивація ферментів (до 12%), якщо температура пари, що гріє дорівнює 120 ° С. При температурі теплоносія 90-100 ° С і температурі кипіння 35-40 ° С втрати активності не перевищують 10%. І ще слід зазначити, що чим вище температура теплоносія, тим більше сухих речовин концентрованої рідини випадає в осад, особливо при високих температурах кипіння [40].

Незважаючи на наявність високопродуктивних вакуум-випарних апаратів повністю усунути недоліки методу вакуум-випарювання не вдається (втрати активності, випадання осадів), цей метод все більше замінюється методом ультрафільтрації [40].

Установки для ультрафільтрації за допомогою спеціальних синтетичних напівпроникних мембран, що мають пори відомого розміру, є одними з найбільш сприятливих по відношенню до виділення білків. Крім того, вони відрізняються швидкістю і ефективністю[42].

Переваги ультрафільтрації: м'які умови, очищення від баластних низькомолекулярних домішок, збільшення активності ферменту.

Недоліки ультрафільтрації: забивання пор мембрани, що призводить до зниження продуктивності.

Отже, ми будемо проводити концентрування за допомогою ультрафільтрації.

5.2.3 Інкапсулювання в альгінатний матрикс

Альгінати представляють собою гідрофільні морські біополімери, що володіють унікальною здатністю утворювати термостабільні гелі, які можуть формуватися і затвердівати при значущих температурах. Альгінати представляють собою сімейство нерозгалужених подвійних кополімерів залишків β -D-мануронової кислоти (M) і α -L-глюкуронової кислоти (G), з'єднаних 1-4 глікозидним зв'язком.

Альгінат натрію – це плівкостворювач, який використовують для модифікації лікарських препаратів, пробіотиків і як в нашому випадку ферментів.

5.2.3.1. Вихідні параметри

Експериментально, з застосуванням підбору параметрів процесу за ББ-дизайном (Box–Behnken designs) [43], була прийнята модель інкапсуляції грибової декстранази.

У літературних джерелах [43,44] схема синтезу ґрунтується на однаковому підході: обирається оптимальний режим подачі інкапсуляту та альгінатного розчину на блок змішування і формування мікрокапсул. Проте, залежно від властивостей речовини-інкапсуляту є декілька підходів: мікрофлюїдний, що відображено на рисунку 5.2, або екструзійний, що відображено на рисунку 5.2.1.

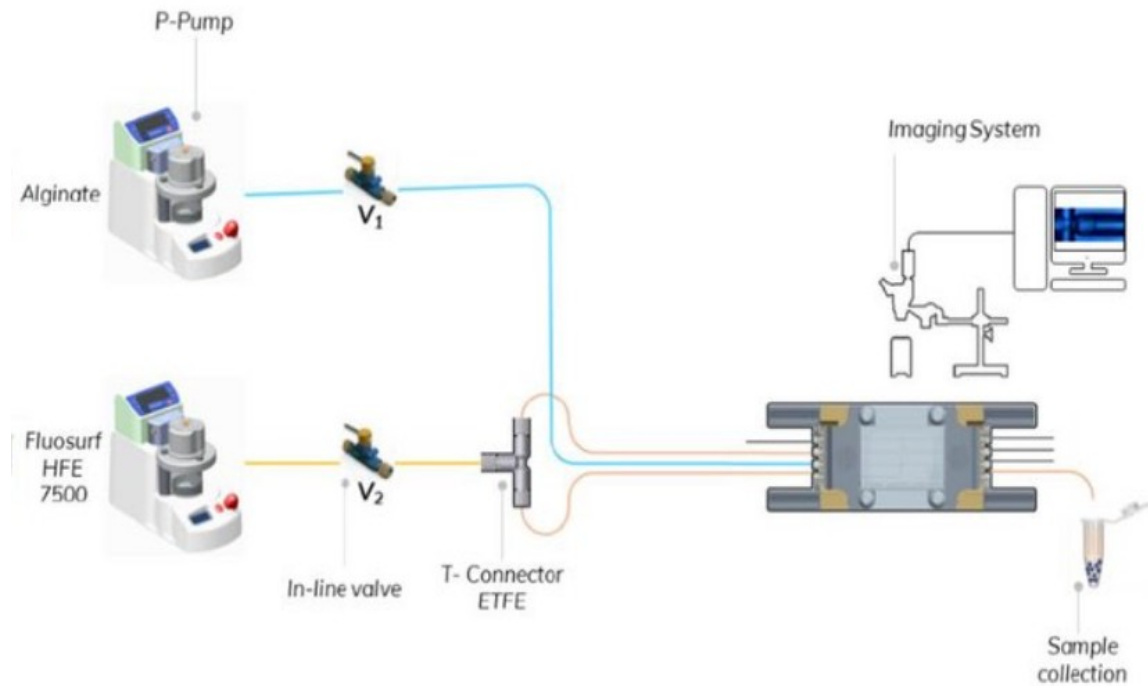


Рис. 5.2 Схематичне зображення принципу роботи мікрофлюїдної крапельної системи Dolomite Microfluidics (посилання:

https://manufacturingchemist.com/news/article_page/A_microfluidic_approach_to_production_of_alginate_beads_for_cell_encapsulation/157748)

Якщо необхідно інкапсулювати гідрофобну речовину, наприклад олію, доцільним є використання мікрофлюїдної крапельної системи Dolomite Microfluidics [45] з одноканальним фторофільним чіпом з тривимірним фокусуванням потоку. Даний метод дозволяє працювати з живими клітинами і є зручним для лабораторних досліджень, так як дає можливість проводити онлайн візуалізацію отриманих капсульованих продуктів. Проте, не являється високопродуктивним у разі необхідності масштабувати на промислові потужності.

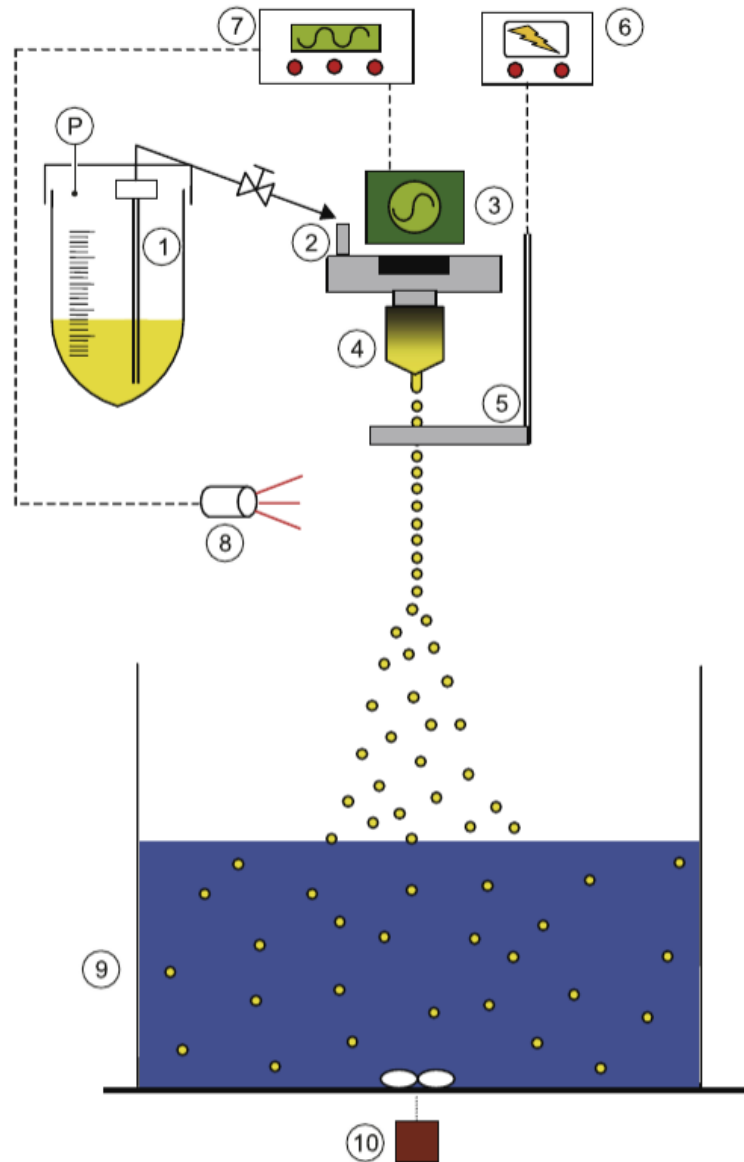


Figure 4-1: Schematic representation of the Encapsulator B-390

Рис. 5.2.1. Схематичне зображення принципу роботи мікроінкапсулятора В-390 (посилання: <https://www.manualsdir.com/manuals/656067/buchi-encapsulator-b-390.html?page=17>)

Для гідрофільних речовин та їх розчинів, підійде метод простого крапельного розпилення (або екструзії). Як видно з рисунку, процес організовано таким чином: за допомогою перистальтичних насосів розчини подаються у змішувальний елемент зі спеціальним соплом у який входить блок вібрації, і виходом на екструзійну голку. Вібруючий елемент створює коливання певного діапазону, що розбиває потік суміші альгінату та речовини-інкапсуляту на дрібні краплі певного розміру, і утворюється так звана «нитка бусин». Краплі потрапляють у посудину з розчином

кальцію хлориду, де і завершується формування мікрокапсул. Даний підхід вважаємо кращим для інкапсуляції білкової молекули декстранази, так як він простіший і дає можливість для підвищення ефективності, та відносно простий у масштабуванні.

Є літературні дані, які демонструють підхід до оптимізації та підвищення ефективності методу крапельного інкапсулювання за екструзійним способом у лабораторних умовах. Так, у статті [44] замість використання однієї голки для екструзії мікрокапсул (Vuchi encapsulator B 390 – рис. 5.2.1) було виготовлено на замовлення екструдер з дев'ятьма голками (Рис. 5.2.2). Швидкість потоку рідини, що подається на екструдер збільшено до 22 мл/хв у порівнянні з 11 мл/хв при використанні 1 голки [43]. Також, зі схеми виключено вібраційний блок, що робить конструкцію дешевшою та зручнішою у використанні.

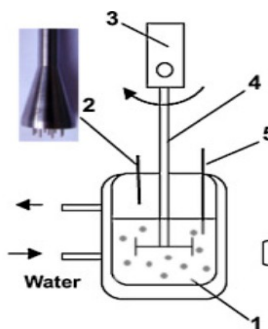


Рис. 5.2.2. Екструдер зі збільшеною кількістю голок (посилання:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511316301830#fig0010>)

Узагальнюючи приведені літературні дані, можемо виділити критичні параметри процесу, які найбільше впливають на якість продукту. Вихідні параметри для виробництва альгінатних ферментних мікрокапсул методом крапельного мікроінкапсулювання такі:

- швидкість потоків розчину альгінату та концентрату ферменту;
- розмір та кількість голок екструдера;
- рН та концентрація розчинів;
- час витримки мікрокапсул у розчині кальцію хлориду.

5.2.3.2. Масштабування процесу капсулювання

При масштабуванні технологічного процесу основними проблемами є відмінності в однорідності між різними масштабами, з якими важко впоратися під час розробки, і яких не можна уникнути. Це може вплинути на якість процесу і/або якість продукту. Гідростатичний тиск, який вище на дні реактора або збірника, впливає на реологічні властивості продукту; ефективність перемішування може призводити до відмінностей в газо- і масообмінних процесах. Крім того, динаміка рідини істотно різниться на різних масштабах, що створює інше гідродинамічне середовище.

Оскільки ми не оперуємо літературними даними з промислових або пілотних установок для методу крапельного інкапсулювання за екструзійним способом, застосуємо «грубе» масштабування для розробки необхідної нам системи. Для початку, ми приймемо за константу ті критичні параметри процесу, на які не вплинуть механічні зміни або зміни пов'язані зі збільшенням фізичних розмірів апаратури: $pH = 7$; час витримки мікрокапсул = 30 хв [43].

Тепер, приймемо за константу критичні параметри процесу, зміна яких приведе до зміни якості і параметрів готового продукту: розмір голок – 0,6 мм.

Оскільки при масштабуванні, особливу увагу приділяють збільшенню продуктивності при зниженні собівартості установки, тоді доцільним буде прийняти за конструктивний попередник для масштабування мікрокапсульну установку зображену у [44]. На відміну від установки Buchi encapsulator B 390, дана установка виключає із конструкції вібраційний елемент, що потребує додаткового підведення напруги і призначений для однієї конкретної голки.

Оскільки, для пришвидчення процесу інкапсулювання, змінити діаметр голок ми не можемо, бо від нього залежить розмір мікрокапсул, збільшимо кількість голок. Замість 9 голок зі швидкістю потоку рідини 22 мл/хв на один екструдер, візьмемо 36 голок, тим самим, збільшивши швидкість до 88 мл/хв (2,444 мл на одну голку).

З огляду на співвідношення: обсягів напівпродукту, зручності обслуговування та собівартість - приймаємо, що ванна для формування мікрокапсул, буде

знаходиться в робочій зоні 30 м^2 . Прийемо, площа обслуговування одного екструдера 30 см^2 або $0,003 \text{ м}^2$. Звідси:

$$\frac{30\text{м}^2}{0,003\text{м}^2} = 60 \text{ екструдерів}$$

Загальна кількість голок:

$$60 \times 36 = 2160 \text{ (голок)}$$

Продуктивність на одну хвилину:

$$2160 \times 2,444 = 5280 \frac{\text{мл}}{\text{хв}} = 5,28 \text{ л/хв}$$

Продуктивність на одну годину:

$$5,28 \times 60 = 316,8 \text{ л/год}$$

Продуктивність на добу:

$$316,8 \times 24 = 7604 \text{ л/добу}$$

Можемо розрахувати скільки годин буде проводитися інкапсулювання для одного циклу виробництва ферменту декстранази:

$$8171 \text{ л концентрат} + \text{альгінат} \div 7604 \approx 26 \text{ год}$$

5.2.3.3. Фільтрування

Для врегулювання об'єму CaCl_2 , що знаходиться в басейні для інкапсуляції, і запобіганню його вивільнення, встановлюється додатковий збірник оснащений турбінною мішалкою, що налаштована на мінімальний хід. Кальцій хлорид, що потрапив у цей збірник, попередньо пройшов через мембранний фільтр з діаметром пор менше 1 мм , що вмонтована у патрубок басейну. Далі, через нижній патрубок збірника, який також оснащений мембранним фільтром, за допомогою перистальтичного насоса високого тиску, кальцій хлорид поступає назад у басейн, створюючи турбулентний потік, який не дає мікрокапсулам осідати на дні. По закінченню процесу всі мікрокапсули вимивають з басейну у збірник через нижній патрубок басейну який знаходиться нижче рівня рідини, зливають кальцій хлорид у каналізацію [43].

