МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»	**«До захисту допущено»**
Директор інституту (декан факультету)	Завідувач кафедри
_____ Грегірчак Н.М.	_____ Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)	(підпис) (прізвище та ініціали)
«___» _____ 2020 р.	«___» _____ 2020 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

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

освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Біосинтез курдлану *Alcaligenes faecalis var.myxogenes*

Виконав: здобувач IV курсу, групи 1

Середа Анастасія Володимирівна _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Буценко Людмила Миколаївна _____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач_____
(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет)_____біотехнології та екологічного контролю_____
Кафедра_____біотехнології і мікробіології_____
Освітній ступінь_____бакалавр_____
Спеціальність___162 «Біотехнології та біоінженерія»_____
(код і назва)
Освітньо-професійна програма_____«Біотехнологія»_____
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

_____ Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

_____Середи Анастастасії Володимирівни_____
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи___Біосинтез курдалну *Alcaligenes faecalis var.myxogenes* _____
керівник роботи_____Буценко Л.М., к.б.н., доцент _____
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-кс
2. Строк подання здобувачем роботи__01 червня 2020 року_____
3. Вихідні дані до роботи__біологічний агент: *Alcaligenes faecalis var.myxogenes*_____
цільовий продукт: курдлан_____
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): Обгрунтування біологічного агенту, техніко-економічне обґрунтування, параметри культивування біологічного агенту, способи виділення цільового продукту.
_____
_____
_____
_____
_____
5. Перелік графічного матеріалу
Технологічна схема ділянки доферментаційних робіт та виробничого біосинтезу - 1 аркуш формату А1, 1 аркуш формату А2. Апаратурна схема ділянки доферментаційних робіт та виробничого біосинтезу – 3 аркуші формату А1. Схема автоматизації ділянки біосинтезу – 1 аркуш формату А4._____
_____

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
10	Клименко Олег Миколайович доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютернихтехнологій систем управління	23.03.2020	23.04.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	20.03.2020	
2	Обгрунтування вибору та характеристика біологічного агента	25.03.2020	
3	Техніко-економічне обґрунтування	01.04.2020	
4	Обгрунтування вибору технологічної схеми	05.04.2020	
5	Біосинтез цільового продукту	12.04.2020	
6	Апаратурна схема	20.04.2020	
7	Технологічна схема	25.04.2020	
8	Специфікація	26.04.2020	
9	Матеріальний баланс	28.04.2020	
10	Опис технологічної схеми	05.05.2020	
11	Контроль виробництва	10.05.2020	
12	Автоматизація ділянки виробництва	12.05.2020	
13	Список використаної літератури	18.05.2020	
14	Вступ.Реферат.Зміст	20.05.2020	

Здобувач _____ Середа А.В.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____ Буценко Л.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Реферат

В даному проекті, висвітлено біосинтез, наступне виділення та очищення позаклітинного екзополісахариду курдлану у вигляді сухої порошкоподібної субстанції, яка в подальшому буде використовуватись в якості біологічно активної добавки (БАД) для імунокорекції, імуностимуляції. Біосинтез курдлану здійснює мікроорганізм *Alcaligenes faecalis* WX-C12, який синтезує при рості на середовищі з глюкозою та дріжджовим екстрактом 72 г/л [4] цільового продукту. В ході виконання данної роботи було отримане розрахункове значення потужності виробництва курдлану - 3 880 кг/ рік.

Технологія виробництва курдлану у вигляді порошку включає в собі як допоміжні роботи (приготування мийних засобів; підготовка аераційного повітря; приготування титрувальних агентів; приготування допоміжних речовин та дистильованої води; підготовка та стерилізація поживних середовищ для вирощування посівного матеріалу в колбах, інокуляторах та виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 12,5 м ^{3}), так і з основних важливих технологічних процесів (вирощування посівного матеріалу та сам процес біосинтезу; підготовка культуральної рідини, відділення біомаси, виділення основного цільового продукту методом осадження, очистка курдлану, сушіння до порошку та подальше упакування у товарні форми).

Курсовий проект містить 141 сторінок друкованого тексту, 29 таблиць, 12 рисунків, а також складається зі вступу, 10 розділів, списку використаної літератури (50 джерел) та графічної частини (3 креслень формату А1, 1 креслення формату А2, 1 креслення формату А4).

Ключові слова: *Alcaligenes faecalis, курдлан, імуномодулятори, екзополісахарид, БАД, біополімер, біомаса, виділення, сепарування, осадження, нутч-фільтр, вакуумна шафа.*

Зміст

Реферат……3

Вступ……7

Розділ 1. Характеристика цільового продукту……..9

1.1 Фізико-хімічні властивості курдлану**.....9**

1.2. Застосування курдлану в різних галузях промисловості**.....11**

Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента....13

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування**.....13**

2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента**.....17**

2.2.1 Морфолого-культуральні ознаки**.....18**

2.2.2 Фізіолого-біохімічні ознаки**.....19**

2.3 Таксономічний статус біологічного агента**.....19**

Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....21

3.1 Потреба у цільовому продукті**.....21**

3.2 Розрахунок потужності виробництва**.....25**

3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера**.....28**

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу**.....29**

Розділ 4. Біотрансформація цільового продукту.....33

4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату**.....33**

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт**.....34**

Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....37

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу**.....37**

5.1.1 Обґрунтування способу культивування**.....37**

5.1.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря**.....38**

5.1.3. Обґрунтування вибору мийних та дезинфікувальних засобів**.....40**

5.1.3.1 Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору мийних та дезінфікуючих засобів**.....40**

5.1.3.2 Обґрунтування вибору мийних та дезинфікувальних засобів**.....46**

5.1.3.3 Вибір мийного засобу для обладнання і комунікацій**.....46**

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища……**50**

5.1.4.1 Обгрунтування способу підготовки допоміжних розчинів**.....51**

5.2. Обгрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту**……..52**

5.2.1 Обґрунтування стадій виділення згідно із фізико-хімічними властивостями цільового продукту**.....52**

5.2.2Обґрунтування вибору способу попередньої обробки культуральної рідини**.....54**

5.2.3 Обґрунтування вибору способу відділення біомаси**.....55**

5.2.4 Обгрунтування способу виділення курдлану**.....56**

5.2.5 Обґрунтування способу очищення курдлану**.....56**

5.2.6 Обґрунтування способу сушіння курдлану**.....56**

5.3 Обґрунтування вибору необхідних допоміжних робіт при виділенні цільового продукту**.....59**

Розділ 6. Матеріальний баланс і розрахунок……60

6.1 Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)……..61

6.2 Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу……...62

6.3 Рохрахунок матеріального балансу……74

6.4 Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання……78
6.5 Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування та стерилізації поживного середовища……...79
Розділ 7. Специфікація обладнання.....84
Розділ 8. Опис технологічної схеми.....93
Розділ 9. Контроль виробництва.....113
9.1 Карта постадійного контролю.....113
9.2 Методи контролю до ферментаційних процесів.....120
9.2.1 Мікробіологічний контроль.....120
9.2.2 Визначення концентрації біомаси.....121
9.2.3 Визначення концентрації амонію хлориду.....121
9.2.4 Визначення концентрації цільового продукту.....122
9.3 Методи контролю після ферментаційного виробництва.....123
9.3.1 Структурний аналіз.....123
9.3.2 Технологічний та реологічний аналіз.....124
Розділ 10. Автоматизація ділянки виробництва.....125
10.1 Опис апаратурно-технологічної схеми автоматизації……..….126
10.2 Завдання на розробку схеми-автоматизації.....127
10.3 Вибір засобів автоматизації та опис функціональної схеми автоматизації.....129
10.4 Специфікація на прилади та засоби автоматизації.....131
Список використаної літератури.....134
Графічна частина
Додатки

Вступ

Як відомо, мікроби можуть виробляти різноманітні позаклітинні полісахариди для виживання в суворих умовах. Курдлан за своєю структурою водорозчинний біополімер, який складається з β-D-1,3-глюканів. В свою чергу, β-D-1,3-глюкани можуть бути синтезовані бактеріями, грибами та рослинами, проте великомасштабне виробництво курдлану відбувається саме завдяки мікробіологічному синтезу. Курдлан – природний загущувач, стабілізатор, емульгатор. Новітні дослідження, а саме 2018 року підтверджують його імуномоделюючі властивості та застосування даного екзополісахариду у складі БАД, а також у складі лікарських препаратів [1,3].