5.2.3.4. Промивання мікрокапсул

У збірнику в якому містяться відфільтровані мікрокапсули по трубопроводу подають питну воду для промивання останніх від залишку кальцій хлориду. Процес

повторюють декілька разів. Промиті мікрокапсули за допомогою пересувних ємностей об'ємом по 2 м³ кожна потрапляють на багатострічкову сушарку, де відбувається процес сушіння.

5.2.4. Обґрунтування способу сушіння

Сушка є процес видалення вологи з твердих пористих матеріалів. У більшості випадків видаляється в процесі сушіння вода, що особливо характерно для біотехнологічних виробництв. Процеси мікробіологічного синтезу проходять в розбавлених водних розчинах, тому на останніх стадіях отримання цільових продуктів дуже часто постає завдання видалити зайву воду. В даний час існує безліч видів сушіння і конструкцій сушарок. За способом підведення тепла розрізняють[41]:

- конвективне сушіння, яке відбувається при безпосередньому контакті з сушильним агентом (пнематичні, аерофонтанні, з псевдорозрідженим шаром, розпилювальні);

- контактну сушку з передачею тепла через стінку (шафові, вальцові сушарки);

- ліофільні сушку, засновану на сублімації води при низькому тиску.

Конвективна сушка проходить при взаємодії висушеного матеріалу з сушильним агентом. Як сушильний агента найбільш часто використовують попередньо нагріте в калорифері повітря[41].

У сушарках з псевдозрідженим шаром процес сушіння протікає в шарі частинок, що знаходяться в підвішеному стані. За конструкцією вони можуть бути однокамерними і багатокамерними, причому камери можуть розташовуватися в декілька ярусів. Сушарки такого типу особливо часто використовують в медичній промисловості через можливість чіткого дотримання правил GMP і поєднання декількох операцій в одному апараті (сушка, гранулювання, опудривание, покриття оболонкою). Швидкість газу підбирається таким чином, щоб вона потрапила в діапазон між швидкістю початку псевдорозрідження і швидкістю витання дрібних частинок. У псевдорозрідженому стані частки піддаються турбулентному стану. В таких обставинах існує висока ймовірність втрати продукту. Вимагає вільного руху частинок.

Отже, липкі або клейкі матеріали не будуть рухатися вільно, тому використовувати це обладнання буде практично неможливо [41].

Розглянемо можливість використання стрічкової сушарки для мікрокапсул. Стрічкові сушарки застосовують для сушіння крупногрудкових, волокнистих і пастоподібних матеріалів, у яких у корпусі сушарки матеріал рівномірним шаром товщиною до 50 мм розміщений на стрічковому транспортері, повільно переміщуваному від завантажувального пристрою до розвантажувального бункера.

У багатострічкових (багатоярусних) сушарках транспортерні стрічки розташовуються одна над одною і переміщуються в протилежних напрямках. Сушильний агент звичайно подають протитечією до висушуваного матеріалу, під час пересипання матеріалу з однієї стрічки на другу відбувається його розпушення, що сприяє інтенсифікації процесу сушіння.

Завдяки високій інтенсифікації процесу сушіння і можливості регулювати температуру, а також, відносній дешевизні, було прийнято рішення обрати багатострічкову сушарку як оптимальний варіант.

5.2.5 Пакування та маркування

Після проведення сушіння мікрокапсули необхідно упакувати. При виборі упаковки необхідно враховувати властивості самого цільового продукту та умови його зберігання. Необхідно обирати таку тару, яка захищала б цільовий продукт від пошкоджень, а головне від вологи, сприяла безпечному транспортуванню.

Поліетиленовий мішок вкладиш (Рис.5.2.3) служить первинною пакувальною тарою для різних товарів і захищає вміст від впливу зовнішнього середовища. Вони використовуються при фасуванні й пакуванні готової продукції. Крафт-папір має хороші теплоізоляційні властивості, а поліетиленовий вкладиш забезпечує герметичність і вологонепроникність для продукції. Тип поліетиленового вкладиша і крафт-паперу, а також, кількість шарів паперу вибираються виходячи з властивостей продукції, що буде упаковуватися [46].

Пакет вкладиш оптом виробляється з поліетилену високого або низького тиску. За формою він виготовляється плоским з утворенням бічних складок. За

бажанням замовника пакети вкладиші оптом можуть бути виконані кольоровими або непрозорими або з нанесенням різнобарвного тексту або малюнка.

Поліетиленові вкладиші відрізняються такими експлуатаційними перевагами:

- ✓ висока стійкість до механічних впливів за рахунок міцності і високої пружності поліетилену;
- ✓ зносостійкість;
- ✓ гігієнічна безпека;
- ✓ надійний захист продукту від впливу негативних факторів зовнішнього середовища;
- ✓ можливість виготовлення пакетів-вкладишів будь-якої форми і розмірів [46].

При маркуванні на етикетці пакету вказують:

найменування підприємства-виробника та його товарний знак;

найменування препарату;

масу нетто;

дату виготовлення;

ферментативну активність;

термін зберігання.



Рис 5.2.3. Паперові мішки з поліетиленовим вкладишем

5.3.ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ

Вихідні дані:

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації – 9 м^3 ;
2. Концентрація цільового продукту у КР - $4,4 \text{ г/л}$;
3. Концентрація біомаси - 8 г/л ;
4. Відсоток втрат при виділенні становить 30%
5. Активність ферменту у КР – 290 од/л .

Розподіл втрат по стадіям доцільно навести у вигляді таблиці 5.9.

ДР 1. Приготування розчинів для процесу інкапсуляції;

ДР 1.1. Приготування 20%-го розчину CaCl_2 ;

ДР 1.2. Приготування 0,85%-го розчину натрій альгінату;

ТП 2.1 Зберігання культуральної рідини;

ТП 3.1 Фільтрування культуральної рідини;

Відділення біомаси фільтруванням

2.1.1. Об'єм суспензії культуральної рідини, що йде на подальшу переробку складає $V_{\text{кр}} = 9 \text{ м}^3$.

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

$$G_{\text{вб}} = G_{\text{асб}} / (1 - W_{\text{кл}}) = 40,5 / (1 - 0,65) = 115,7 \text{ кг.}$$

2.1.3. Вологий осад містить 10...15 % міжклітинної вологи, приймаємо $W_{\text{мв}} = 0,1$ (частка), тоді загальна кількість вологого осаду, що видаляється з культуральної рідини $V_{\text{кр}}$ складе:

$$G_{\text{осв}} = G_{\text{вб}} / (1 - W_{\text{мв}}) = 115,7 / (1 - 0,1) = 128,5 \text{ кг.}$$

2.1.4. Маса вологого осаду, який одержують під час фільтрування 1 м^3 суспензії $m_{\text{о}} = G_{\text{осв}} / V_{\text{кр}} = 128,5 / 9 = 14,2 \text{ кг/м}^3$.

2.1.5. Об'єм волого осаду в суспензії становить

$$V_{\text{осв}} = G_{\text{осв}} \cdot 1000 / \rho_{\text{ос}} = 128,5 \cdot 1000 / 1050 = 122,4 \text{ л}$$

2.1.6. Втрати суспензії при фільтруванні складають

$V_{\text{втф}} = V_{\text{кр}} \cdot 1000 \cdot E_{\text{фт}} = 9 \cdot 1000 \cdot 0,06 = 540 \text{ л}$, де $E_{\text{фт}} = 0,06$ (коефіцієнт втрат при фільтруванні, частка).

2.1.7. Об'єм отриманого фільтрату з урахуванням втрат при фільтруванні
 $V_{фгм} = V_{кр} - V_{осв} - V_{втф} = 9000 - 122.4 - 540 = 8337.6$ л.

ТП 4.1 Ультрафільтрація;

3.1.2. Об'єм концентрату ферменту з врахуванням коефіцієнта втрат при ультрафільтрації $E_{уф} = 0,02$ (частка) складатиме

$$V_{кон} = V_{фгм} \cdot (1 - E_{уф}) / K_{уф} = 8337.6 \cdot (1 - 0,02) / 2 = 4085.4 \text{ л}$$

3.1.3. Втрати об'єму концентрату при ультрафільтрації

$$V_{втф} = V_{фгм} \cdot E_{уф} = 8337.6 \cdot 0,02 = 166.7 \text{ л.}$$

Об'єм пермеату після концентрування $V_{пер} = V_{фгм} - V_{кон} - V_{втф} = 8337.6 - 4085.4 - 166.7 = 4085.5$ л.

ТП 5.1. Інкапсулювання в альгінатний матрикс;

ТП 6.1. Фільтрування;

ТП 7.1. Промивання водою;

ТП 8.1. Сушіння мікрокапсул;

ПМВ 9.1. Фасування, пакування, маркування цільового продукту.

Таблиця 5.9

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ДР 1. Приготування розчинів для процесу інкапсуляції						
1	ДР 1.1. Приготування 20%-го розчину CaCl ₂	Вода питна	2640 л	-	3300 л	Збірник 5 м ³
		CaCl ₂ (порошок)	660 кг	-		
	ДР 1.2. Приготування 0,85%-го розчину натрій альгінату	Вода питна	4050 л	-	4085 л	Збірник 5 м ³
		Натрій альгінат	35 кг	-		
ТП 2 Зберігання культуральної рідини						
2	ТП 2.1 Зберігання культуральної рідини	КР	9 м ³ (9000 л)	-	9 м ³ (9000 л)	Збірник КР 10 м ³
ТП 3. Відділення біомаси від культуральної рідини						
3	ТП 3.1 Фільтрування культуральної рідини	Культуральна рідина	9 м ³ Біомаса 72 кг	540 л(6%)	-	Фільтр-прес ФПАКМ 22 - 45 з площею фільтрації 10 м ² (габарити 3775x2000x3525 мм).
		Фільтрат	-	-	8337.6	Збірник фільтрату об'ємом 10 м ³

ТП 4. Ультрафільтрація						
4	ТП 4.1 Ультрафільтрація (приймаємо ступінь концентрування $K_{уф} = 2$).	Фільтрат	8337.6 л	-	-	-
		Концентрат	-	166, 75л (2%)	4085,4 л	Збірник 5000 л.
		Пермеат	-	-	4085.5 л	-
ТП 5. Інкапсулювання						
5	ТП 5.1. Інкапсулювання в альгінатний матрикс	Концентрован ий розчин	4085,4 л	-	-	Збірник 5000 л
		0,85% розчин альгінату натрію	4085,4 л (35 кг альгінату)	-	-	Збірник 5000 л
		20%-розчин хлориду кальція	3300 л [15]	-	-	Промисловий басейн об'ємом 12 м ³
		Інкапсульован а декстраназа	-	-	8170 кг	Збірник об'ємом 9 м ³
ТП 6. Фільтрування						
6	ТП 6.1. Фільтрування мікрокапсул	Мікрокапсули у розчині CaCl ₂	8170 кг	10%	7353 кг	Фільтри з діаметром мембрани 1 мм

ТП 7. Промивання

7	ТП 7.1. Промивання мікрокапсул водою	Мікрокапсули у розчині CaCl ₂	7353 кг	-	7353 кг	-
		Вода питна	∞	-	-	

ТП 8. Сушіння

8	ТП 8.1. Сушіння мікрокапсул	Промиті мікрокапсули	7353 кг	-	-	Багатострічкова сушарка продуктивністю 3000 кг/год, Пересувні ємності об'ємом по 2м ³
		Висушені мікрокапсули	-	10%	6618 кг	

ПМВ 9. Пакування, маркування, відвантаження

9	ПМВ 9.1. Фасування, пакування, маркування цільового продукту	Готовий препарат	6618 кг	-	-	Фасувально-пакувальна лінія потужністю 900 уп/год (18 хв)
		Упакований (по 25 кг) цільовий продукт	-	-	6618 кг (265 крафт/пакети)	

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання

В специфікації наведений детальний опис обладнання, його кількість та особливості (табл. 6.1), що відповідає процесам, зображеним на технологічній та апаратурній схемі.

Таблиця 6.1.

Специфікація до апаратурної схеми

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Пристрій для забору повітря ІМР ХХ.000, витрати повітря – 10000 м ³ /год; Потужність 5,5 кВт. Виробник: “НРМ Engineering srl”, Італія. ¹
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр ФВП-99-25-G3. Фільтрувальний матеріал – поліестер, Продуктивність: 7600 м ³ /год. Робоча температура: від -40 до +110°С. Виробник: “ЕлВент”, Росія. ²
К-3	Компресор	1	Гвинтовий компресор Remeza ВК40Р-8\10 (Білорусь), потужність 5,8 м ³ /хв., робочий тиск 0,8 МПа. ³
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач стисненого повітря Vents ОКВ 700x400. Максимальний робочий тиск – 1,5 Мпа. Виробник: “Вентс”, Україна. ⁴
Р-5	Ресивер	1	РВ-900-9/10 Бежецк АСО 009-7305 (Росія), об’єм 900 л, робочий тиск макс. 1 МПа ⁵
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Корпус теплообмінника ВОП_N фірми Airone (Росія) виготовлена із оцинкованої сталі товщиною 1 – 1,5 мм ⁶
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	НЕРА-фільтр, фільтруючий матеріал - скло папір на основі ультра і мікро тонких скляних волокон, клас фільтра Н14, Е= 99.995 %
Ф-10; Ф-16; Ф-28; Ф-40	Фільтр індивідуальний для повітря	4	Фільтр індивідуальний (OrigoVac C10) виготовлений з фторопласту. Покритий бактерицидною плівкою, з діаметром 0,2 – 0,3 мкм.

					НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Харченко О.В.			Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.		Старовойтова С.О.				68	120
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.					70		
Затверд.		Пирог Т.П.					