Екзополісахарид широко використовується в медицині, хімічній, косметичній, харчовій та ін.галузях промисловості, завдяки своїм реологічним та плівкоутворюючим функціям [2].

Метою роботи є проектування ділянки виробництва (апаратурні та технологічні схеми) курдалну у вигляді порошкоподібної субстанції, шляхом культивування граммнегативними бактеріями *Alcaligenes faecalis* та подальшими технологічними операціями виділення, очищення та упакування у товарну форму – поліетиленові або крафтові мішки.

Актуальність теми – в ході аналізу проведених досліджень, з вивчення властивостей даного полісахариду, виявилось, що курдлан можна застосовувати як імуномоделюючу та імуностимулючу добавку для лікування та профілактики великої кількості хвороб хронічного характеру. На ринку існує багато препартів у складі яких є 1,3-*β*- глюкан у суміші із 1,6-*β*- глюканом від різних виробників. Проте, кращими імуномодулюючими властивостями володіє саме чистий 1,3-*β*- глюкан. Єдиним препаратом, в основі якого є чистий 1,3-*β*- глюкан - є Super Pure 1,3-*β*- глюкан, який виготовляють за допомогою екстракції на основі водоростей та завозять з США,

що є економічно невигідним для споживачів (через високі ціни) та для виробників, так як екстрагувати бета - глюкани на основі водоростей та вилучати їх з клітинної стінки грибів є недоцільним, у порівнянні із високими показниками мікробного синтезу курдлану та новітніми вдосконаленими технологіями підвищення виходу екзополісахариду у промислових умовах.

Тому, розробка вітчизняних препартів на основі мікробного курдлану, який містить лише 1,3-β- глюкани є перспективним напрямком для вирішення економічних та оздоровчих проблем для населення України, так як попередити серйозні вірусно-інфекційні захворювання можуть лише імуномодулюючі препарати.

Новизною даної роботи є оптимізація складу поживного середовища, що істотно підвищують концентрацію готового продукту, а саме – 72 г/л [4], а також вражає час біосинтезу – 48 годин; запропоновано виробництво екзополісахариду курдлану в Україні для виробництва БАД та спосіб очистки курдлану – метод трьохкратного промивання дистильованою водою та подальшим ультрафільтруванням . Доферментаційні процеси супроводжуються новітніми методами контролю культуральної рідини, а саме: - визначення концентрації глюкози за допомогою біосенсорів; визначення концентрації хлориду амонію за допомогою іоноселективного електроду. Післяферментаційні процеси поєднуються з методиками попереднього гелеутворення та осадження, раманівською спектроскопією.

Розділ 1. Характеристика цільового продукту

Курдлан- це позаклітинний полісахарид. В 1964 р. Харада дав йому назву «курдлан» (curdlan) за його здатність коагулювати, або згоратится. Курдлан містить винятково *1,3- β*-глікозидні зв´язки, які часто зустрічаються в природі. Курдлан отримують шляхом культивування штамом бактерій *Alcaligenes faecalis* та подальшим виділенням його з культуральної рідини. Промисловий курдлан може містити продукти розпаду клітини, білки, нуклеїнові кислоти тощо [5].

1.1 Фізико-хімічні властивості курдлану

Курдлан являється одним із біополімерів, відомих як *1,3- β-D*-глюкани. Такі полісахариди характеризуються ланками глюкози, які повторюються, та котрі зв´язані *β*- зв´язком між першим та третім карбонами кільця глюкози (рис.1.1). Структура курдлану нагадує каррагінан, агарозу, гелланову камідь. На відміну від геллану та каррагіннанів курдлан являється нейтральним полісахаридом без кислотних компонентів.

Курдлан нерозчинний у воді при кімнатній температурі, але розчиняється у водному лужному розчині, водному розчині три(етилендиамін)гідроксиді та диметилсульфоксиді (ДМСО). Розчинність лінійних β- (1,3)- глюканів пов’язана зі ступенем полімеризації. Коли ступінь полімеризації перевищує 30-49, то курдлан розчиняється у NaOH та ДМСО (концентрацією більше 0,23 Н) і не розчиняється у воді. Це пов’язано з молекулярним переходом внутрішньої структури. А ступінь полімеризації курдлану становить близько 450 [12]. Тому, обробка солюбілізуючим агентом NaOH дозволить знизити в’язкість та спричинити руйнування системи. Курдлан утворює гель лише при нагріванні, інші фактори, такі як : pH, концентрація цукру, присутність катіонів – виплив на гелеуторювання не здійснюють.

При нагріванні курдлану, в залежності від температури, може утворюватися гель двох видів:

1) Термозворотній гель- утворюється при нагріванні до 55°C і наступним його охолодженням (твердіє за природніх умов).
2) Термонезворотній гель- утворюється при нагріванні вище 80°C [6].

Нерозчинність курдлану пояснюється наявністю екстенсивних внутрішньо- і міжмолекулярних кристалічних доменів, пов'язаних з воднем.

Курдлан нерозчинний у воді, спиртах і більшості органічних розчинників [7]. Рентгенівські дифрактограми ідентифікували три різні форми курдлану: I, II і III, що представляють собою нативний зразок, форму після 140°C, і дегідратацію відповідно. Це дослідження присвоїло всім трьом аналогічні потрійні спіральні структури, але відомо, що курдлан існує як одна спіраль (рис.1.2) [8].

Середня молекулярна маса курдлана знаходиться між $5{,}3 \times 10^4$ і $2{,}0 \times 10^6$ Да. Водна суспензія курдлану має pH 6,0-7,5 [9]. Формула курдлана- $(C_6H_{10}O_5)_n$ [9]. Реєстраційний номер CAS- 54724-00-4 [11].

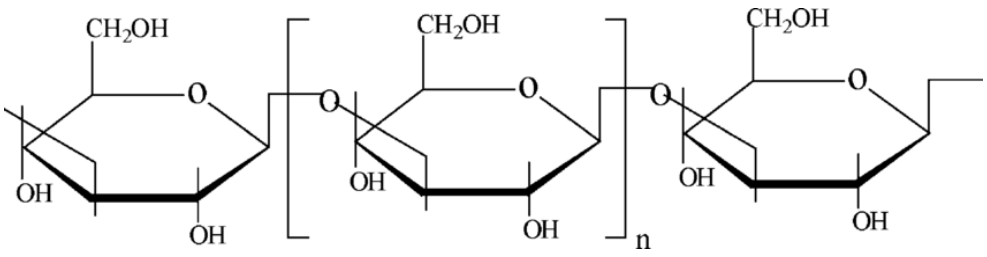

Рис.1.1 **Хімічна структура курдлану** [10].

Рис.1.2 **Електронна мікрофотографія гранул курдлану** [10].

1.2 Застосування курдлану в різних галузях промисловості

В харчовій промисловості: Курдлан не має ні смаку, ні запаху, ні кольору. Він утворює харчовий гель, який можна стерилізувати, заморожувати. Також курдлан застосовують в ролі дієтичної добавки- Е-424 (як згущувач та стабілізатор), яка заборонена в ряді країн, через велику шкоду для організму людини [9,14].

У промисловості курдлан випускають у вигляді порошку жовтуватого кольору або білого без запаху та смаку (рис.1.3) [6].

Рис.1.3 Зовнішній вигляд курдлану [13].

В будівельних матеріалах: Курдлан ефективний як агент для виготовлення суперміцного бетону і також використовуються в якості органічного зв'язуючого агента для кераміки і активованого вугілля.

В медицині: Цікаво, що курдлан і сульфати курдлану мають протипухлинну дію та протидію на ВІЛ. Відомо, що курдлан активує вроджені імунні системи безхребетних, а також клітини ссавців відомий як модифікатор біологічної реакції [9,14].

Розділ 2. Обгрунтування вибору та характеристика біологічного агента

2.1 Обгрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Курдлан є позаклітинним мікробним полісахаридом. Синтезується бактеріями. До числа продуцентів курдлану входять в основному такі роди бактерій – *Agrobacterium, Alcaligenes*, а також *Rhizobium , Cellulomonas,* але нещодавно науковці повідомляли про синтез курдлану за допомогою грампозитивних бактерій, таких як *Bacillus* і *Paenibacillus* [5,15]. Узагальнені дані, щодо різних продуцентів курдлану наведено у (табл.2.1).

Таблиця 2.1

Характеристика продуцентів та поживного середовища для біосинтезу курдлану

Біологічний агент	**Склад поживного середовища, г/л**	**Тривалість культивування, год**	**Вихід курдлану**	**Особливості процесу біосинтезу**	**Виділення цільового продукту**	**Література**
Agrobacterium sp. ATCC 31749	***Середовище:*** глюкоза-50 г; $CaCO_3$-10 г; поліетиленгліколь сорбіт моноолеат-16; дріжджекстр.- 3 г; KH_2PO_4-2,7г ; $(NH_4)_2SO_4$-2г; $MgSO_4$- 0,5 г.	72	51,94	Порційна подача, періодичне культивування. Температура культивування-30 ° С; швидкість переміш. - 400 об / хв, pH-7,0.	Гранули, що містять курдлан ресуспендували в 1 М NaOH при 200 об / хв протягом 3 год. Потім клітини осаджували центрифугуванням протягом 20 хв . pH супернатанту доводять до 7,0 з використанням 2 моль / л HCl Промивають деіонізованою водою і сушать до постійної маси.	[16]
Rhizobium radiobacter CGMCC 12099	***Середовище:*** глюкоза – 50 г; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$-5 г; $(NH_4)_2HPO_4$ - 2 г; $MnSO_4$-2 г; KH_2PO_4 -1,5 г; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$-1 г; $ZnCl_2$-1 г; $MgSO_4$- 0,75 г.	120	65,27	Періодичне культивування, із порційною подачею. Температура культивування-30° С, pH-7,0.	Центрифугували при 6000 g протягом 10 хв.10 мл 0,5 моль / л NaOH додавали до осаду. Потім суміш центрифугували протягом 15 хв. Осад клітин збирали і промивали водою три рази, а потім висушували до постійної ваги при 85ºС. HCl додавали для осадження курдлану, і кінцевий pH розчину доводили до 6,5-7,0.	[17]
***Alcaligenes faecalis* WX-C12**	глюкоза- 50 г ; дріждж. екстр.- 2г; KH_2PO_4 -2г ; NH_4Cl -3,6 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$-0,5 г; 1 мл р-ну мікроел-ів(г/л):$FeCl_3$-1 г; $MnCl_2$-1 г; $CaCl_2$-1 г; NaCl-1г;	48	72	Періодичне культивування, порційне підживлення аміачною водою.	Зразок центрифугували при 8000 об / хв протягом 30 хв при 4 ° С. Гранули, які містять клітини і курдлан ресуспендували в 0,5 М NaOH протягом 1 год. Клітини осаджували центрифугуванням при 8000 об / хв протягом 30 хв. Потім додавали 2,0 М HCl. Промивають і сушать до постійної маси при 80 °С.	[4]

Отже, даний штам, *Alcaligenes faecalis* WX-C12 , продукує найбільшу кількість курлану, а також ефективно використовує компоненти поживного середовища, має великий відсоток економічного показника. максимальне виробництво курдлану - 72 г / л. Проте, така порівняльна характеристика технологічного процесу (див. *табл.2.1*) є недостатньою, тому на наступному етапі вибору біологічного агента порівнювали вартість компонентів поживних середовищ найактивніших продуцентів курдлану (Табл.2.2).

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживного середовища для синтезу курдлану найактивнішими продуцентами

Продуцент	**Компонент поживно-го середовища, г/л**	**Ціна компоне-нта, грн/кг**	**Вартість компонента (грн) на 1 л середовища**	**Джерело інформації ***
A.faecalis WX-C12	глюкоза- 50 г ;	50,40	2,52	[1]
	дріждж.екстр.-2г;	440,0	1,12	[2]
	KH_2PO_4 -2г ;	43,5	0,075	[3]
	NH_4Cl -1,6 г ;	30,0	0,03	[4]
	NaCl-1 г;	5,0	0,005	[5]
	$FeCl_3$-1 г;	37,0	0,037	[6]
	$MnCl_2$-1 г;	112,0	0,112	[7]
	$CaCl_2$-1 г;	3,60	0,0036	[8]
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$-0,5г.	6,9	0,00345	[9]
	Вартість 1 л середовища – 3,8 грн			
R. radiobacter CGMCC 12099	глюкоза – 50г;	50,40	2,52	[1]
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$-5 г;	3,0	0,015	[10]
	$(NH_4)_2HPO_4$- 2г;	10,0	0,02	[11]
	$MnSO_4$-2 г;	24,36	0,0487	[12]
	KH_2PO_4 - 1,5 г;	43,5	0,070	[3]
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$-1 г;	56,0	0,056	[13]
	$ZnCl_2$-1 г;	35,0	0,035	[14]
	$MgSO_4$- 0,75 г.	7,50	0,0056	[15]
	Вартість 1 л середовища –2,77 грн			
Agrobacteri-um ATCC 31749	глюкоза- 50 г;	50,40	2,52	[1]
	Tween-80 -16 г;	210,0	3,36	[16]
	$CaCO_3$-10 г;	4,50	0,045	[17]
	дріждж.екстр. - 3г;	440,0	1,68	[2]
	KH_2PO_4-2,7г ;	43,5	0,127	[3]
	$(NH_4)_2SO_4$-2г.	3,9	0,0078	[18]
	Вартість 1 л середовища –5,94 грн			

Примітка. * – Ціни наведено станом на лютий 2019 року.

[1] https://prom.ua/p701365303-glyukoza-pischevaya.html

[2] https://russian.alibaba.com/product-detail/sost-supply-wholesale-fo html

[3] https://flagma.ua

[4] https://prom.ua/p609981297-ammonij-hloristyj-hlorid.html

[5] https://prom.ua/p518000047-sol-tabletirovannaya-kropivnitskom.html

[6] https://agrobiz.net/fecl3-943665.html

[7] https://russian.alibaba.com/product-detail/98-manganes -formula-mncl2-

[8] https://russian.alibaba.com/product-detail/ dihydrate-cacl2-

[9] https://prom.ua/p97141133-magnij-sernokislyj-7vodnyj.html

[10] https://kirovograd.flagma.ua/sulfat-zheleza-o2423253.html

[11] https://prom.ua/p29068466-sulfat-ammoniya-nh42so4.html

[12] https://ukrkolorhm.prom.ua/p46475690-sulfat-margantsa-.html

[13] https://russian.alibaba.com/product-detail/cocl2-6h2o-cobalt-chloride-

[14] https://harkov.flagma.ua/cink-hloristy-kupit-hlorid-cinka-kupit-.html

[15] https://prom.ua/p662853117-sulfat-magniya.html

[16] https://prom.ua/p19312640-tvin-polisorbat.html

[17] https://prom.ua/p624988399-mel-prirodnyj-molotyj.html

[18] https://krivoyrog.flagma.ua/sulfat-ammoniya-o2123784.html

Отже, згідно табл 2.2, вартість поживного середовища для *Agrobacterium* ATCC 31749 складає 5,94 грн , який продукує 51,94 г курдлану за 72 год культивування. Вартість поживного середовище для *Rhizobium radiobacter* CGMCC 12099 – 2,77 грн, вихід цільового продукту становить 65,27 г/л. Поживне середовище для продуцента *Alcaligenes faecalis* WX-C12 - 3,8 грн,проте вихід курдлану- 72 г за 48 годин.

Для того, щоб обрати найефективніший біологічний агент необхідно розрахувати умовну вартість 1 мг цільового продукту (Табл.2.3).