РОЗДІЛ 6. Специфікація
обладнання

3-13 3-14	Збірник для приготування соляної кислоти, натрію гідроксиду	2	Збірники, об'ємом 40л і 60л, оснащені мішалкою, з нижнім спуском, потужність на валу 0,18 кВт, частота обертання 4,6 с ⁻¹ , фірма Schott, Німеччина
I-1	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 30 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (до 20-1500 об/хв), сталь AISI 304. Виробник: «BIOSTAT® Cplus» ⁹
P-12	Реактор-змішувач для приготування композиції 1 для інокулятора 30 л	1	Реактор-змішувач об'ємом 10 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (до 20-1500 об/хв), сталь AISI 304. Виробник: «BIOSTAT® Cplus» ⁹ Габаритні розміри: 200 x 100 x 110 см
P-14, P-30	Реактор-змішувач для приготування композиції 2 для інокулятора 30 л	2	Реактор-змішувач (GRJ100L) Оснащений паровою сорочкою та мішалкою, об'ємом 30 л ¹⁰ . Габаритні розміри: 200 x 100 x 110 см
I-2	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 400 л з функціями SIP, SIP компанії biotechnogroup. Повністю обладнаний, можливе встановлення автоматичної системи контролю. ¹⁴ Габаритні розміри: 1470x1120x1780.
P-31	Реактор-змішувач для приготування композиції 2 для інокулятора 400 л	1	Збірник із нержавіючої сталі (12X18H10T) Оснащений мішалкою, об'ємом 400 л. ¹⁰ Габаритні розміри: 1470x1120x1780.
ФР-11	Ферментер (інокулятор)	1	Ферментер об'ємом 2,5 м ³ . Додаткове оснащення : сорочка, барботер, лопатева мішалка. Максимальний тиск в апараті – 0,3 МПа. Максимальна робоча температура 135 С. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 316L. Виробник: “Ей Пі Біосистеми”, Росія. ¹¹ Внутрішній діаметр 1700 мм, висота циліндричної частини 2000 мм.
H-9, H-11, H-13	Насос відцентровий	3	Відцентровий насос с магнітною муфтою серії DM 10, матеріал: поліпропілен, витрата 13 м ³ /год, напір 14 м. ¹³
H-15; H-17	Насос відцентровий серії EL	2	Продуктивність – 720 л/хв, Тиск – до 3 бар, Матеріал – нержавіюча сталь AISI 304 ¹⁸
P-32	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач Ф-1000, об'ємом

	для приготування композиції 1 для інокулятора 2,5м ³		0,63м ³ . Додаткове оснащення: сорочка, барботер, лопатева мішалка. Матеріал корпусу: сталь AISI 304. Виробник: “Агромаш”, Росія. ¹² Габаритні розміри 1200 мм X 1230мм
P-33	Реактор-змішувач для приготування композиції 2 для інокулятора 2,5м ³	1	Реактор із нержавіючої сталі (12X18H10T). Робочий об’єм 1,6 м ³ , оснащений мішалкою швидкість перемішування 220 об/хв., сорочкою, барботером та трубою перетиснення. ¹¹
Д-44	Об’ємно–ваговий дозатор ДВСВ-50	1	Дозатор марки ДВСВ-50. Дозатор напівавтоматичний важільного (гравітаційного типу). Діапазон дозування 25 – 70 кг або л Вироблено: м.Черкаси ¹⁵
Д-20, Д-24, Д-32, Д-34, Д-38, Д-42	Об’ємно–ваговий дозатор DVDM	6	Діапазон дозування 0,005 – 60 кг або л, регулювання – електричне, потужність не більше 50 Вт; габаритні розміри –900×600×700 мм;
P-34	Реактор змішувач для приготування композиції 1 для збірника УБС	1	Реактор-змішувач Ф-50000, об’ємом 16 м ³ . Додаткове оснащення: лопатева мішалка. Матеріал корпусу: сталь AISI 304. Виробник: “Агромаш”, Росія.
УБС-5	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації, продуктивність 5 м ³ /год. Установка складається із відцентрового насоса, теплообмінника «труба в трубі», трьох витримувачів, а також насоса для подачі стерильного поживного середовища у ферментер. Температура стерилізації: 135 С. Тиск пари: 0,5 МПа, тиск стиснутого повітря 0,4 МПа, Габаритні розміри: 3000x2500x3000 Виробник: «Saideli», Китай. ¹⁶
ФР-41	Ферментер (виробничий біосинтез)	1	Ферментер із нержавіючої сталі (12X18H10T). Робочий об’єм 15 м ³ , оснащений мішалкою швидкість перемішування 220 об/хв., сорочкою та барботером. Максимальний тиск в апараті:0,3 МПа. Максимальна робоча температура:13 5 С Габаритні розміри: 3500x5200x9600 Виробник: «Wenzhou Jinggong Machinery Equipment Co», Китай. ¹⁷
З-4 З-9	Збірник культуральної рідини	2	Збірник об’ємом 10000 л Матеріал: нержавіюча сталь SUS304 або 316L. Виробник: «Стройторгсервис» (Україна) ^[19] .

Н-5 Н-7 Н-10 Н-12 Н-14 Н-16 Н-18 Н-20 Н-22 Н-24	Насос перистатичний	7	Перистальтичні насоси високого тиску серії FPSH є промисловим насосом, розрахований на цілодобову роботу. Продуктивність якого становить 15-150 м ³ /год та тиск до 15 бар. Цей тип насоса може працювати в режимі «сухого ходу», відсутні ущільнення, є реверсивним, самовсмоктувальним та володіє високою всмоктуючою здатністю [20]
ФП-6	Фільтр-прес	1	ФПАКМ 22 - 45 з площею фільтрації 22 м ² (габарити 3780x1250x4240 мм). Україна [21].
УФ-8	Фільтраційна установка	1	Фільтраційна установка фірми «Ecosoft MO-24» з горизонтальними фільтрувальними елементами, складається зі збірника (З-9) об'ємом 3 м ³ , насос високого тиску Grundfos (Н-10), попереднього фільтра (Ф-11) та фільтраційного модуля (УМ-12), продуктивність установки-10-30 м ³ /год. [22].
БЗ-16	Бункер-змішувач	1	Бункер змішувач об'ємом 3000 л. Матеріал: нержавіюча сталь SUS316L. Україна [23].
З-12 З-15 З-18 З-20	Збірник	4	Збірник об'ємом 5000 л. Матеріал: нержавіюча сталь SUS316L. Україна [24].
ПБС-1	Промисловий басейн	1	Промисловий басейн об'ємом 8 м ³ (під замовлення). Виробник: ТОВ «ВК ІНОКС ТАЙМ» [25]
З-16	Збірник	1	Збірник об'ємом 8 м ³ , оснащений рівнеміром, турбінною мішалкою. Матеріал: нержавіюча сталь SUS316L. Виробник: «Евромаш» (Україна) [26]
Д-2 Д-4	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Дозатор сипучих речовин і рідин. Продуктивність 3000 кг/год. Виробник: ЧП ПКК «Донбасс-Восток» (Україна) [27]
С-15	Багатострічкова сушарка	1	Багатострічкова сушарка Multi-Belt Dryer.

			Продуктивність: 2000 кг/год. [28]
ФМ-18	Фасувальна машина	1	Автомат пакувальний для сипучих продуктів HUALIAN (201) NP-500. Потужність 900 уп/год. Виробник «HUALIAN» (Китай) [29].

Примітка*: пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел:

1. <https://www.hpmengineering.it/en-en/product/mobile-unit-for-air-input-ventilation> («HPM Engineering srl», пристрій для забору повітря);
2. <https://www.el-vent.ru/> («ЕлВент», фільтр грубої очистки повітря);
3. <https://compressing.ru/kompressory/remeza-vk60-20-cooler> («Компратек», компресор);
4. <https://vent-market.com.ua/shop/product/vents-okv1-700h400-3> («Vents», теплообмінник-оохолоджувач);
5. <https://bezhec.nt-rt.ru/> (Бежечк, ресивер);
6. https://www.ventart.ru/catalog/nagrevateli-vozdhuha-airone/vop_ru/ (Айран, теплообмінник-нагрівач);
7. <https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/filtry-absolyutnoj-ochistki/filtr-vozdushnyj-absolyutnoj-ochistki-s-kleevym-separatorom-fva-ii-fvas-klass-ochistki-h10-h14/> (фільтр тонкої очистки, Ел-Вент)
8. <https://svamma.ru/product/filtr-dlya-sistemy-vytvazhki-esab-origo-vac-cl0-400v.html> (фільтр, OrigoVac C10)
9. http://www.sartogcosm.ru/biostat_d50_d100.html («BIOSTAT® Cplus», інкулятор об'ємом 30 л);
10. <https://reshimpribor.ru/catalog/reaktory-dlya-himicheskogo-sinteza/duplicate-of-reaktor-himicheskij-na-100-l-s-zashhitnoj-obolochkoy-model-j-gr-100l.html>. РЕАХИМПРИБОР, РЕАКТОР 30л, 400л.
11. <http://biofermenter.ru/pilotnyye-i-promyshlennyye-fermentery-i-bioreaktory-ot-10-do-15000-l> («Ей Пі Біосистема», ферментер об'ємом 1,6 м³).
12. <https://www.agro-mash.ru/fermenter.html> («Агромаш», реактор об'ємом 0,63 м³);
13. <https://tapflo.us/contacts> («Тарфло», насос відцентровий);
14. <https://biotechno.ru/catalog/emkosti-i-rezervuary/statsionarnyy-reaktor-s-funktsiyami-cip-sip-obem-630-l/> (інкулятор 400 л)
15. <https://polytechnic.com.ua/products-rus/dvav-50-rus/> (Дозатор фірми НІТЧП "Політехнік")
16. <http://sdicentrifuge.ru/9-continuous-sterilization-system/192767/> («Saideli», УВС-5);
17. <https://m.made-in-china.com/product/10050000L-Beer-Fermentation-Tank-Vessel-Fermentor-837443235.html> (ферментер об'ємом 2,5 м³)
18. https://ascopumps.com.ua/pumps/tsentrobezhnye/gigienicheskie_tsentrobezhnye/nasosy_el.html. (Насос відцентровий потужністю 720 л /хв
19. <https://stprom.com.ua/p1016501527-reaktor-10000-litrov.html>
20. https://ascopumps.com.ua/pumps/peristalticheskie/serii_fpsh.html
21. <http://hydrotrend.ru/filter-press/tower-filter-press-fpakm/>
22. <https://biotechno.ru/catalog/karta/pilotnaya-ustanovka-dlya-mikro-i-ultrafiltratsii-uf-401-402/>
23. <https://obyava.ua/ru/smesitel-5000-l-promyshlennaya-meshalka-s-nasosom-dozatorom-2351342.html>
24. <https://dnepropetrovsk.flagma.ua/uk/reaktor-5000-litrov-o7112352.html>
25. <https://inoxtime.com.ua>
26. http://euromash.kiev.ua/ru/sparsti_perem_ustroystvom_ru.php

27. https://prom.ua/p3984098-dozatory-sypuchih-zhidkостей.html?utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=cpc_1,2_promyshlennoe_oborudovanie&utm_term=%7Bkeyword%7D&gclid=CjwKCAjw-qeFBhAsEiwA2G7N17basNWj8RyV4LlpfEbb83ErWUNWD44FgUktXLihwB9LmSe-f7iVPRoCLTQQA_vD_BwE
28. <https://agroru.com/doska/hans-binder-multi-belt-dryer-mnogo-lentohnaya-sushilka-82482.htm>
29. <https://leopack.pro/ua/fasovochno-dozirovochnoe-oborudovanie/fasovochnye-upakovochnye-mashiny-dlya-sypuchih/avtomat-upakovochnyj-dlya-sypuchih-produktov-hualian-201-np-500>

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми

Технологічна схема біосинтезу декстранази включає допоміжні роботи (підготовка і стерилізація поживних середовищ, приготування розчинів титрувальних агентів), технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез фермента на основі гриба *P. piscarium* БИМ Г-102), а також, процеси післяферментаційних стадій виділення: приготування робочих розчинів NaCl₂ та альгінат натрію, зберігання культуральної рідини, відділення біомаси за допомогою фільтр-пресу, концентрування розчину на ультрафільтраційній установці, інкапсулювання ферменту в альгінатний матрикс, фільтрування мікрокапсул, промивання мікрокапсул, сушіння, пакування..

Технологічну схему біосинтезу декстранази наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Підготовка очищеного аераційного повітря

ДР 1.1. Забір повітря з атмосфери

Атмосферне повітря забирають турбокомпресором через повітрозбірник (ПЗ-1) на висоті 2 м, від даху будівлі.

ДР 1.2. Попереднє очищення повітря

Попередня очистка повітря здійснюється на фільтрах грубої очистки (Ф-2). У якості фільтрувального матеріалу використовують мати зі скловолокна. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил та механічні частки з повітря осідають, а очищене повітря надходить у компресор (К-3). Ступінь очищення становить $E = 80\%$.

ДР 1.3. Стискання повітря

Стиснення повітря відбувається за допомогою компресора (К-3), при цьому створюється тиск величиною 0,4 МПа, температура повітря підвищується від 120 до 250°C. Знищується значна кількість контамінуючої мікрофлори.

					НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Харченко О.В.			РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.		Старовойтова С.О.					74	120
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						
					76			

Після компресора повітря має наступні характеристики: $P = 0,35-0,5$ МПа, $W = 60$ %.

ДР 1.4. Охолодження повітря в теплообміннику

Перед подачею повітря, на фільтр головного очищення, його охолоджують до температури $15-25^{\circ}\text{C}$ в теплообмінному апараті (Т-4), подачею холодної води. У конденсато-уловлювачі випадає конденсат.

ДР 1.5. Видалення вологи

Далі повітря надходить у ресивер (Р-5), в якому остаточно видаляється надмірна волога та стабілізується потік повітря (зниження рівня пульсацій). У результаті вологість повітря повинна становити близько 40%.

ДР 1.6. Нагрівання повітря в теплообміннику

Після ресивера повітря подається на теплообмінник (Т-6), в якому нагрівається до температури 27°C подачею гарячої води. Потім стабілізоване повітря надходить на головний фільтр (Ф-7).

ДР 1.7. Очищення повітря на головних фільтрах

Далі очищення повітря здійснюється в головному фільтрі (Ф-7), фільтруючий матеріал якого складається з ультратонкого скляного волокна. Ступінь очищення повітря становить 99,5%.

ДР 1.8. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах

Заключна стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальних фільтрах типу ХР4. (Ф-10,Ф-16,Ф-28,Ф-40)

Як фільтруючий матеріал використовують фторопластові втулки, товщиною 4 мм. Фільтр являє собою металевий циліндр з кришкою та конічним дном. Ступінь очищення становить $E = 99,9999\%$.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів та розчинів для інкапсуляції

ДР 2.1. Приготування 6-% розчину HCl

По трубопроводу через витратомір у збірник (З-13) об'ємом 60 л додають 42 л питної води. Далі через об'ємно-ваговий дозатор (Д-20) додають 9,6 л 37 % розчину HCl (зі складу), та перемішують. В сорочку подають холодну технічну воду для

уникнення екзотермічної реакції та вмикають перемішувальний пристрій (50 об/хв). Приготовлений 6 % розчин HCl не стерилізують.

ДР 2.2. Приготування та стерилізація 6-% розчину NaOH

Зі складу, у збірник (З-14) об'ємом 40 л, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-20) подається 6 кг кристалічного NaOH, далі по трубопроводу через витратомір додають воду об'ємом 100 літрів. Розчин перемішується до повного розчинення, та стерилізується при температурі 131°C упродовж 40 хв.

ДР 2.3. Приготування 20%-го розчину CaCl₂

У збірник об'ємом 5 м³ (З-18) по трубопроводу подається питна вода об'ємом 2640 л. 660 кг CaCl₂ зі складу у мішках у порошкоподібному вигляді подається на об'ємно-ваговий дозатор (Д-2) який встановлений над збірником. CaCl₂ є легкорозчинним тому не потребує підвищення температури. Розчин перемішують та подають за допомогою перистальтичного насосу (Н-22) у промисловий басейн (ПБС-1) для проведення процесу інкапсуляції.