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 мг цільового продукту – курдлану при культвуванні найефективнішими продуцентами

Біологічний агент	**Вартість 1 л середовища, грн**	**Вихід курдлану, г/л**	**Умовна вартість 1 г кінцевого продукту, грн/г**	**Тривалість культивування, год**	**Кількість утвореного полісахариду за годину, г/год**
Agrobacterium **ATCC 31749**	5,94	51,4	0,114	72	0,72
R. radiobacter **CGMCC 12099**	2,77	65,27	0,042	120	0,54
A.faecalis **WX-C12**	3,8	72	0,05	48	2,5

Узагальнивши всі дані, можна однозначно стверджувати, що для синтезу екзополісахариду курдлану найдоцільніше використовувати *Alcaligenes faecalis* WX-C12. Також слід відзначити високу продуктивність *A. faecalis:* за 48 год культивування вони продукують 72 г курдлану. Водночас високу кількість утвореного полісахариду – 51,94 г, мають *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 та 65,27 г глюканового полісахариду синтезують *Rhizobium radiobacter* CGMCC 12099.

2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Alcaligenes faecalis існують у грунті, воді, а також перебувають у тісному зв'язку з людьми. Бактерії цього роду, як правило, не патогенні. Бактеріальні види, що належать до роду *Alcaligenes*, продемонстрували універсальну здатність до біорегенерації забруднюючих речовин, включаючи феноли , фенантрен , поліароматичні вуглеводні , пестициди і деградацію азобарвників .

Як повідомляється, *Alcaligenes faecalis* перетворює найбільш токсичну форму миш'яку, арсеніту в менш безпечну форму- арсенат. Також було повідомлено про толерантність до важких металів. Незважаючи на таку високу придатність видів *Alcaligenes faecalis* у сферах досліджень та перспективних

перевагах у галузі промисловості, сільському господарстві та природоохоронній галузі, вона залишається недостатньо представленою на геномному рівні. Не було опубліковано жодного важливого порівняльного аналізу або пан-геномного аналізу, пов'язаного з цією бактерією на сьогоднішній день [18].

2.2.1 Морфолого-культуральні ознаки

Alcaligenes faecalis - це аеробна неферментативна, оксидаз-позитивна, некапсульована грамнегативна паличкоподібна бактерія розміром 0,6-0,7 мкм шириною та довжиною 1,0-1,2 мкм, мають перетрихіальні джгутики. Клітини розміщуються у формі «згустків». На агарі мають вигляд білувато-сірих, каламутних, круглих колоній [18].

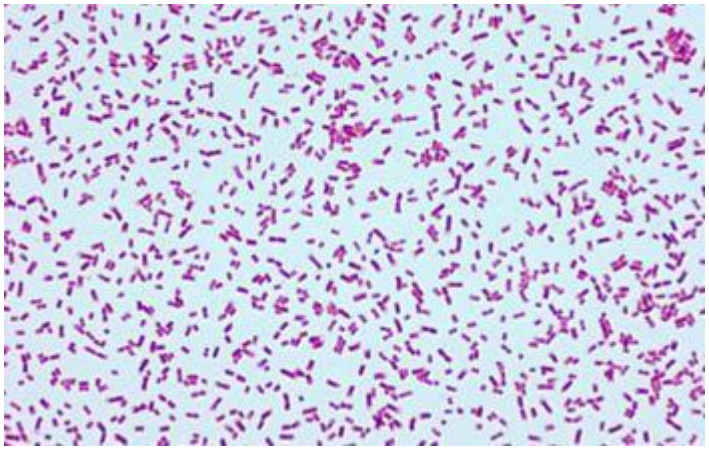

Рис.2.1. ***Alcaligenes faecalis*** **розміщення у формі «згустків»** [18].

2.2.2 Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

По відношенню до кисню, *Alcaligenes faecalis*- облігатний аероб. За типом живлення- хемоорганогетеротроф. Аналізи каталази та оксидази були позитивними. *A. faecalis* утилізує цитрат, фенілацетат, малонат, ацетат,лактат, L-аланін, пропіонат, L-гістидин,3-гідроксибутират, L-пролін та L-триптофан у вигляді джерел вуглецю Оптимальна температура для росту 24-40 °C. *A. faecalis* продукував цитохромоксидазу. Основними жирними кислотами були C16-пальмітинова (гексадеканова), C18 - стеаринова (октадеканова). Вміст Г + Ц в *A. faecalis* склала 57,8% [18].

2.3 *Таксономічний статус біологічного агента*

Таксономічний статус *Alcaligenes faecalis* представлено у (табл.2.4), де порівнюються фенотипова та філогенетичні класифікації. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology- перше видання опубліковано в 1923 році Дэвідом Берджі, з метою систематизації структурних та функціональних особливостей бактерій та класифікації. 9 видання опубліковано у 1984 році (т.1) та у 1986 р. (т.2). З 2001 р. виходять у світ окремі томи п´ятитомного десятого видання.(т.1-2001 р., т.2-2005 р., т.3-2009 р., т.4-2010 р., т.5-2011 р.)

У десятому виданні Bergey's Manual of Systematic Bacteriology реалізована філогенетична класифікація, на відміну від попередніх , і воно називається «друге видання Керівництва Бергі з систематики бактерій». Результати досліджень, проведених К.Р.Везе та Е.Стекенбрандтом у першій половині 80-х р. XX ст., показали, що за аналізу нуклеотидних послідовностей 16S рРНК бактерії поділяються на 11 основних груп. Таким чином, порівняння (табл.5.1) філогенетичної структури бактерій з традиційною фенотиповою систематикою (особливо 11 група) відразу показує значні відмінності [29], [30].

Табл.2.1.

Порівняння класифікацій *Alcaligenes faecalis*

Таксономічна група	**Фенотипова класифікація Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (перше видання,1984-1986 рік)**	**Класифікація К.Р.Везе та Е.Стекенбрандта, 80-ті роки XX ст.**	**Філогенетична класифікація Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (друге видання, 2005 рік,т.2)**
Домен	*Bacteria*	*Bacteria*	*Bacteria*
Відділ	*Gracilicutes*	*Proteobacteria*	*Proteobacteria*
Клас	*Scotobacteria*	*β Proteobacteria*	*β Proteobacteria*
Порядок	*Pseudomonas*	*Burkholderiale*	*Burkholderiale*
Родина	*Pseudomonaceae*	*Alcaligenaceae*	*Alcaligenaceae*
Рід	*Alcaligenes*	*Alcaligenes*	*Alcaligenes*

Розділ 3. Техніко-економічне обгрунтування

3.1 Потреба у цільовому продукті

На сьогоднійшній день, раціональна медикаментозна корекція функціональної активності імунної системи необхідна при багатьох захворюваннях організму. Найбільш доцільним способом відновлення ефективності імунної системи є використання імуномодуляторів [19].

Біополімер курдлан, який складається виключно з 1,3 β- глюканів — володіє саме імуномодулюючими властивостями. 1,3-β- глюкани структурні компоненти клітинної стінки більшості грибів, деяких бактерій, більшості вищих рослин та багатьох нижчих рослин. Вони складаються з полімерів глюкози зі змінною молекулярною масою та ступенем розгалуження [20].

Механізм дії 1,3-β- глюканів : великі молекули бета глюканів, не піддаються ферментативній фрагментації в ШКТ. Вони захоплюються клітинами слизової оболонки кишечника і активно переносяться в підслизовий шар, де активують макрофаги, а через них - лімфоцити, які відповідають за захист ендотелію, тобто за місцевий імунітет. Активовані лімфоцити зі слизової оболонки кишечника розповсюджуються в слизисті оболонки різних органів, забезпечуючи, таким чином захист від інфекцій. З одного боку, активується фагоцитарная функція макрофагів, а з іншого - починають посилено синтезуватися і вивільнятися такі речовини, як цитокіни (інтерлейкіни, інтерферони), які є сигналом для інших клітин імунної системи, наприклад Т лімфоцитів, фактору росту епідермальних клітин, фактора ангіогенезу.

Таким чином, 1,3-*β*- глюкани активують як місцевий імунітет, забезпечуючи захист організму від вторгнення антигенів, так і системний імунітет, що призводить до знищення вже проникших всередину організмv чужорідних генетичних матеріалів.

При цьому слід підкреслити відмінну рису імуномодулюючої дії 1,3 *β*-глюкану, яка адекватно підвищую активність імунної системи без її надмірної стимуляції, яка нерідко спричиняє виникнення аутоімунних захворювань. Саме ця риса, безпечність в токсикологічному відношенні та можливість приймати бета глюкани ентерально та парентерально надають актуальності завстосовувати 1,3-*β*- глюкани у складі нових препаратів імуномодулюючої дії та покращувати вже існуючі [14,21].

Найчастіше нормалізації імунної системи організм потребує при хронічних хворобах, інфекційних захворювань та сезонних хвороб, а саме: кишкових інфекціях, захворюваннях печінки різної етіології (в т.ч. вірусних гепатитах В і С), запальних захворюваннях верхніх і нижніх дихальних шляхів (в т.ч. ларингофарингітах, бронхітах, пневмоніях), захворюваннях урогенітального тракту (цистит, пієлонефрит, вагініт, генітальний герпес, цитомегаловірусна інфекція, хламідіоз, мікоплазмоз); інших запальних захворюваннях (рецидивуючий герпес, хронічний фурункульоз), а також для загального зміцнення організму (особливо при фізичних навантаженнях і стресі) і попередження розвитку запальних процесів [19,22].

На ринку існує багато препартів у складі яких є 1,3-*β*- глюкан у суміші із 1,6-*β*- глюканом від різних виробників. Проте, кращими імуномодулюючими властивостями володіє чистий 1,3-*β*- глюкан. Єдиним препаратом, в основі якого є чистий 1,3-*β*- глюкан є Super Pure 1,3-*β*- глюкан, який виготовляють за допомогою екстракції на основі водоростей та завозять з США, що є економічно невигідним для споживачів через високі ціни та для виробників, так як екстрагувати бета глюкани на основі водоростей та вилучати їх з клітинної стінки грибів є недоцільним, у порівнянні із високими показниками мікробного синтезу курдлану, в якому міститься лише 1,3-*β*-

глюкан та новітніми вдосконаленими технологіями підвищення виходу екзополісахариду у промислових умовах.

Тому, розробка вітчизняних препартів на основі мікробного курдлану, який містить лише 1,3-*β*- глюкани є перспективним напрямком для вирішення економічних та оздоровчих проблем для населення України, так як попередити серйозні вірусно-інфекційні захворювання можуть лише імуномодулюючі препарати, шляхом попереднього застосування імунотропних препаратів.

Нижче наведені вихідні дані та розрахунок річної потреби у курдлані, який містить 1,3-*β*- глюкан *(табл.1.1)*. Слід відзначити, що доза препарату взята на основі SuperPure 1,3-*β*- глюкан 500 мг [23]. За основу розрахунків взято статистичні дані МОЗ України інфекційної захворюванності населення України станом на 2018-2019 р, а саме статистика інфекційної захворюваності на ГКІ, ГРВІ та грип, вірусних геаптитів [24,25]. А також статистика хвороб органів дихання, хвороб сечостатевої системи, деякі інфекційні та паразитарні хвороби,розлади психіки та поведінки,хвороби шкіри та підшкірної клітковини за даними 2017 року [26].

Таблиця 3.1

Вихідні дані та розрахунок річної потреби у курдлані

Захворювання	Доза на добу (в г) [6].	Тривалість прийому , днів [6].	Кількість препарату (в г) на 1 людину	Кількість хворих в Україні протягом 2018-2019	Загальна кількість препарату на рік, кг
ГКІ	0.5	60	30	86 865 [24]	2 605.95
ГРВІ та грип	0.5	60	30	9 189 160 [25]	275 674.8
Вірусні гепатити	0.5	60	30	12 258 [24]	367.74
Хвороби органів дихання	0.5	60	30	12 036 631 [26]	361 098.93
Хвороби сечостатевої системи	0.5	60	30	1 723 742 [26]	51 712.26
деякі інфекційні та паразитарні хвороби	0.5	60	30	940 096 [26]	28 202.88
розлади психіки та поведінки	0.5	60	30	127 630 [26]	3 828.9
хвороби шкіри та підшкірної клітковини	0.5	60	30	1 564 434 [26]	46 933.02
хвороби крові, кровотворних органів та порушення із залученням імунного механізму	0.5	60	30	164 981 [26]	4 949.43

Всього -775 374 кг

3.2 Потреба потужності виробництва

З кожним роком зростає кількість хронічних хвороб, а отже люди потребують розробки нових та покращення вже існуючих імуномодуляторів. На сьогоднійшній день значна частина парентеральних препаратів на основі 1,3-β-глюканів виготовляються в США- 61.5 %. Препарати американського виробництва: Source naturals Beta glucan 100 мг, Jarrow formulas Beta glucan Immune Support, SuperPure 1,3-β- глюкан, Now Beta 1,3/1,6-D- glucan 100 мг, Paradise Herbs Beta glucan, Solgar Beta glucans, Dr.Mercola Beta glucans, Life source Basics 500 мг.

Україна займає 15.5 %. Препарати: Бета-Імун (ТОВ «Новалік-фарм»), Імунодіале (Фарм-Рост Плюс ООО).

Бельгія- 7.6 %. Препарат — Іммунікс (IXX фарма).

Польща-7.6 %. Препарат- Dolfos Immunodol (Dolfos).

Німеччина-7.6 % . Препарат -Weider Beta glucan (The Weider).

Нижче приведена діаграма асортименту препаратів в залежності від різних виробників *(рис.3.1).*

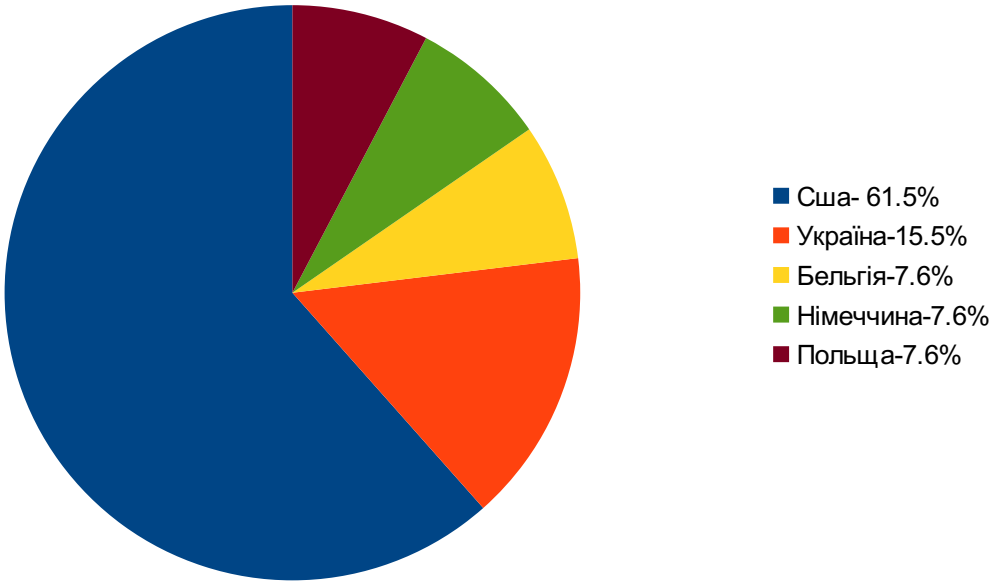

Рис.3.1 *. Діаграма кількісного співвідношення БАДів на основі бета глюкану, представлених на фармацевтичному ринку України.*

Як видно з діаграми, значна частина БАД імпортується зі США. Препарат українського виробництва Імунодіале (Фарм-Рост Плюс ООО) знят з виробництва, тому все більше БАД імпортуються з-за кордону, а це в свою черну економічно недоцільно як для споживачів, так і для імпортерів.

Тому, нижче наведений розрахунок *(табл.3.2)* з урахуванням тенденцій ринку України.