ДР 2.4. Приготування 0,85%-го розчину натрій альгінату

У збірник об'ємом 5 м³ (З-20) по трубопроводу подається питна вода об'ємом 4050 л. 35 кг натрій альгінату зі складу у мішках у порошкоподібному вигляді подається на об'ємно-ваговий дозатор (Д-4) який встановлений над збірником. Розчин перемішують та подають за допомогою перистальтичного насосу (Н-24) у збірник (З-15) для проведення процесу інкапсуляції.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування інокуляту необхідно 2200 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 2200 мл середовища наведено в табл. 7.1.

ДР 3.1.1. Підготовка розчину кукурудзяного екстракту

На технічних вагах зважують 11 г кукурудзяного екстракту і поміщають в колбу об'ємом 1 л, додають 100 мл питної води і поміщають у термостат на 24 год при температурі 37 °C.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції 1

На технічних вагах зважують 22 г декстрану і поміщають у колбу з розведеним кукурудзяним екстрактом (від ДР 2.1.1), додають 1850 мл питної води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

Таблиця 7.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 380 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 2,2 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Декстран	10	22	1	1700
Кукурудзяний екстракт	5	11		
NaNO ₃	3	6,6	2	300
KH ₂ PO ₄	1	2,2		
KCl	0,5	1,1		
MgSO ₄	0,5	1,1	3	200

ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції 2

На технічних вагах зважують 6,6 г NaNO₃, 2, 2 г KH₂PO₄, і 1,1 г KCl. Наважки поміщають у колбу об'ємом 700 мл, додають 500 мл води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 3.1.4. Приготування та стерилізація композиції 3

На технічних вагах зважують 1,1 г MgSO₄. Наважку переносять у колбу об'ємом 500 мл, додають 300 мл води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 30 л

Для вирощування інокуляту необхідно 22,1 л поживного середовища. Для засіву апарату використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого 2,2 л (ДР 3.1), та конденсату, що утворюється в процесі стерилізації (10% від об'єму середовища), тому загальний об'єм води для приготування поживного середовища становитиме 19,5 л. Вміст компонентів для приготування 22,1 л середовища наведено в табл. 7.2.

Таблиця 7.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 22,1 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 22,1 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Декстран	10	221	1	3,1
Кукурудзяний екстракт	5	110		
NaNO ₃	3	66,3	2	19
KH ₂ PO ₄	1	22,1		
KCl	0,5	11,05		
MgSO ₄	0,5	11,05		
Вода	-	19,5	-	-
Конденсат	-	2,21	-	-

ДР 3.2.1. Підготовка розчину кукурудзяного екстракту

На технічних вагах зважують 110 г кукурудзяного екстракту і поміщають в 5 літровий бутиль, потім за допомогою мірного циліндра додають 3 л води, і згодом переносять в збірник (Р-12) об'ємом 10 л, витримують 24 год при температурі 37 °С.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції 1

На технічних вагах зважують 221 г декстрану і поміщають через патрубок у збірник (Р-12) з розведеним кукурудзяним екстрактом (від ДР 3.2.1), по трубопроводу через витратомір додають питну воду до загального об'єму 3,1 л.

Встановлюють режим перемішування 50-100 об/хв для розчинення компонентів. Отриманий розчин стерилізують при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції 2

На технічних вагах зважують 66,3 г NaNO₃, 22,1 г KН₂PO₄, 11,05 г KCl і 11,05 г MgSO₄. Наважки поміщають через патрубок у збірник (Р-13) об'ємом 30 л, додають по трубопроводу через витратомір питну воду об'ємом 19 л. Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію рН розчину з солями, доводять до значення 4,5 6 %-вим розчином соляної кислоти (ДР 2). Для кращого розчинення солей в сорочку подається пара (до досягнення температури розчину 40 °С) та встановлюють режим перемішування з кількістю обертів 50-100 об/хв до повного розчинення. Розчин подають в попередньо простерилізований посівний апарат об'ємом 30 л. Стерилізація відбувається при температурі 131 °С упродовж 40 хв. Композиції 1 і 2 перекачують до малого інокулятора (І-1) за допомогою нагнітання повітря в реактор змішувач.

ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури в великому інокуляторі об'ємом 400 л

Для вирощування інокуляту необхідно 169 л поживного середовища. Для засіву апарату використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого 17 л (ДР 3.2), та конденсату, що утворюється в процесі стерилізації (10% від об'єму середовища), тому загальний об'єм води для приготування поживного середовища становитиме 152 л. Вміст компонентів для приготування 169 л середовища наведено в табл. 7.3.

Таблиця 7.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 169 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 169 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Декстран	10	1690	1	69
Кукурудзяний екстракт	5	845		

NaNO ₃	3	507	2	100
KH ₂ PO ₄	1	169		
KCl	0,5	84,5		
MgSO ₄	0,5	84,5		
Вода	-	152	-	-
Конденсат	-	16,9	-	-

ДР 3.3.1. Підготовка розчину кукурудзяного екстракту

На технічних вагах зважують 845 г кукурудзяного екстракту і поміщають через патрубок в збірник (Р-13) об'ємом 100 л, по трубопроводу через витратомір додають 30 л питної води, витримують 24 год при температурі 37 °С.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції 1

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-32) в збірник з розведеним кукурудзяним екстрактом (від ДР 3.3.1) додають 1690 г декстрану і додають по трубопроводу через витратомір питну воду до загального об'єму 69 л. Встановлюють режим перемішування 50-100 об/хв для розчинення. Отриманий розчин стерилізують при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції 2

На технічних вагах зважують 507 г NaNO₃, 169 г KH₂PO₄, 84,5 г KCl і 84,5 г MgSO₄. Наважки поміщають через об'ємно-ваговий дозатор (Д-34) у збірник (Р-31) об'ємом 160 л, додають питну воду по трубопроводу через витратомір до загального об'єму 260 л. Для кращого розчинення солей в сорочку подається пара (до досягнення температури розчину 40 °С) та встановлюють режим перемішування з кількістю обертів 50-100 об/хв до повного розчинення. Розчин подають в попередньо простерилізований посівний апарат об'ємом 400 л. Додають через об'ємно-ваговий дозатор (Д-36) розчин соляної кислоти (від ДР 2) до досягнення рН 4-4,5. Стерилізація відбувається при температурі 131 °С упродовж 40 хв. Композиції 1 і 2 перекачують до великого інокулятора (І-2) за допомогою нагнітання повітря в реактор змішувач.

ДР 3.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури в посівному апараті об'ємом 2500 л

Для вирощування інокуляту необхідно 1200 л поживного середовища. Для засіву апарату використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого 130 л (ДР 3.3), та конденсату, що утворюється в процесі стерилізації (10% від об'єму середовища), тому загальний об'єм води для приготування поживного середовища становитиме 1056 л. Вміст компонентів для приготування 1200 л середовища наведено в табл. 7.4.

Таблиця 7.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1,2 м³ середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 1200 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Декстран	10	12	1	350
Кукурудзяний екстракт	5	6		
NaNO ₃	3	3,6	2	850
KH ₂ PO ₄	1	1,2		
KCl	0,5	0,6		
MgSO ₄	0,5	0,6		
Вода	-	1056	-	-
Конденсат	-	120	-	-

ДР 3.4.1. Підготовка розчину кукурудзяного екстракту

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-38) в збірник (Р-32) об'ємом 630 л подають 6 кг кукурудзяного екстракту, по трубопроводу через витратомір додають 100 л питної води і витримують 24 год при температурі 37 °С.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції 1

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-38) у збірник, який містить розчин кукурудзяного екстракту (від ДР 3.4.1), подають 12 кг декстрану. Додають питну

воду до загального об'єму 350 л. Встановлюють режим перемішування 50-100 об/хв для розчинення компонентів. Отриманий розчин стерилізують при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 3.4.3. Приготування та стерилізація композиції 2

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-42) у збірник (Р-33) об'ємом 1,6 м³ подають 3,6 кг NaNO₃, 1,2 кг КН₂РО₄, 0,6 кг КСl і 0,6 кг MgSO₄, додають питну воду до загального об'єму 850 л. Для кращого розчинення солей в сорочку подається пара (до досягнення температури розчину 40 °С) та встановлюють режим перемішування з кількістю обертів 50-100 об/хв до повного розчинення. Розчин подають в попередньо простерилізований посівний апарат (ФР-11) об'ємом 2500 л. Додають розчин соляної кислоти (від ДР 2) до досягнення рН 4-4,5. Стерилізація відбувається при температурі 131 °С упродовж 40 хв. Композиції 1 і 2 перекачують до посівного апарату (ФР-11) за допомогою відцентрового насосу (Н-9).

ДР 3.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для УБС

Для вирощування інокуляту необхідно 11700 л поживного середовища. Для засіву апарату використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого 1200 л (ДР 3.4), тому загальний об'єм води для приготування поживного середовища становитиме 10296 л.

Таблиця 7.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 11700 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 11700 л середовища, кг	Об'єм композиції, м ³
Декстран	10	117	11,7
Кукурудзяний екстракт	5	58,5	
NaNO ₃	3	35,1	
КН ₂ РО ₄	1	11,7	
КСl	0,5	5,8	

MgSO ₄	0,5	5,8	
Вода	-	10296	-
Конденсат	-	1170	-

ДР 3.5.1. Підготовка розчину кукурудзяного екстракту

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-44) в збірник об'ємом 16 м³ подають 58,5 кг кукурудзяного екстракту, додають 1000 л питної води і витримують 24 год при температурі 37 °С.

ДР 3.5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для УБС

Через об'ємно-ваговий дозатор у збірник об'ємом 16 м³, який містить розчин кукурудзяного екстракту (від ДР 3.5.1), подають 117 кг декстрану, 35,1 кг NaNO₃, 11,7 кг KH₂PO₄, 5,8 кг KCl, 5,8 кг MgSO₄. Додають питну воду до загального об'єму 11,7 м³. Встановлюють режим перемішування 50-100 об/хв для розчинення компонентів. Додають розчин соляної кислоти (від ДР 2) до досягнення рН 4-4,5 (контроль проводять на рН-метрі). Розчин перекачують за допомогою відцентрового насоса (Н-15) в реактор-змішувач УБС (УБС-5) об'ємом 16 м³ і стерилізують за допомогою УБС-5.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Культуру мікроорганізму *P. piscarium* БИМ Г-102 зберігають у пробірках зі скошеним агаризованим середовищем Роулен-Тома, при температурі -5 °С. Всі роботи з культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 4.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках зі скошеним агаром Роулен-Тома, пересівають петлею в пробірки зі скошеним середовищем того ж складу і вирощують 5-7 діб при температурі 30 °С.

ТП 4.3. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 5 л з 1700 мл розчину композиції 1 (від ДР 3.1.2) в асептичних умовах вносять 300 мл розчину композиції 2 (від ДР 3.1.3), 200 мл розчину композиції 3 (від ДР 3.1.4). Перемішують і розливають по 200 мл у 15 стерильних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *P. piscarium* БИМ Г-102, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію і переносять у колбу. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Для засіву однієї колби використовують суспензію, одержану з однієї пробірки.

Гриби вирощують у колбах на качалці (220 об/хв) упродовж 5-7 діб при температурі 24 С.

Періодично (кожні 6 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю.

ТП 4.4. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 30 л

Для вирощування інокуляту у попередньо простерилізований інокулятор (І-1) об'ємом 30 л в асептичних умовах вносять по трубопроводу 3,1 л розчину композиції 1 (від ДР 3.2.2), 19 л розчину композиції 2 (від ДР 3.2.3) і посівний матеріал (через засівну колбу від ТП 4.3). Температура культивування 24 °С, перемішування відбувається за допомогою мішалки, витрати повітря 2 л/л·хв. Тривалість культивування становить 48 год. Періодично (кожні 6 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю..

ТП 4.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 400 л

Для вирощування інокуляту у попередньо простерилізований інокулятор (І-2) об'ємом 400 л в асептичних умовах вносять через об'ємно-ваговий дозатор (Д-38) 69 л розчину композиції 1 (від ДР 3.3.2), 100 л розчину композиції 2 (від ДР 3.3.3), і посівний матеріал (через трубу перетискування ТП 4.4). Оптимальне значення рН для росту продуцента становить 5,0. За рахунок підкислення композиції 2 у процесі стерилізації до рН 4,0-4,5, додавання композиції 1 та інокуляту кінцевий показник рН повинен бути близьким до оптимального. У разі необхідності середовище додатково підкислюється за допомогою 6 % розчину соляної кислоти (від ДР. 2) до одержання значення рН 5,0. Температура культивування 24 °С, перемішування відбувається повітрям, витрати повітря 2 л/л·хв. Тривалість культивування становить 48 год.

Періодично (кожні 6 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення рівня біомаси (1,5 г/л).

ТП 4.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 2500 л

Для вирощування інокуляту у попередньо простерилізований інокулятор (ФР-11) об'ємом 2500 л в асептичних умовах по трубопроводу вносять 350 л розчину композиції 1 (від ДР 3.4.2), 850 л розчину композиції 2 (від ДР 3.4.3), і посівний матеріал (через трубу перетискування від ТП 4.5). У разі необхідності середовище підкислюється за допомогою 6 % розчину соляної кислоти (від ДР. 2) до одержання значення рН 5,0. Температура культивування 24 °С, перемішування відбувається повітрям, витрати повітря 2 л/л·хв. Тривалість культивування становить 48 год.

Періодично (кожні 6 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення рівня біомаси (1,5 г/л).

ТП 4.7. Виробничий біосинтез

У попередньо простерилізований ферментер (ФР-41) об'ємом 25 м³ подають по трубопроводу простерилізоване в УБС-5 (УБС-5) поживне середовище (від ДР 3.5) і посівний матеріал (через трубу перетискування від ТП 4.6). У разі необхідності середовище підкислюється за допомогою 6 % розчину соляної кислоти (від ДР. 1) до одержання значення рН 5,0. Температура культивування 24 °С, перемішування відбувається повітрям, витрати повітря 2 л/л·хв. Тривалість культивування становить 96 год. Критерієм закінчення процесу є досягнення необхідної концентрації цільового продукту – 4,4 г/л.

Періодично (кожні 6 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю. Після закінчення ферментації відбирають пробу для визначення рівня біомаси (2 г/л) та концентрації ферменту декстранази (4,4 г/л).

ТП 5. Зберігання культуральної рідини

КР з ферментеру перистальтичним насосом подається в збірник культуральної рідини об'ємом 10 м³ (3-4).

ТП 6. Відділення біомаси

ТП 6.1. Фільтрування

Зі збірника (З-4) перистатичним насосом (Н-5) культуральна рідина подається у фільтр-прес (ФП-6), де здійснюється фільтрування.

Супернатант, за допомогою перистатичного насоса (Н-7) подається у збірник об'ємом 10 м³ (З-9) для подальшого процесу в ультрафільтраційній установці (УФ-8).