Таблиця 3.2

Розрахунок річної потреби у курдлані з урахуванням тенденцій ринку України

Захворювання	Кількість препарату (в г) на 1 людину	Кількість хворих в Україні протягом 2018-2019	Кількість хворих, які будуть приймати препарат на основі бета глюкану (10%)*	Кількість препарату, яку будуть вживати 10% хворих,кг	Загальна кількість препарату на рік при охопленні ринку на 5%, кг**
ГКІ	30	86 865 [24]	8 687	260.61	13
.,ГРВІ та грип	30	9 189 160 [25]	918 916	27 567.48	1 378.4
Вірусні гепатити	30	12 258 [24]	1 226	36.78	1.84
Хвороби органів дихання	30	12 036 631 [26]	1 203 663	36 109.89	1 805.5
Хвороби сечастатевої системи	30	1 723 742 [26]	172 374	5 171.22	258.6
деякі інфекційні та паразитарні хвороби	30	940 096 [26]	94 010	2 820.3	141
розлади психіки та поведінки	30	127 630 [26]	12 763	382.89	19.2
хвороби шкіри та підшкірної клітковини	30	1 564 434 [26]	156 443	4 693.29	234.6
хвороби крові, кровотворних органів та порушення із залученням імунного механізму	30	164 981 [23]	16 498	494.94	24.7

Всього — 3 880 кг

Примітка: * - 10% хворих будуть приймати БАД на основі бета глюкану, інші 90% будуть приймати інші препарати, по фізіологічним особливостям організму, алергічним реакціям на бета глюкан, порадам лікаря тощо.

**- лише 5 % SuperPure 1,3-β- глюкан буде споживатися хворими, інші 95%- будуть споживати інші препарати на основі бета глюкану.

3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення річної потреби у препараті необхідно синетзувати 3 880 кг курдлану. У промислових умовах, продуцент *A.faecalic WX-C 12* синтезує 72 г/ л полісахариду за 48 годин біосинтезу [4].

Розраховуємо скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, щоб отримати 3 880 кг курдлану.

72 г курдлану - 1 л

3 880 000 - V кр

V кр= 53 890 кг

З урахуванням витрат при виділенні, що складають 20% необхідно одержати:

$V_{кр}$ =53 889/ (1 -0,2)= 67 362 л

Розраховуємо кількість культуральної рідини, яку необхідно отримати за один цикл ферментації. Мінімально можлива кількість робочих днів - 30; максимальна - 300 днів. Приймемо, що для даного біосинтезу необхідно 30 днів, а в інші дні виробництво буде зайнятим біосинтезом іншого полісахариду.

Кількість продукту на добу: $V_д$=67 361/30 =2 246 л

Кількість продукту за цикл: $V_{крц}=(К_1*Т_{дф}*V_д)/24$ = (1.1*58*2 246)/ 24 = 5 971л

$К_1$- коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($К_1$=1.1-1.5); $Т_{дф}$- цикл роботи ферментера, який включає в себе біосинтез- 48 год та підготовку ферментера: миття та огляд- 2 год; перевірка на герметичність- 2 год; стерилізація- 2 год; охолодження- 1 год; завантаження середовища - 1,5 год; засів -0,5 год; вивантаження культуральної рідини - 1 год. Разом 10 годин.

Кількість виробничих циклів: $n= V_{кр}/ V_{крц}= 67\ 361/5\ 971 = 12$ циклів.

5 971 культуральної рідини можна отримати у ферментері коефіцієнт заповнення 0,6 та втрат культуральної рідини в результаті краплевиносу 10-15 %, становить: $V_{роб1}= V_{крц}/ (1-E_ф)= 5\ 971 / (1-0,1)= 6\ 635$ л

$$V_ф = V_{роб1}/0,6= 6\ 635/0,6=11\ 058 \text{ л}$$

Найближчий за геометричним розміром 12,5м^3.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $К_{зп}= V_{крц}/V_ф=5\ 971 / 11\ 058=0,54$. Геометричнийоб'єм ферментера обрано правильно,так як коефіцієнт заповнення перебуває в допустимих та оптимальних значеннях, тобто 0,5-0,7.

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс.1} = V_{роб.1}/ (1+X_ф) = 6\ 635 /(1+0,1)= 6\ 032 \text{ л},$$

де $X_ф$ – доза посівного матеріалу для ферментера (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм.1} = V_{роб.1} –V_{пс.1}= 6\ 635– 6\ 032 = 603 \text{ л}.$$

Для одержання 603 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.2} = V_{пм1}/(1– E_ф) = 603/(1– 0,1) =670,$$

де $E_ф$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу (10%).

Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс.2} = V_{роб.2}/ (1+X_ф) = 670/(1+0,1)=609 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{пм.2} = V_{роб.2} – V_{пс.2} = 670 – 609 = 61 \text{ л}$$

Кількість робочого матеріалу $V_{роб.2}$ 670 л можна одержати під час культивування у посівному апараті з геометричним об'ємом:

$$V_{па2} = V_{роб.2}/0,6 = 670/0,6 = 1\ 117 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{па} = 1.25$ м^3.

Уточнюємо раніше прийнятий коефіцієнт заповнення:

$$Кзп = V_{роб.2}/V_{па2} = 670/1\ 117 = 0,6$$

Для одержання 61 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо витрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10-15%.

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

$$V_{роб.3} = V_{пм2}/(1 – E_ф) = 61/(1 – 0,1) = 68 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс.3} = V_{роб.3}/ (1+X_ф) = 68/(1+0,1) = 62 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{пм.3} = V_{роб.3} – V_{пс.3} = 68\text{-}62 = 6 \text{ л}$$

Кількість робочого матеріалу $V_{роб.3}$ 68 л можна одержати під час культивування у посівному апараті з геометричним об'ємом:

$$V_{па3} = V_{роб.3}/0,6 = 68/0,6 = 113$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{па} = 0.16$ м^3.

Уточнюємо раніше прийнятий коефіцієнт заповнення:

$$Кзп = V_{роб.3}/V_{па} = 68/113 = 0,6$$

Для одержання 6 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо витрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10-15%.

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

$$V_{роб.4} = V_{пм3}/(1– E_ф) = 6/(1– 0,1) =7 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс.4} = V_{роб.4}/ (1+X_ф) = 7/(1+0,1)=6,4 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{пм.4} = V_{роб.4} –V_{пс.4}=7\text{-}6,4 =0,6 \text{ л}$$

Кількість робочого матеріалу $V_{роб.4}$ 7 л можна одержати під час культивування у малому інокуляторі з геометричним об’ємом:

$$V_{па4} = V_{роб.4}/0,6 = 7/0,6 = 12 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об’ємом стандартний ферментер $V_{па} = 0.02$ м^3.

Уточнюємо раніше прийнятий коефіцієнт заповнення:

$$Кзп = V_{роб.4}/V_{па} = 7/12=0,6$$

Кількість інокуляту $V_{пм.4}$ 0,6 л (600 мл)для засіву посівного апарата можна одержати культивуванням бактерій у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об’ємом$V_{колб}$ = 750 мл та коефіцієнтом заповнення $К_{зк} = 0,2$.

Кількість поживного середовища в колбах становить:

$$V_{пск} = V_{пм4}/(1+X_{кол}) = 600/(1+0,05) = 572 \text{ мл.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання колб, л:

$$V_{пмк} = V_{пм4} − V_{пск} = 600 –572= 28 \text{ мл}$$

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитеме:

$N_{колб}=V_{пм4}/(V_{колб}×К_{зк}) =600/(750×0,2) = 4$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 качалочні колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу полісахариду курдлану у ферментері об'ємом 12,5 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи (*рис.3.2*).

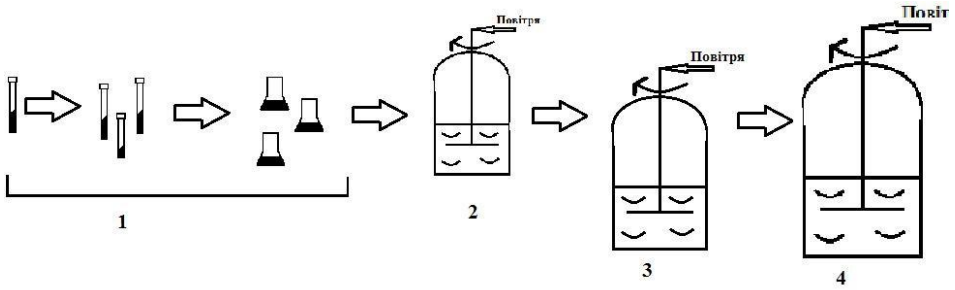

Рисунок 3.2. *Схема приготування посівного матеріалу Alcaligenes faecalis* : 1 - (вирощування в лабораторії в пробірках і в колбі на качалці; 2 - культивування в інокуляторі об´ємом 20 л; 3- культивування в посівному апараті об´ємом 160 л; 4- культивування в посівному апараті об´ємом 1250 л; 5- культивування в ферментері 12 500 л.