ТП 7. Концентрування розчину

ТП 7.1. Ультрафільтрація розчину

Супернатант зі збірника (З-9) за допомогою перистатичного насоса (Н-10) через фільтр попередньої очистки подається на фільтраційний модуль де протягом 45 хв при температурі 15-20 °С здійснюється фільтрація на мембранах з діаметром пор 32кДа. Промивання мембран здійснюють водою.

Концентрат подається на збірник (З-12) об'ємом 5 м³ для подальшої технологічної стадії.

ТП 8. Інкапсулювання в альгінатний матрикс

ТП 8.1. Інкапсулювання декстранази

У збірник (З-15) об'ємом 5 м³ за допомогою перистальтичного насосу (Н-24) зі збірника (З-20) подають розчин альгінату натрію потрібної концентрації 0,85%. Далі, за допомогою перистальтичних насосів (Н-12, Н-14) зі збірників (З-12, З-15) рідини передаються на бункер-змішувач (БЗ-16). З бункера змішувача (БЗ-16) за допомогою перистальтичних насосів (Н-16, Н-18) низького тиску суміш потрапляє на екструдери виготовлені на замовлення, кожен з яких має 36 голок. Суміш через голки екструдера краплями потрапляє у басейн з розчином кальцій хлориду який перекачали зі збірника (З-18) перистальтичним насосом (Н-22). Загальний об'єм рідини який буде потрапляти у басейн більший ніж об'єм самого басейну, тож кальцій хлорид самоплином буде витікати через трубопровід попередньо пройшовши крізь фільтрувальну мембрану і потрапляти у збірник (З-16), а з нього за допомогою перистальтичного насосу (Н-20) перекачуватися назад у басейн створюючи турбулентний рух рідини тим самим перемішуючи мікрокапсули.

ТП 9 Фільтрування

Відкривши спеціальний вентиль без фільтрувальної мембрани мікрокапсули потрапляють у збірник (З-16). Нижній патрубок збірника також обладнений мембраною, тож мікрокапсули не потраплять назад у басейн як кальцій хлорид. Отже, ми маємо відфільтровані мікрокапсули які містяться у збірнику (З-16). Надлишки кальцій хлориду зливаються у каналізацію.

ТП 10 Промивання мікрокапсул

До збірника (З-16) по трубопроводу подається питна вода, яка так само як кальцій хлорид проходить крізь мембрану і по трубопроводу потрапляє у каналізацію. Цей процес повторюється декілька разів.

ТП 11 Сушіння мікрокапсул

Промиті мікрокапсули зі збірника (З-16) за допомогою пересувних ємностей об'ємом 2 м³ подають на багатострічкову сушарку (С-15), температура не вище 60°C.

ПМВ 12. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 12.1. Пакування готового продукту декстранази

Пакування здійснюють на фасувальному автоматі (ФМ-18) у паперові мішки з поліетиленовим вкладишем по 25 кг.

Мікрокапсули (від ТП 7.1.) подаються у накопичувальний бункер вагового фасувального автомату, звідки за допомогою вагового дозатора фасується по 10 кг у паперові мішки з поліетиленовим вкладишем.

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва

8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів виробництва декстранази

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Метод контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кт 1.1. Забір повітря з атмосфери	Атмосферне повітря		Під час забору повітря	H = 3 м
Кт 1.2. Попереднє очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80%, тиск згідно паспорту
Кт 1.3. Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P=0,35–0,5 МПа t=250 °C
Кт 1.4. Охолодження повітря в теплообміннику	Охоложене повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	t = 15-25 °C
Кт 1.5. Видалення вологи	Повітря після видалення зайвої вологи	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	W=40 %

					НУХТ БТФК 04 02 32 КР ПЗ		
Змн	Арк	№ докум	Підпис	Дата			
Розроб		Харченко О.В.			Пім	Длк	Дкншіє
Певелін		Старовойтова С.О.				88	120
Реценз					Кафедра БТМ 90		
Н. Климн							
Затверд		Пирог Т.П.					
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва							

Кт 1.6. Нагрівання в теплообміннику	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$
Кт 1.7. Очищення повітря в головних фільтрах	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в фільтрі тонкого очищення	$E = 99,5\%$
Кт 1.8. Очищення повітря в індивідуальних фільтрах	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	$E = 99,9999\%$
Кх, Кт 2.1. Приготування 6%-го розчину HCl	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	$C = 6\%$
Кх, Кт 2.2. Приготування 10% розчину гідроксиду натрію	Концентрація розчину гідроксиду натрію	Хімічний метод	Після приготування розчину	$t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ $C = 10\%$

Кт, Км, Кх 3.1.1. Підготовка розчину кукурудзяного екстракту	Кукурудзяний екстракт, температура, час, концентрація, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, рН-метр	Концентрація розчину визначається після приготування, а температура безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 37 °C, τ = 24 хв, рН = 6,0 відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції 1	Композиція 1, температура, час, концентрація, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, рН-метр	Концентрація розчину визначається після приготування, а температура безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 оC, τ = 30 хв, рН = 7,0 відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.3. Приготування та стерилізація композиції 2	Композиція 2, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 оC, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.4. Приготування та стерилізація композиції 3	Композиція 3, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник,	Температура визначається безперервно під час	t = 131 оC, τ = 40 хв,

		мікробіологічний контроль	стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	відсутність мікробіоти
Кх 3.2.2. Приготування композиції 1	Композиція 1, концентрація	Термометр технічний, рН-метр, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація розчину визначається після приготування	pH = 7,0
Кх 3.2.3. Приготування композиції 2	Композиція 2, концентрація	Термометр технічний, рН-метр, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація розчину визначається після приготування	pH = 4,0
Кт, Кх 3.5.2. Передача композицій в збірник та їх стерилізація в УБС-20.	Розчини, температура, час, стерильність	Термометр технічний, рН-метр, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація визначається після приготування розчину, температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	pH=4,0, t = 140 °C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.3 Приготування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, рН	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр, мікробіологічний	Температура, рН середовища, швидкість перемішування контролюється безпосередньо під час	t = 24 °C, pH=4,0, w = 220 об/хв., τ = 5 діб, відсутність сторонньої

	середовища, перемішування, мікробіологічна чистота культури	контроль	процесу, а мікробіологічна чистота культури після вирощування культури в колбах на качалках	мікрофлори
Кт, Км, Кх, 4.4 Приготування інокуляту в інокуляторі 1 (100 л)	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, перемішування, рН середовища, мікробіологічна чистота культура	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура, рН середовища, швидкість перемішування контролюється безпосередньо під час процесу, а мікробіологічна чистота культури після вирощування культури в інокуляторі 1	t = 24 °C, рН = 4,0, τ = 48 год, w = 2 л/л×хв відсутність сторонньої мікрофлори
Кт, Км, Кх, 4.5 Приготування інокуляту в інокуляторі 2 (630 л)	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, перемішування, рН середовища, мікробіологічна чистота культура	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура, рН середовища, швидкість перемішування контролюється безпосередньо під час процесу, а мікробіологічна чистота культури після вирощування культури в інокуляторі 2	t = 24 °C, рН = 4,0, τ = 24 год, w = 2 л/л×хв., відсутність сторонньої мікрофлори

<p>Кт, Км, Кх 5.5. Приготування інокуляту в посівному апараті (5м³)</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, перемішування, рН середовища, мікробіологічна чистота культура</p>	<p>Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН середовища, контролюється безпосередньо під час процесу, а мікробіологічна чистота культури після вирощування культури в посівному апараті</p>	<p>t = 24 °C, рН = 4,0, τ = 24 год, w = 2 л/л×хв відсутність сторонньої мікрофлори</p>
<p>Кт, Км, Кх 4.7 Виробничий біосинтез</p>	<p>Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, рН середовища, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси</p>	<p>Термометр, рН-метр, тахометр, прямий метод визначення біомаси</p>	<p>Під час вирощування культури у ферментері. Відбір проби культуральної рідини відбувається кожні 4-6 год</p>	<p>t = 24 °C, рН = 5,0, τ = 96 год, w = 2 л/л×хв., відсутність сторонньої мікрофлори, концентрація декстранази 4,4 г/л</p>

8.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється шляхом розсіву культури на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопуванням.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі з триптон-соевим агаром (ТСА) або м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) – для виявлення дріжджів і грибів. Колонії *P. piscarium* БИМ Г-102 об'ємні, за 14 днів досягають діаметра 6 см, білі або світло-сірувато-оливкові, концентрично зональні, пухко-пушисті, спороносіння слабе. Запах відсутній. Реверс кремовий до ледве жовтого чи рожевого. На агарі з солодовим екстрактом колонії з незабарвленим реверсом. (рис. 8.1) [21].

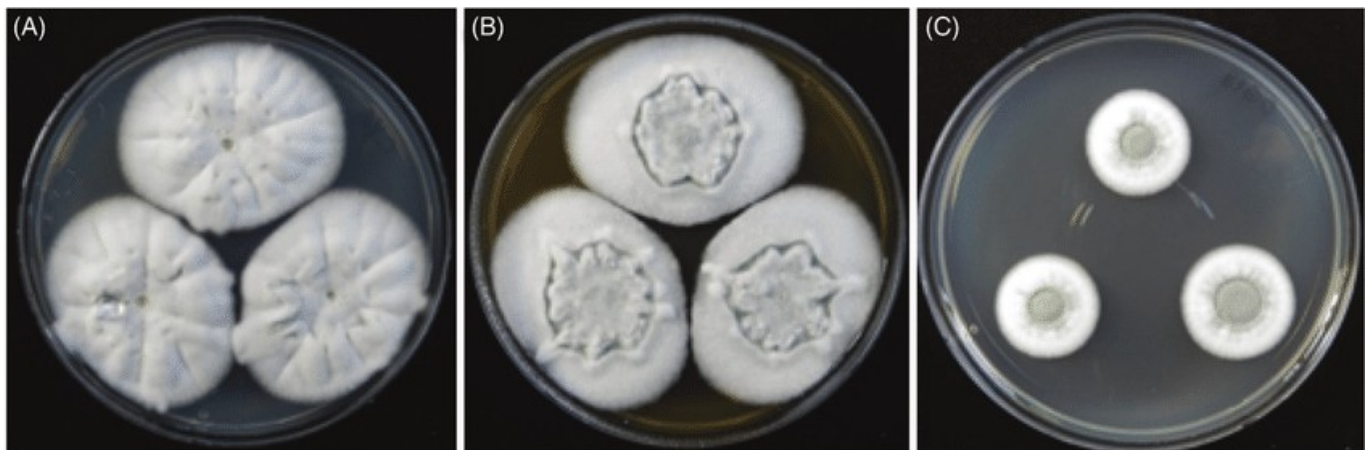


Рис. 8.1. Культура *P. piscarium* БИМ Г-102: – колонії на агаризованому середовищі.

Для мікроскопування використовують метод “розчавлена крапля”. Шматочок грибниці потрібно покласти в краплю води, нанесену на предметне скло, і зверху накрити покривним склом. Надлишок рідини слід видалити за допомогою фільтрувального паперу[22].

За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити вегетативний міцелій гриба, розгалужений, прозорий, складається з безлічі клітин. Від гіфів відходять прямостоячі або витягнуті конідієносії. Ці утворення розгалужуються у верхньому відділі і формують пензлики, що несуть ланцюжки одноклітинних забарвлених спор – конідій, які можна побачити при мікроскопіюванні.

Пензлики гриба можуть бути декількох видів: одноярусні, двоярусні, троярусні і несиметричні (Рис. 8.2) [47].

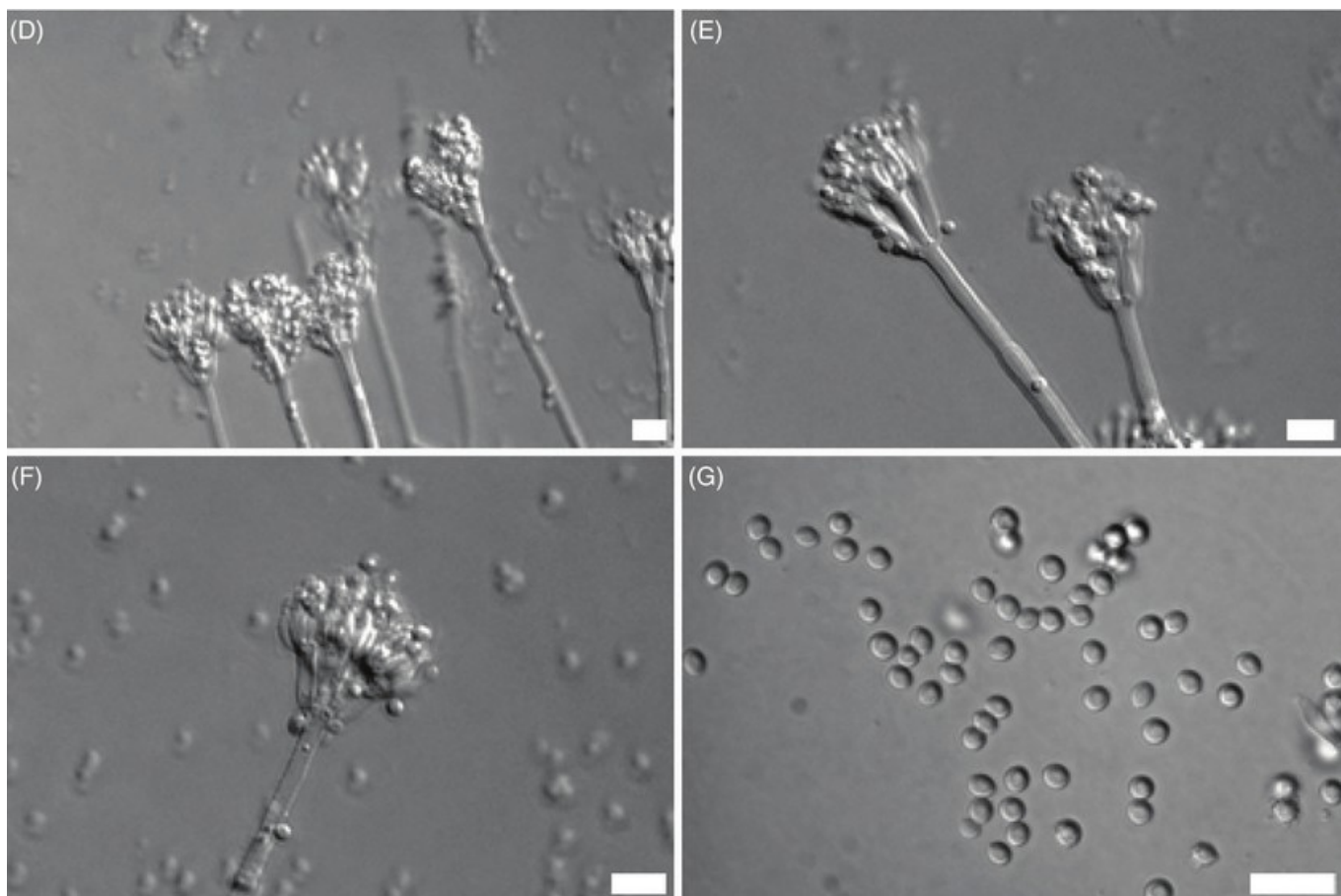


Рис. 8.2. (D, E, F) пеніцилли, (G) конідії

8.3. Показники росту і синтезу

8.3.1. Концентрація біомаси

250 мл культуральної рідини центрифугують 25 хв при 4000 об/хв. Після закінчення центрифугування надосадову рідину зливають, осаджений міцелій відмивають і в скляних попередньо зважених бюксах заносять у сушильну шафу, де вони знаходяться 2 години при температурі 110°C. Згодом, бюкси виймають пінцетом з сушильної шафи і переносять в ексікатор з безводним CaCl₂. Через годину бюкси зважують з точністю до 0,1 г і визначають концентрацію біомаси [22].