Розділ 4. Біосинтез цільового продукту

Згідно даним наукової статті [4], ростовим субстратом у поживному середовищі для біосинтезу курдлану є глюкоза. Склад поживного средовища для біосинтезу кінцевого продукту, екзополісахариду курдлану, наведено нижче: Глюкоза – 50 г/л; дріжджовий екстракт - 2 г/л; KH_2PO4 - 2 г/л; NH_4Cl - 1,6 г/л; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5 г/л. 1 мл розчину мікроелементів: $FeCl_3$.. - 1 г/л; $MnCl_2$ - 1 г/л; $CaCl_2$ - 1 г/л; NaCl - 1 г/л [4].

4.1.Шляхи катаболізму ростового субстрату

Згідно KEGG, катаболізм глюкози у продуцента курдлану, *Alcaligenes faecalis*, відбувається за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса, або гліколіз, який є одним з ключових шляхів метаболізму всіх живих організмів. Замість ключового ферменту гліколізу, 6-фосфофруктокінази (КФ.2.7.1.11), у *Alcaligenes faecalis* функціонує фруктозо-1,6- біфосфатаза (КФ.3.1.3.11). Нижче наведена схема катаболізму глюкози за шляхом гліколізу (рис. 4.1).

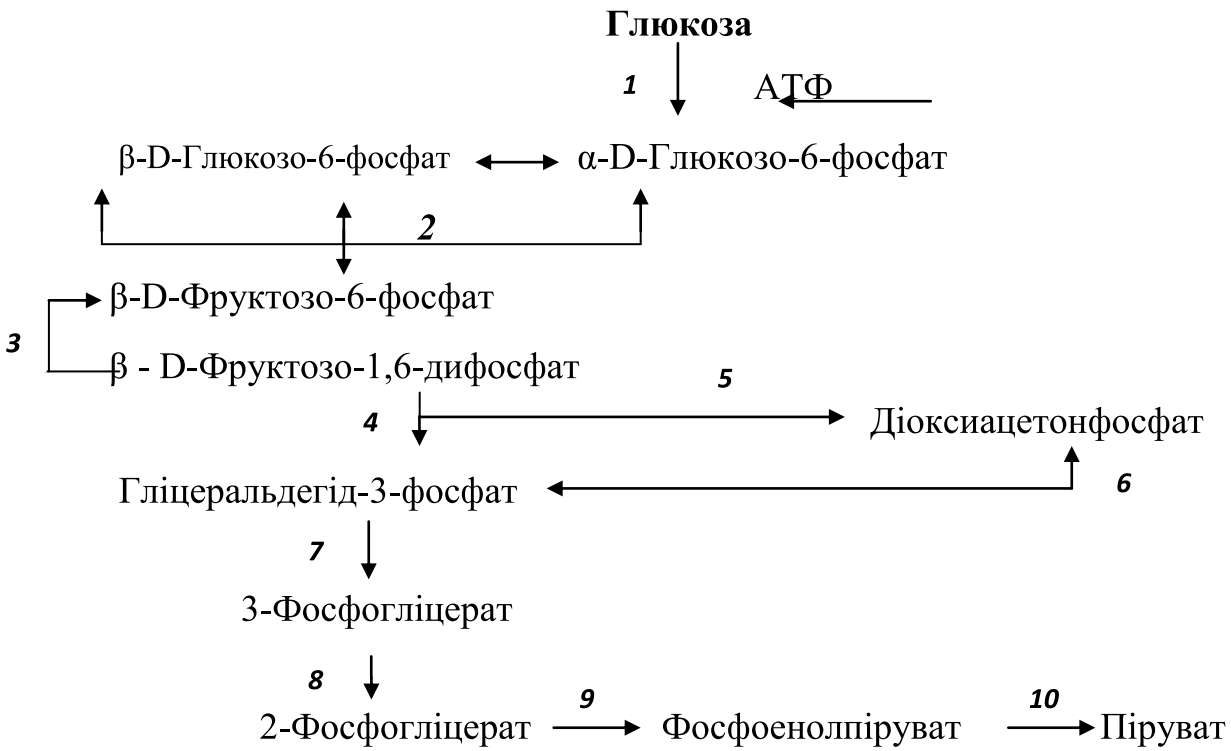

Рис. 4.1. **Катаболізм глюкози у *Alcaligenes faecalis***

Ферменти, які беруть участь при перетворенні глюкози за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса: ***1***– фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); ***2***- глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9.); ***3*** –фруктозо-1,6-біфосфатаза I (КФ.3.1.3.11); ***4*** – фруктозобі-фосфатальдолаза, клас II (КФ.4.1.2.13); ***5***– гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); ***6*** – триозофосфог-фатізомераза (КФ.5.3.1.1); ***7*** – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); ***8*** –гліцерат-мутаза (КФ.5.4.2.12); ***9*** – енолаза (КФ.4.2.1.11); ***10*** – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

У *Alcaligenes faecalis* не функціонує фермент гексокіназа (КФ.2.7.1.1), який перетворює глюкозу до α-D-Глюкозо-1-фосфату. Також не функціонує ключовий фермент шляху Ембдена-Мейєргофа-Парнаса, 6-фосфоф- руктокіназа (КФ.2.7.1.11), натомість у *Alcaligenes faecalis* функціонує фруктозо-1,6-біфосфатаза (КФ.3.1.3.11).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Курдлан являє собою позаклітинний полісахарид та відноситься до вторинних метаболітів.

Етапи біосинтезу екзополісахаридів включає синтез фосфорильованих попередників (глюкозо-6-фосфат), синтез нуклеозиддифосфатпохідних (УДФ) та реакції полімеризації за допомогою сполук ліпідної природи (ліпід-Ф), які локалізовані у цитоплазматичній мембрані. Біосинтез курдлану відбувається всередині бактеріальної клітини за участю ферментів, що призводять до полімеризації УДФ-глюкози в курдлан, який потім виділяється в позаклітинне середовище.

Ключові ферменти, які беруть участь у біосинтезі курдлану: β-1,3-глюкансинтаза, УТФ-глюкозо-1-фосфат-уридиніл- трансфераза (при метаболізмі сахарози) і фосфоглюкозомутаза [28].

Для того, щоб синтезувалися попередники біосинтезу курдлану-нуклеозиддифосфатпохідні, необхідним є функціонування біосинтезу піримідинових нуклеотидів. Так, фермент оротидин-5-фосфатдекарбоксилаза перетворює ОМФ в УМФ, що регулює метаболічний потік до біосинтезу УТФ,

ключового попередника УДФ-глюкози, який надалі полімеризується з утворенням курдлану.

Процес олігомеризації полісахаридів- енергозатратний процс. Приєднання повторювального блока до полісахаридного ланцюга відбувається за участю АТФ. У процесі біосинтезу курдлану генерації енергії не відбувається [27].

Схема біосинтезу цільового продукту

Схема біотрансформації глюкози в курдлан

1)*Умовні позначення*: ⟵ основний шлях біосинтезу; ⟵ —анаплеротичні реакції .