8.4. Активність декстранази

Активність ферментів виражають в міжнародних одиницях активності. Кількість ферменту, яка каталізує перетворення 1 мікромоль субстрату на продукт реакції за 1 хв у стандартних (оптимальних) умовах називається міжнародною одиницею (МО). Для оцінки кількості молекул фермента визначають питому активність – це

кількість одиниць фермента в зразку, розділена на масу білка (мг) у цьому зразку. За цією величиною аналізують ступінь очистки фермента: чим менше сторонніх білків, тим вища питома активність. Кількість молекул субстрату, які перетворюються однією молекулою ферменту на продукт у процесі реакції за одиницю часу при повному насиченні ферменту субстратом, прийнято називати числом обертів ферменту, або молярною активністю. Ця активність виражається в каталах на 1 моль ферменту.

Активність ферменту можна визначити опосередковано: за визначенням кількості продукту, який утворився під дією ферменту або за кількістю витраченого субстрату за одиницю часу при оптимальних умовах ферментативної реакції [48].

Зразок супернатанту фільтрують крізь мембрану, осаджують декстраназу етанолом. Активність позаклітинної декстранази визначають віскозиметричним методом по розріджуючій здатності ферменту з використанням в якості субстрату 0,8%-ного розчину нативного бактеріального декстрану. Для цього до 15 мл 0,8% - ного розчину декстрану в 0,1 М Na - ацетатному буфері (рН 5,0) додають 1 мл супернатанту, який залишився при визначенні концентрації біомаси. Реакційну суміш інкубують при 37 °С. Потім, вимірюють час витікання реакційної суміші на віскозиметрі ВПЖ-2 з діаметром капіляра 0,54-0,56 мм, термостатованому при 37 °С.

Активність декстранази розраховують за формулою [50]:

$$A = C_s^2 \frac{d \frac{1}{\ln \mu}}{dt}$$

Де А – активність, од/л;

C_s – концентрація субстрата, %;

μ – відносна в'язкість;

t – час реакції, сек.

8.5. Концентрація джерел Карбону і Нітрогену

Визначення джерела вуглецю методом Робертса і Калейфа

Осадження всіх наявних полісахаридів етиловим спиртом. Осадження декстрану лужним розчином сульфату міді. Кольорова реакція з фенолом і сульфатною кислотою. Спектрофотометр – довжина хвилі 485 нм.

Розрахунок за формулою: $m_{dextrun} = \frac{1}{A} \times \frac{1}{B} \times \frac{C}{D} \times E \times F \times 10^5$

A- вміст сухих речовин на 100 мл розчину;

B- аліквота проби, взятої для осадження спиртом;

C- об'єм розчину, отриманого після осадження спиртом;

D- аліквота проби, взятої для осадження лужним розчином сульфату міді (мл);

E- об'єм отриманого розчину комплексу декстрана і міді, мл;

F- кількість декстрану, визначена за калібрувальною кривою, мг/мл.

Визначення концентрації загального азоту методом Дюма. Джерелом органічного азоту в середовищі для культивування *P. piscarium* БИМ Г-102 є кукурудзяний екстракт, який містить 1-3% амінного азоту

Визначення концентрації азоту проводять за методом Дюма. Принцип методу полягає в окисненні зразку фугату при високій температурі, відновлення азотних з'єднань до молекулярного азоту та визначення азоту за допомогою спеціально обладнаного детектору.

Для цього зразок фугату змішують з розчином окису міді. Після чого відповідну суміш завантажують у мембранну трубку та спалюють за допомогою кисню при температурі 1030 °C. За рахунок присутності гелію відбувається відновлення азотних з'єднань до молекулярного азоту. Залишки води із газу відбираються за допомогою спеціальної мембранної трубки, а вуглекислий газ забирається за рахунок адсорбентів. Відповідна кількість азоту визначається нітрометром за допомогою TCD-детектору. [49].

Визначення концентрації загального азоту індофеноловим методом. Сполука синього кольору, яка використовується для фотометричного визначення аміаку, утворює істинний розчин і максимум світлопоглинання цієї сполуки знаходиться у видимій області спектра. Визначення проводять при довжині хвилі 625 нм. В основі методу лежить реакція аміаку з фенолом за присутності окисника гіпохлориту або гіпоброміту натрію. Продуктом реакції є індофенол, який у лужному середовищі забарвлює розчини в синій колір.

Відповідно 5 мл супернатанту переносять в 50-міліметрову мірну колбу, додають 5 мл 5-% розчину борної кислоти і розбавляють до 25 мл водою. Сосуд поміщають у

льодяну баню, де охолоджують до -3°C . Потім колбу виймають і вводять в неї піпеткою при перемішуванні 4 мл 5-ного хлораміну Т. Через 20 секунд при інтенсивному перемішуванні додають 10 мл 8-ного розчину фенолу і поміщають на водяну баню 60°C , нагріваючи напротязі 16 хвилин. Потім піпеткою при перемішуванні додають 5 мл 3 м гідроксиду натрію. Охолоджують до кімнатної температури та визначають оптичну густина при 625 нм, на фотоелектроколориметрі [49].

Концентрація неорганічного азоту. Ще одним джерелом азоту в середовищі є натрієва сіль (NaNO_3), її концентрацію визначають оксидиметричним методом.

Натрій нітрат в кислому середовищі окиснює сульфат заліза(II) до сульфату заліза (III):



Надлишок FeSO_4 титрують, окислюючи його перманганатом калію до появи незникаючого рожевого кольору. Далі проводять розрахунки [26].

8.6. Показники якості декстранази

Визначення активності інкапсульованої декстранази

Мікрокапсули масою 1 г змішують з 0,1М сольовим розчином фосфатного буферу (PBS, pH 6,0); 125 мкл розчину мікрокапсул змішують з 125 мкл розчину декстрану (20 мг/мл) впродовж 30 хв, щоб реакція закінчилася. Крім того, в пробірку піпеткою вносять 250 мкл реагенту DNS. Всі пробірки занурюють в киплячу водяну баню на 15 хв. Реакційний розчин переносять піпеткою в мікропланшет. Реакцію вимірювали за допомогою УФ-спектрофотометра при довжині хвилі 540 нм [36].

Характеристика і середній розмір частинок контролюється за допомогою програмного забезпечення ZEN lite для візуалізації стереомікроскопії згідно з інструкціями [36].

РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва

9.1. Опис апаратурно-технологічної схеми автоматизації

Після стерилізації поживного середовища у збірниках воно подається у виробничий ферментер ФР-11, готуються розчини соляної кислоти і NaOH в збірниках 3-17, 3-18 та передається самопливом у ферментер для подальшого підтримання рН середовища у виробничому ферментері.

Культивування продуцента починається з моменту засівання стерильного поживного середовища посівним матеріалом.

Ферментер - апарат для глибинного вирощування (культивування) мікроорганізмів в живильному середовищі в умовах стерильності, інтенсивного перемішування, безперервного продування стерильним повітрям і постійної температури. Ферментер є герметичною циліндровою посудиною – корпусом, забезпеченим барботером для подачі стерильного повітря і мішалкою з електроприводом. Ферментер великих розмірів виготовляється з неіржавіючої сталі (вони мають парову сорочку для стерилізації і підтримка температури). Ферментер як правило, обладнаний пристроями для виміру і регулювання температури, кількості повітря, що продувається, і тиску усередині. У разі потреби ферментер додатково забезпечується пристроями для виміру і регулювання рН середовища, концентрації розчиненого кисню в культуральній рідині, вуглекислого газу в повітрі, що виходить, сигналізатором рівня піни і пристосуваннями для механічного або хімічного піногасіння.

Розробка ПЛК привела в останні роки до створення систем управління, привабливих і за ціною, і за ефективністю регулювання. ПЛК має багато переваг і при застосуванні в традиційних, порівняно простих системах управління, що складаються з окремих регуляторів, кожен з яких підтримує задане значення певного параметра безвідносно до інших параметрів, що може сильно вплинути на підтримку заданих значень.

					НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Харченко О.В.			РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		Старовойтова С.О.					99	120
<i>Реценз.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		Пирог Т.П.						
								101

Це означає, що кваліфікація оператора менше позначається на роботі установки а, також, якість продукції, що дозволяє точніше дотримуватися технічні умови. ПЛК також є ідеальним засобом пуску і зупинки всієї установки. Це виключає непродуктивну трату часу. Крім того, ПЛК управляє роботою клапанів і насосів в циклах безрозбірного миття установки. ПЛК значно полегшує реєстрацію даних.

Відобразимо апарати на схемі виробничого біосинтезу (див. Рис.9.1):

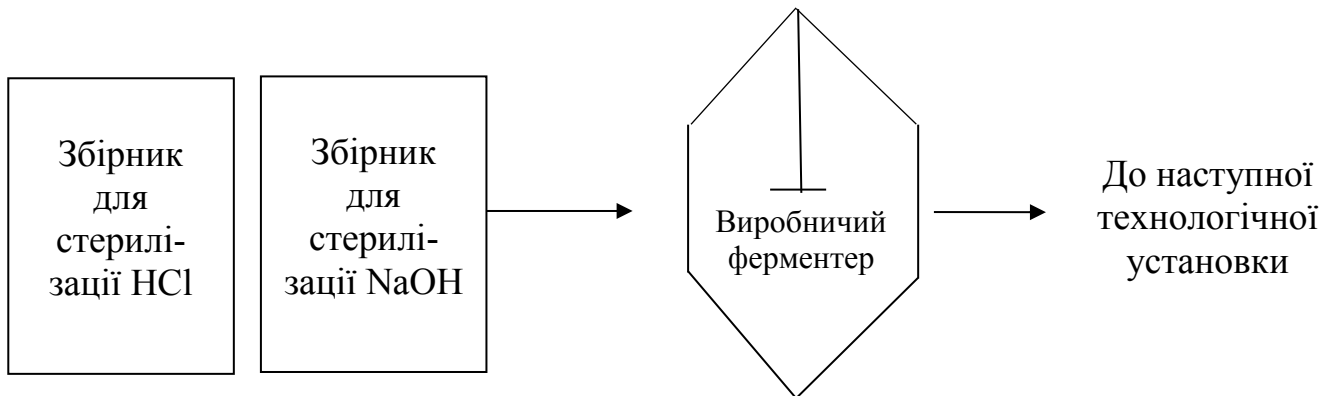


Рис. 9.1. Машинно-апаратурна схема процесу виробничого біосинтезу

9.2. Завдання на розробку схеми автоматизації

Таблиця 9.1.

№	Машина, агрегат, установка	Параметр	Значення параметру	Вид автоматизації	Характер контролю та управління	Засіб управління та контролю, реалізації
1	Ємність для лугу(гідроксид натрію)	Рівень рідини в апараті	$80\% \pm 3\%$	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
		Температура	$131^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
2	Ємність для HCl	Рівень рідини в апараті	$80\% \pm 3\%$	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
		Температура	$131^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
3	Насос	Стан насосу подачі: з збірника в сушарку	Ввімкнено / вимкнено	Управління	Ручне/дистанційне	Пуск/зупинка з АРМ оператора
4	Виробничий ферментер	Рівень рідини в апараті	$80\% \pm 3\%$	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора

	Час культивування	120 год	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
	Рівень рН середовища	5 од. рН	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
			Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату кислоти і лугу
	Температура середовища	24±2°C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
			Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
	Концентрація розчиненого кисню	0,01м ³ /м ³ ·хв	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
			Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
	Інтенсивність перемішування	220 об/хв	Контроль	Відображення,реєстрація	АРМ оператора
			Управління	Пуск/стоп,зміна частоти	Частотний перетворювач
	Надлишковий тиск в апараті	0,5 МПа	Контроль	Відображення,реєстрація	АРМ оператора

9.3. Опис функціональної схеми автоматизації

Так у відповідності з завданням, сформованим у таблиці 9.1 опишемо схему автоматизації.

У **першому контурі** автоматичного контролю і управління, в збірниках для NaOH і HCl необхідно контролювати рівень титруючого агента і температуру для стерилізації, яка має регламентоване значення $131 \pm 2^\circ\text{C}$. Рівень суміші контролюється датчиком рівня LE 1a. Принцип дії датчика рівня полягає в тому, що при русі суміші знизу догори при досягненні датчика він автоматично замикається та посилає сигнал на контролер.

Спостереження за зміною температури передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін у його архіві. Для регулювання температури передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок подачі гарячої пари.

Температура вимірюється датчиком термоперетворювачем опору (1a). Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від температури здійснюється управління подачею пари регулюючим органом – пневматичним регулюючим клапаном (1в), що приводиться в дію за допомогою перетворювача електропневматичного (1б). Лінії зв'язку позначені цифрами 3,4.

У **другому контурі** автоматичного контролю і управління, в ферментері необхідно контролювати і регулювати температуру для ферментації, яка має регламентоване значення $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

Спостереження за зміною температури передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін у його архіві. Для регулювання температури передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок подачі гарячої пари.

Температура вимірюється датчиком термоперетворювачем опору (2a). Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від температури здійснюється управління подачею повітря регулюючим органом – пневматичним регулюючим клапаном (2в), що приводиться в дію за допомогою перетворювача електропневматичного (42). Лінії зв'язку позначені цифрами 7,8.

У **третьому контурі** автоматичного контролю, в ферментері необхідно контролювати і регулювати рН для ферментації, яке має регламентоване значення 5 од. рН.

Рівень рН вимірюється датчиком (3а). Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від рН здійснюється управління подачею кислоти або лугу регулюючим органом – пневматичним регулюючим клапаном (3в, 3д), що приводиться в дію за допомогою перетворювача електропневматичного (3б, 3г). Лінії зв'язку позначені цифрами 10,11.

У **четвертому контурі** автоматичного контролю, в ферментері необхідно контролювати тиск для ферментації, який має регламентоване значення 0,5 МПа.

Тиск вимірюється датчиком (4а).

У **п'ятому контурі** автоматичного контролю і управління, в ферментері необхідно контролювати і регулювати повітря для ферментації, яке має регламентоване значення $0,01\text{м}^3/\text{м}^3\cdot\text{хв}$.

Повітря вимірюється датчиком розчиненого повітря (5а). Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від концентрації повітря здійснюється управління подачею повітря регулюючим органом - пневматичним регулюючим клапаном (5б).

У **шостому контурі** автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати і регулювати частоту обертання мішалки, яка має регламентоване значення 220 об/хв.

Спостереження за зміною частоти обертання передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін у його архіві. Для управління частотою обертання ротора передбачається її зміна за допомогою частотного перетворювача (6а). Для забезпечення безаварійної роботи необхідно використати елементи управління (кнопки «Пуск» та «Стоп») в «ручному режимі» а безпосередньо біля насосів («по місцю») SB1.

У **сьомому контурі** автоматичного контролю, в ферментері необхідно контролювати рівень даного продукту, який має становити $80\%\pm 3\%$. Концентрат, який поступає, в апараті контролюється рівень суміші датчиком рівня LE 7а.

Принцип дії датчика рівня полягає в тому, що при русі суміші знизу догори при досягненні датчика він автоматично замикається та посиляє сигнал на контролер.

9.4. Специфікація на прилади та засоби автоматизації

Таблиця 8.4.1

№	№ позиції	Найменування і технічна характеристика засобу	Тип, модель	Виробник
1	2	3	4	5
1	1а	Ємнісний датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 265-4000мм, максимальна допустима температура +125 °С, максимальний допустимий тиск 10бар, під'єднання G5/4, аналоговий вхід, точність 2мм	NMC	Kobold.
1	2а	Біметалевий термометр, діапазон вимірювань: 0...+250 °С, максимальний допустимий тиск 25бар, під'єднання G1/2, клас точності 1,0, довжина штуцера 100мм.	ТБ	ПАО „Склоприбор”, Україна
2	2б	Перетворювач електропневматичний, вхідний сигнал 4...20 мА, вихідний сигнал 20–100 кПа, номінальний тиск 140 кПа. клас точності 1,0, аналоговий вихід	ЭП-1324	ЧП "КОМП" (Україна)
3	2в	Клапан регулюючий пневматичний, управляючий сигнал 20-100 кПа, допустима максимальна температура 550 °С .	GV2	Doruk Endustri (Туреччина)
4	2д	Електромагнітний клапан з котушкою, матеріал виготовлення: латунь, напруга живлення котушки ~230В, =24В,	316294	JAKSA

		під'єднання: G1/8...G2		
5	3а	Ємнісний датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 265-4000мм, максимальна допустима температура +125 °С, максимальний допустимий тиск 10бар, під'єднання G5/4, аналоговий вхід, точність 2мм	NMC	Kobold.
6	4а	Датчик температури - термоперетворювач опору, вихідний сигнал 4...20 мА, клас точності – 0,25 %, діапазон вимірювань: - 50...200 °С . Матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, аналоговий вхід	50M	«ТЕРА» (Україна)
7	4б	Перетворювач електропневматичний, вхідний сигнал 4...20 мА, вихідний сигнал 20–100 кПа, номінальний тиск 140 кПа. клас точності 1,0, аналоговий вихід	ЭП-1324	ЧП "КОМП" (Україна)
8	4в	Клапан регулюючий пневматичний, управляючий сигнал 20-100 кПа, допустима максимальна температура 550 °С .	GV2	Doruk Endustri (Туреччина)
9	4д	Електромагнітний клапан з котушкою, матеріал виготовлення: латунь, напруга живлення котушки ~230В, =24В, під'єднання: G1/8...G2	316294	JAKSA
10	5а	pH електроди, матеріал скло, пластик, діапазон вимірювань pH 1...12, максимальна температура до 80 °С, максимальний допустимий тиск 6 бар	APS	Kobold
11	5б	Перетворювач вимірювання pH і окисно-відновного потенціалу, аналоговий вихід	APM-Z	Kobold

12	6a	Диференційний перетворювач тиску, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, під'єднання 1/2 NPT, кластичності 0,075, вихідний сигнал аналоговий	PAD	Kobold
13	SB1	Двоклавішна кнопка станція «Пуск»- «Стоп» 1НО+1НЗ,	8LP2T B7113	Lovato

РОЗДІЛ 10 Охорона довкілля

10.1. АНАЛІЗ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ДЕКСТРАНАЗИ

Технологія одержання декстранази включає доферментаційні допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, приготування і стерилізація розчинів для титрування, підготовка і стерилізація піногасника, приготування і стерилізація поживного середовища для одержання посівного матеріалу, приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу декстранази та ферментаційні технологічні процеси (одержання посівного матеріалу, біосинтез декстранази) та післяферментаційні технологічні процеси (фільтрування, концентрування, інкапсуляція, промивання).

1. Санітарна підготовка виробництва. Даний етап включає щоденне і генеральне прибирання приміщення із застосуванням миючих засобів «Біомой» і «Ніка-екстра М Профі», так як вони є миючо-дезінфікуючими засобами, то це дозволить значно заощадити кошти. Дані засоби використовують з інтервалом в 3 місяці, що дозволяє запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів.

Після обробки відпрацьований мийний розчин надходить до каналізації. Миття резервуарів обладнання здійснюють за допомогою СІР-мийки із застосуванням засобу «deconex СІР acid». Після обробки промивна вода надходить до каналізації, а відпрацьований розчин «deconex СІР acid» повторно використовується для обробки у СІР-мийці. Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії невеликих об'ємів рідких відходів.

2. Приготування і стерилізація розчинів для титрування. Етап передбачає підготовку 6% розчину гідроксиду натрію і 6% розчину хлоридної кислоти. Розчини подаються для регуляції рівня рН до 5,0 під час отримання посівного матеріалу у інокуляторах і виробничого біосинтезу в ферментері. Рідкі відходи на даному етапі виробництва можуть утворюватися лише у випадку невідповідності титрувальних

					НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 10 Охорона довкілля		
Розроб.		Харченко О.В.					
Перевір.		Старовойтова С.О.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.			Літ.	Арк.	Акрушіє
						108	120
					Кафедра БТМ		

розчинів нормативним показникам і рівню асептики. Так, відходи титрувальних агентів не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів.

3. Підготовка піногасника. Етап передбачає стерилізацію піногасника «Nikkol CO-20TX» у збірнику з електротеном. Піногасник подається для регуляції рівня піни під час отримання посівного матеріалу у інокуляторах і виробничого біосинтезу в ферментері. Відходи піногасника не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів.

4. Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу. На даному етапі існує можливість виявлення невідповідності сировини заявленим нормам із наступним її відбракуванням. Тверді відходи даного етапу представлено пакувальними матеріалами від сировини для приготування поживного середовища. Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії твердих відходів.

5. Підготовка посівного матеріалу. Етап передбачає отримання і масштабування посівного матеріалу в інокуляторах і посівному апараті. Зважаючи на те, що посівний матеріал використовується для засіву ферментера і, як наслідок, виробничого біосинтезу, відходи від посівного матеріалу не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів. Варто зауважити, що культура-продуцент *Penicillium piscarium* БИМ Г-102 належить до облігатних аеробів, під час культивування необхідно забезпечити достатній рівень аерації поживного середовища. Відповідно, у процесі культивування виникає великий об'єм відпрацьованого повітря. Оскільки продуцент належить до міцеліальних грибів, відпрацьоване повітря на виході з інокулятора буде містити аерозоль грибних спор. Так, передбачаємо, що даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.

6. Виробничий біосинтез. Даний етап передбачає отримання культуральної рідини, у якій накопичується цільовий продукт –декстраназа. Оскільки культуральна рідина далі надходить до збірника для виділення цільового продукту, рідкі відходи на даному етапі не враховуємо. Відпрацьоване повітря на виході з виробничого ферментера

містить аерозоль грибних спор. Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.

7. Фільтрування КР. На даному етапі відбувається фільтрування культуральної рідини за допомогою рамного фільтр-преса. Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії твердих відходів.

8. Концентрування. Концентрування відбувається на ультрафільтраційній установці з утворенням концентрату та пермеату. Даний етап є місцем емісії рідких відходів.

9. Інкапсулювання. При інкапсулюванні в альгінатний матрикс використовується розчин CaCl_2 , частина якого йде на повторне використання, а решта зливається в каналізацію. Даний етап є місцем емісії рідких відходів, так само як і подальше фільтрування мікрокапсул.

10. Промивання водою. Мікрокапсули промиваються питною водою, вода після промивання містить в собі CaCl_2 , так само, утворюються рідкі відходи.

11. Сушіння. Процес сушіння мікрокапсул відбувається на багатострічковій сушарці. Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.

10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

Розрахунок об'ємів відходів. Для щоденного прибирання готують 0,2% розчин «Дезактин», тому за один цикл виробництва (128 год \approx 5,3 доби) витрачається 3,2 л робочого розчину, який після відпрацювання зливається в каналізацію. За весь цикл виробництва проводять одне генеральне прибирання 0,4% розчином «Ніка-екстра М Профі». Річний об'єм відходів – 12,6 л. Миття обладнання здійснюють 0,5% розчином «Біомой», об'єм відходів за один цикл – 290 л. Усі мийні засоби є безпечними для навколишнього середовища і мають клас безпеки – III-IV.

За один цикл виробництва декстранази отримують $24,17 \text{ м}^3$ культуральної рідини. Беручи до уваги, що у культуральній рідині концентрація біомаси – 7,2 г/л, а декстранази – 4,4 г/л, приблизний об'єм відфільтрованої культуральної рідини з вилученою біомасою і декстраназою за один цикл складає: $24,17 - (4,4 \times 24,17) - (7,2 \times 24,17) = 18,17 \text{ м}^3$. На етапі промивання культуральної рідини додають 3 м^3

промивної води. Так, приблизний загальний об'єм пермеату відфільтрованої культуральної рідини становить: $18,17 + 3 = 21,17 \text{ м}^3$. Річний об'єм пермеату становить: $21,17 \times 1,2 = 25,4 \text{ м}^3$. Даний пермеат є рідким відходом виробництва декстранази, до складу якого входить вода, залишки поживного середовища (декстран, кукурудзяний екстракт, солі), сліди декстранази, залишки біомаси.

Заходи для зменшення об'ємів рідких відходів. Для зменшення об'єму відпрацьованого миючого розчину «Дезактин» пропонуємо використовувати СІР-мийку, яка дає можливість повторно використовувати мийний розчин після його фільтрування. Об'єм рідких відходів, а саме об'єм промивних вод, на етапі виділення цілового продукту можна зменшити шляхом повторного використання промивної води після її попереднього очищення.

Утилізація рідких відходів. Біохімічне очищення стічних вод виробництва декстранази здійснюють в аеротенках. Внесення в реакційну суміш, яка складається із стічних вод і активного мулу, гетерогенних металокомплексних каталізаторів. Гетерогенні металокомплексні каталізатори, внесені в реакційну суміш стічних вод і активного мулу, оксинюють забруднювачі за рахунок здатності до оборотного зв'язування кисню за допомогою координуваних іонів перехідних металів. У свою чергу, мікроорганізми активного мулу іммобілізуються на каталізаторі, проте не знижують його каталітичну здатність, а навпаки підвищують її. Прикладом такого каталізатору є діоксид титану, який не розчиняється у воді і легко може бути видалений у відстійниках [51]. Процес очищення рідких відходів здійснюється за наступною схемою. Спершу відбувається вилучення твердих і завислих часток на решітках і пісковловлювачах з подальшою механічною очисткою вод у первинних відстійниках. Після цього стічна вода надходить до аеротенку в який надходить каталітичний окиснювач і циркулюючий активний мул, а також стиснене повітря. Далі реакційна суміш надходить до вторинного відстійника, де вона звільняється від суспензії активного мулу. Після цього вода надходить до реактора змішування, куди надходить хлор для знезараження води. Знезаражена вода надходить у контактний резервуар, звідки може випускатися у водойми, або повторно використовуватись для технічних цілей.

Характеристика твердих відходів у виробництві декстранази

Розрахунок об'ємів відходів. Тверді відходи етапу санітарної підготовки виробництва і підготовки поживних середовищ представлені пакувальною тарою для мийних засобів і компонентів поживного середовища. Тара для мийних засобів виготовлена із поліетилену високої щільності, який піддається вторинній переробці. Деякі компоненти поживного середовища поставляються в упаковці з полівініл хлориду, який вважають важко піддається вторинній переробці і тому його заборонено утилізувати разом з іншими видами пластику. Оскільки продуцент є потенційним збудником пеніцильозу людини або тварини, тому відходи від його культивування потребують деконтамінації.

Утилізація твердих відходів. Зважаючи на невеликі обсяги твердих відходів на даному виробництві, необхідності зменшення їхніх обсягів немає. Для утилізації тари від мийних засобів і компонентів поживного середовища їх попередньо сортують і відправляють до пунктів прийому вторсировини. Відпрацьований міцелій представляє собою відпрацьовану біомасу продуцента. Окрім біомаси міцелій може містити сліди декстранази та залишки органічних кислот, які при надходженні у навколишнє середовище, зокрема ґрунт, можуть чинити негативний вплив. Тому, необхідно передбачити заходи звільнення міцеліальної маси від антибіотиків і органічних кислот. Утилізацію міцеліальних відходів можна здійснити шляхом вермикультивування гнійних червів – *Eisenia foetida*. У суміш міцеліальних відходів з 5-25% органічних добавок (деревна стружка, солома, перегній) у весь об'єм запускають черви *Eisenia foetida* (50-200 штук на 1 кг суміші). За 20-30 діб черви мігрують у верхній шар товщиною до 10 см, який можна видалити і використати для повторного засіву наступної партії міцеліальних відходів [52]. Відходи міцелію, які було утилізовано червами, не містять антибіотиків. Такі відходи можна використовувати як добрива у сільському господарстві або направлені на депонування без загрози навколишньому середовищу.

Заходи для зменшення об'ємів газоповітряних відходів. Відпрацьоване очищене повітря після ферментації, яке містить вуглекислий газ, можна повторно використовувати в якості поживного газового субстрату при вирощуванні

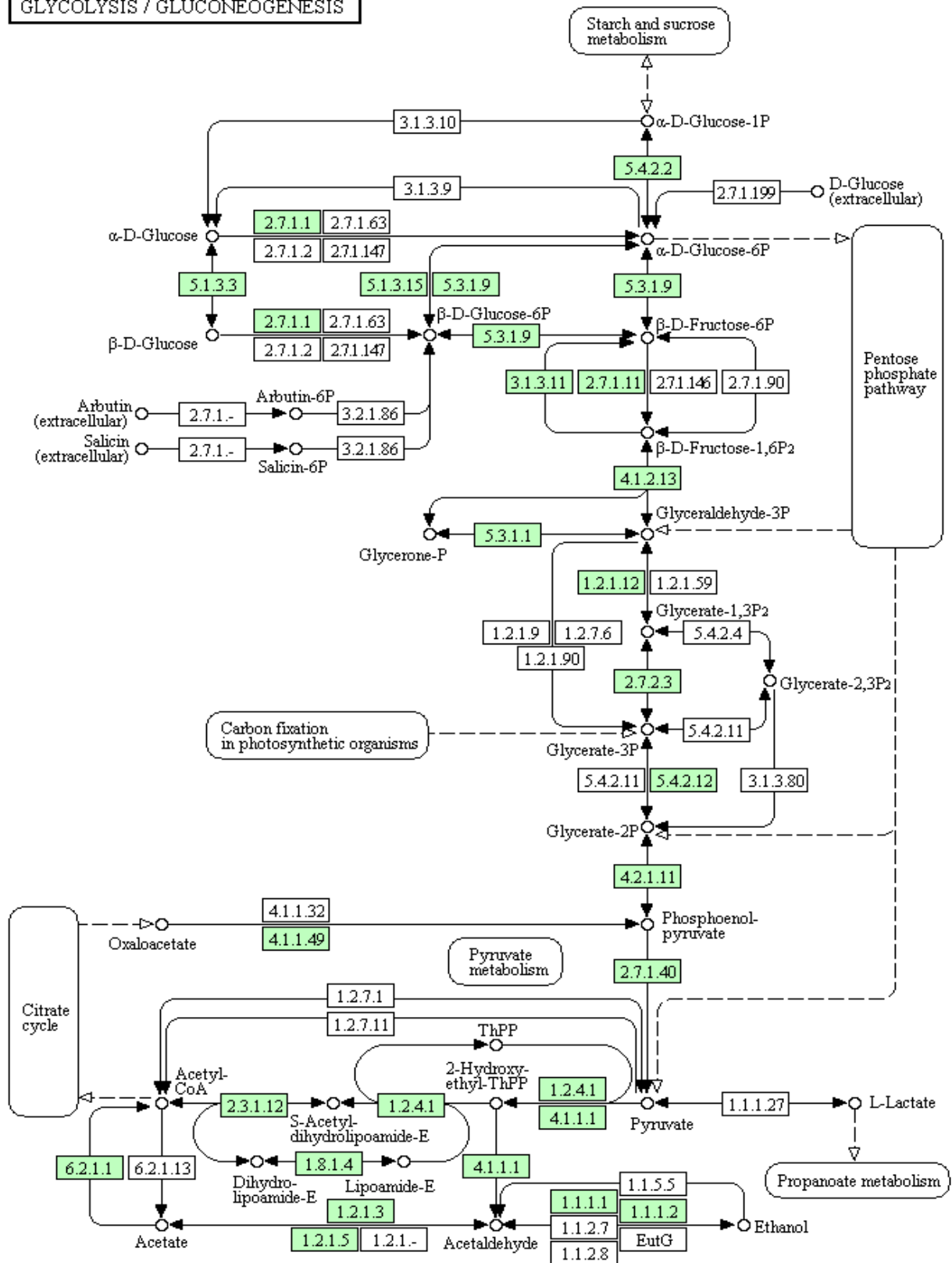
водоростей. Для зменшення обсягів газоподібних відходів при процесі сушіння передбачають використання сушарок з економною витратою сушильних агентів.

Утилізація газоповітряних відходів. Утилізацію газоповітряних відходів можна здійснювати фізико-хімічним методом. Відпрацьоване повітря за допомогою циркуляційного насоса надходить до трьохсекційної абсорбційної камери. У якості рідкого сорбенту у камері використовують водний розчин перекису водню або хлораміну. Даний етап є першим ступенем очищення повітря від аерозолі спор. Для другого ступеня очищення відпрацьованого повітря для повної стерилізації після абсорберу встановлюють камеру УФ-опромінення [53]. Після 2-ступеневої обробки відпрацьоване повітря можна надалі використовувати у біотехнологічних цілях або випускати у навколишнє середовище.

Висновок: Виробництво ферменту декстранази не несе великої шкоди для навколишнього середовища. Найбільша емісія спостерігається у газоподібних відходах. Через наявність в повітрі спор міцеліальних грибів, повітря потребує додаткової очистки. Відпрацьоване повітря після двохстадійної очистки в абсорбері і камері УФ-випромінювання можна використовувати в якості газового вуглецевого субстрату при культивуванні водоростей. Утилізація рідинних відходів відбувається за допомогою первинного відстоювання для того щоб виділити тверді і завислі часточки.

Таким чином, виробництво декстранази є екологічно безпечним і майже безвідходним за умови використання вищенаведених способів утилізації рідких, твердих і газоподібних відходів.

GLYCOLYSIS / GLUCONEOGENESIS



ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА

1. Амилолитические ферменты; [Электронный ресурс]: Режим доступа: http://chemanalytica.com/book/novyj_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/06_syre_i_produkty_promyshlennosti_organicheskikh_i_neorganicheskikh_veshchestv_chast_II/5426
2. Elvira Khalikova, Petri Susi, Timo Korpela. Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications Microbiol Mol Biol Rev. : 306.doi:10.1128/MMBR.69.2.306-325.2005
3. Індивідуальні заходи профілактики захворювань тканин парадонта; [Електронний ресурс]: Режим доступа: <http://surl.li/arcp>
4. Абдель-Наби М.А., Исмаил А.С., Абдель-Фаттах А.М., Абдель-Фаттах А.М. Приготовление и некоторые свойства иммобилизованной декстраназы *Penicillium funiculosum* 258. Процесс Биохим. 1999; 34 : 391. doi: 10.1016 / S0032-9592 (98) 00127
5. Пат.№: 448220/ Способ получения декстраназы/ Силаев А.Б.; Виноградова К.А; Черкесова Г.В; / - Оpubл. 30.10.1974 – Режим доступа: https://findpatent.ru/img_show/4248134.html
6. Пат.№: 1756355/ Способ получения декстраназы/ Молодова; Зинченко; Данилова; Лобанок/ - Оpubл. 19.11.1986
7. Пат.№ 747889/ Штамм гриба бим г-102 продуцент декстраназы/ Зинченко, Лобанок/ - Оpubл. 15.07.80
8. Botton V., Breton A., Fèvre M., Guy Ph., Larpent J.P., Veau P. (1985) Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Ed. Masson, p 174, 212, 214, 218, 293, 308
9. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*; [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614000074>
10. Abdel-Hafez S.I., Shoreit A.A., Abdel-Hafez A.I., Maghraby O.M. (1986) Mycoflora and mycotoxin-producing fungi of air-dust particles from Egypt Mycopathologia 93 (1), 25-3.

11. [Електронний ресурс] *Penicillium piscarium*. Режим доступу: <https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/name/Penicillium>
12. Хоменко Л.А., Кисельникова Л.П., Смоляр Н.И. Терапевтическая стоматология детского возраста / /— Київ.: Книга плюс, 2013. — 864 с.
13. World Health Organization: Oral health information systems. Режим доступу: http://www.who.int/oral_health/action/information/surveillance/en
14. Безвушко Е.В. Взаємозв'язок карієсу зубів, захворювань тканин пародонта та зубощелепних аномалій у дітей шкільного віку Львівської області / Е.В. Безвушко, Н.Л. Чухрай, Т.Г. Гутор // Практична медицина. — 2010. — Т. 16, № 1. — С. 35-40.
15. Смоляр Н.І. Оцінка визначення ступеня активності карієсу зубів у дітей шкільного віку як одного з показників санації / Н.І. Смоляр, Н.Л. Чухрай // Вісник стоматології. — 2012. — № 4. — С. 97-100.
16. Campus G. The «Significant Caries Index» (SiC): A Critical Approach / G. Campus, G. Solinas, C. Maida, P. Castiglia // Oral Health & Preventive Dentistry. — 2003. — № 1(3). — P. 171-178. Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15641494>.
17. Капітан Т.В. Пропедевтика дитячих хвороб з доглядом за дітьми / Т.В. Капітан. — Вінниця: ДП ДКФ, 2006. — 792 с. 16. Oral Health Surveys: Basic Methods. — 4th edition. — Geneva: World Health Organization, 1997. — 66 p.
18. Oral Health Surveys: Basic Methods. — 4th edition. — Geneva: World Health Organization, 1997. — 66 p.
19. [Електронний ресурс]: Biotene Gentle Mint; Режим доступу: <https://pro-white.ru/product/catalog/biotene-ot-suxosti-vo-rtu/biotene-dry-mouth-toothpaste>
20. [Електронний ресурс]: Світовий ринок декстранази; Режим доступу: <http://surl.li/fpgu>
21. *Penicillium simplicissimum* Thom, *Penicillia*: 335. 1930 BCRC Number:33159; [Електронний ресурс] Режим доступу: http://web-tm.k.bcr-firdi.net/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802270015

22. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
23. Егоров Н. С. Промышленная микробиология: Учеб. пособие для вузов по спец. «Микробиология» и «Биология». – М.: Высш. шк., 1989. – 688 с.
24. В. И. Чуешов. Промышленная технология лекарств: Учеб.: В 2-х т. Т. 1 / О.И. Зайцев, С.Т. Шебанова, М.Ю. Чернов; Под ред. В.И. Чуешова. – Х.: НФАУ, 2002. – 560 с.
25. Неме Тахоному NCBI. Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>
26. Микитюк О. М., Грицайчук В.В., Злотін О.З. Основи екології: Навч. посіб. – 2-ге вид., стереотипне. – Харків: «ОВС», 2004. – 144 с.
27. Лоева И.Д., Шинкевич Н.Г. Загрязнение атмосферного воздуха автомобильным транспортом // Причорноморський екологічний бюлетень. – 2006. - №1(198). – С. 107 – 112.
28. ФЯУ – воздушный фильтр грубой очистки [Электронный ресурс] // Вентиляторный завод «Укрвентсистемы» – Режим доступу: <http://www.ukrvent.com/fyay.html>.
29. Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» від 14.12.2001. – № 502.
30. Биосан [Электронный ресурс] // Режим доступу: http://gryazi.net/moyushchie_i_dezinfitsiruyushchie_sredstva/katalog/seriya_biosan/biosan.
31. Биомой – предстерилизационное средство [Электронный ресурс] // Режим доступу: <http://www.farmakos.ua/bimoj.html>
32. Супераль К — мощное средство для удаления органических и неорганических загрязнений [Электронный ресурс] // Компания «Нова – Хим» – Режим доступу: <http://nova-him.prom.ua/p3413119-superal-moyuschee-sredstvo.html>.
33. Дезактин – инструкция и описание препарата [Электронный ресурс] // Режим доступу: http://www.ru-med.com.ua/dezaktin_drugID10658/.
34. Средство дезинфицирующее «Ника-экстра М Профи» – инструкция и

- описание препарата [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://geniks.com.ua/produkcija/dezinfecirijyschie_sredstva_v_medicine/nika_ekstram_profi.html.
35. *Средство* дезинфицирующее «Ника-экстра М Профи» – инструкция и описание препарата [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://geniks.com.ua/produkcija/dezinfecirijyschie_sredstva_v_medicine/nika_ekstram_profi.html.
36. *Nucharee Juntarachot, Duangporn Kantachote, Sartjin Peerajan, Sasithorn Sirilun, and Chaiyavat Chaiyasut*; Optimization of Fungal Dextranase Production and Its Antibiofilm Activity, Encapsulation and Stability in Toothpaste. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33081074/>
37. *Пирог Т. П., Игнатова О. А.* Загальна біотехнологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с.
38. Отделение биомассы: флотация, фильтрование и центрифугирование – электронный ресурс. – режим доступа: <https://students-library.com/library/read/30008-otdelenie-biomassy-flotacia-filtrovanie-i-centrifugirovanie>
39. *Данилов І.П., Самойленко С.І.* Апарати мікробіологічної промисловості: Навч. посібник – Харків: НТУ «ХПІ», 2008. – 272 с.
40. Способы получения ферментов. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://reshebniki-online.com/node/192646>
41. *Цыперович А.С.* Ферменты (основы химии и технологии). — К.: Техніка, 1971. — 361 с.
42. *Комиссаров А.В., Алешина Ю.А., Громова О.В., Никифоров А.К., Еремин С.А., Волох О.А., Лобовикова О.А., Перепелица А.И.* Применение ультрафильтрации для концентрирования и очистки антигенов // Проблемы особо опасных инфекций. 2015. №1. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/primeneniye-ultrafiltratsii-dlya-kontsentrirovaniya-i-ochistki-antigenov>

43. *Nucharee Juntarachot, Duangporn Kantachote, Sartjin Peerajan, Sasithorn Sirilun, and Chaiyavat Chaiyasut*; Optimization of Fungal Dextranase Production and Its Antibiofilm Activity, Encapsulation and Stability in Toothpaste. Режим доступу: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33081074/>
44. *StephenSwioklo, PingDing, Andrzej W.Pacek, Che J.Connon*. Process parameters for the high-scale production of alginate-encapsulated stem cells for storage and distribution throughout the cell therapy supply chain. Режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.06.005>
45. A microfluidic approach to production of alginate beads for cell encapsulation/ManufacturingChemist / 4-Sep-2019. Режим доступу: https://manufacturingchemist.com/news/article_page/A_microfluidic_approach_to_production_of_alginate_beads_for_cell_encapsulation/157748
46. Паперові мішки з поліетиленовим вкладишем [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://ias.ua/uk/products/paperovi-mishky-z-polietylenovym-vkladyshem>
47. Разнообразие видов *Aspergillus, Penicillium* и *Talaromyces*, выделенных из пресноводных сред в Корею; [Електроний ресурс]: Режим доступу: https://www.researchgate.net/figure/Morphological-characteristics-of-Penicillium-piscarium-KACC-48329-A-C-Colonies-on-CYA_fig4_332454679
48. Александрова К. В. Визначення активності ферментів в біологічних середовищах/ Шкода О. С., Васильєв Д. А., Юрченко Д. М., Запоріжжя, 2015. [Електроний ресурс] Режим доступу: http://dspace.zsmu.edu.ua/bitstream/123456789/1974/1/15Vyznachennya%20aktyvnosti%20fermentiv_6.pdf
49. Ягов Г.В. Современные методы определения общего азота и углерода в пробах природных вод. Вода: химия и экология. 2009, 28 – 33. ISSN: 2072-8158.
50. Патент СРСР на винахід № 459497. Способ получения декстраназы/ Петрова, Бурцева, Молодова/ Оpubл. 05.02.1975.

- 51.Баландина А. Г., Хангильдин Р. И., Мартяшева В. А. Каталитические процессы очистки трудноокисляемых сточных вод и их аппаратурное оформление //Баш. хим. ж. 2015. №3.
- 52.Голубятников М. И., Ануфриев М. А., Бартошевич Ю. Е. Способ утилизации мицелиальных отходов промышленности антибиотиков: пат. С05F1108. № а 201109738 ; заявл. 05.08.2015 ; опубл. 11.03.2016, Бюл. № 5.
53. Перушкина Е.В., Хабибуллина А.Р., Александровский С.А. Выбор способа очистки отработанного воздуха при культивировании спорообразующих бактерий // Вестник Казанского технологического университета. 2014. №19.