2) *Ферменти*: **1**- фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); **2**- глюкозо-6-фос-фатізомераза (КФ.5.3.1.9.); **3** –фруктозо-1,6-біфосфатаза I (КФ.3.1.3.11); **4** – фруктозобіфосфатальдолаза, (КФ.4.1.2.13); **5**– гліцеральдегід -3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); **6** – триозо- фосфатізомераза (КФ.5.3.1.1); **7** – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); **8** –гліцерат- мутаза (КФ.5.4.2.12); **9** – енолаза (КФ.4.2.1.11); **10** – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40). **11**- дигідроліпо- амід ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.12); **12**- цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); **13**-аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); **14**- дигідроліпоамід сукцинілтрансфераза (КФ2.3.1. 61);**16**- сукциніл-КоА синтетаза,(КФ 6.2.1.5); **17**-сукциніт дегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); **18**- фумараттгідратаза, (КФ 4.2.1.2); **19**-малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); **20**-фосфоенолпіруват- карбоксилаза (КФ 4.1.1.31); **21** - піруваткаробоксилаза (КФ 6.4.1.1); **22** – аспартаткіназа (КФ 2.7.2.4); **23**-аспартат карбоміїлтрансфераза (КФ2.1.3.2): **24**-дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3);**25**- дигідрооротат дегідрогеназа (КФ 1.3.5.2); **26**-оротатфосфорибозилтрансфераза (КФ2.4.2.10); **27**-оротидинфосфат декарбоксилаза (КФ4.1.1.23); **28**-уридилат кіназа (КФ 2.7.4.22); **29**-нуклеозиддифосфаткіназа (КФ2.7.4.6); **30**-деоксицитидінтрифосфат деаміназа (КФ3.5.4.13); **31**-β-1,3-глюкан -синтаза; **32**-рибозо-фосфат-пірофосфокіназа (КФ2.7.6.1) **33**-оротатфосфорибозил трансфераза (КФ2.4.2.10).

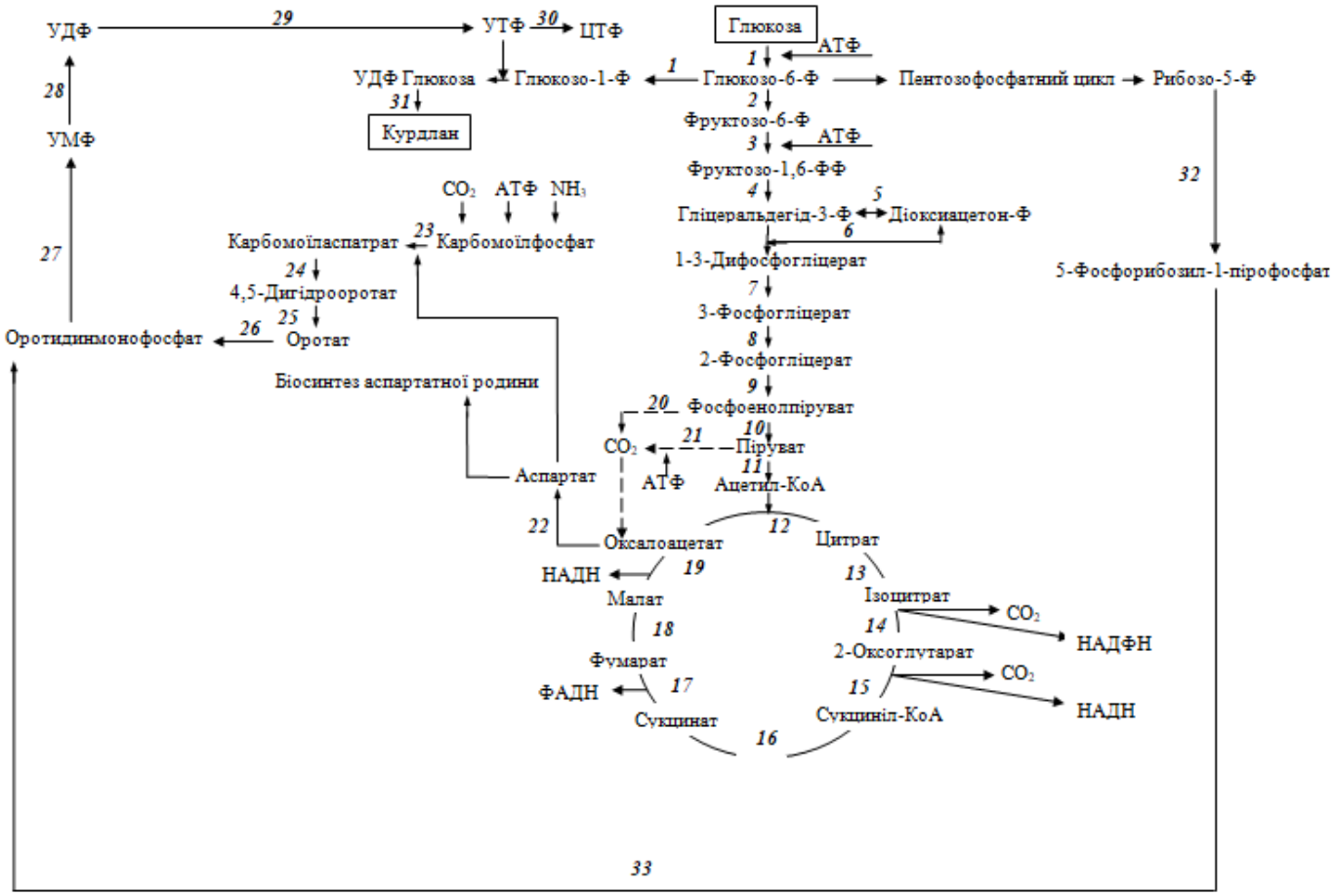

Рис.4.2 **Схема біосинтезу курдлану *A. faecalis*, починаючи з реакцій катаболізму ростового субстрату**

Розділ 5.Обгрунтування вибору технологічної схеми

Внаслідок аналізу фізіолого-біохімічних особливостей продуцента та фізико-хімічних ознак позаклітинного полісахариду – курдлану, визначено основні умови проходження біосинтезу [4,6,7,9,10,47].

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1 Обгрунтування способу культивування

- Аеробне культивування, так як продуцент облігатний аероб (аналізи каталази та оксидази були позитивними), тому необхідне аеробне культивування при постійному перемішуванні.
- Біосинтез при значенні pH -7,0, так як продуцент нейтрофільна культура;
- Необхідна стерилізація обладнання, комунікацій, поживного, тобто дотримання умов асептичності, так як *A.faecalis* - мезофіл, оптимальна температура для росту 24-40 °С, що в свою чергу створює ризик контамінації сторонніми мезофільними і нейтрофільними мікроорганізмами;
- Використовують глибинний спосіб культивування, так як курдлан – вторинний позаклітинний метаболіт, тобто накопичується на клітині, то для масштабного виходу цільового продукту, необхідно мати достатній вихід біомаси;
- Періодичне культивування – так, як екзополісахарид синтезується в основному у стаціонарній фазі, і як зазначалось вище, курдлан – позаклітинний метаболіт, який розташовується безпосередньо на самій, і це робить неможливим відведення культуральної рідини з цільовим продуктом, а від так унеможливлює проведення безперервного способу культивування;

- Під час біосинтезу мікробного полісахариду спостерігається підвищення в´язкості, тому для підвищення ефективності масообміну використовують ферментери з регульованою кількістю обертів – 2 000 об./хв.

Враховуючи фізіолого-біохімічні та фізико-хімічні ознаки продуцента та кінцевого продукту біосинтезу, відповідно, та параметри - ферментаційне обладнання має бути:

1. Забезпечений перемішуючим пристроєм, так як є необхідність наявності кисню для нормального функціонування продуцента. У ролі перемішуючого пристрою обираємо якірну мішалку, яка є простою та ефективною у застосуванні, так як культура *A. faecalis* не потребує наявності спеціального перемішуючого пристрою, завдяки фізіологічним особливостям.
2. Наявний барботер, автоматичні датчики для забезпечення концентрації кисню для створення оптимальних умов життєдіяльності продуцента екзополісахариду курдлану.
3. Автоматичні датчики регулювання pH, термодатчики для підтримання рівня pH - 7,0 та для підтримання зазначеної температури біосинтезу.

5.1.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря

Для високого виходу цільового продукту необхідне використання максимально очищеного аераційного повітря, яке отримують за допомогою фільтрів грубої та тонкої очистки.

Стадія попереднього очищення або знепилювання повітря. В якості фільтрів попереднього очищення застосовуються також губчаті фільтри з модифікованого пінополіуретану.Наприклад, фірма “ ООО Промфільтр” пропонує гафрований фільтр для попередньої очистки повітря. Матеріал фільтрувального елементу: поліестер, товщина якого становить 6-8 мм;

* Примітка: дані с сайту- http://prom-filter.com.ua/gofrirovannyie-filtryi.html

Стадія грубого очищення повітря . Наприклад, фільтрувальний матеріал грубої очистки G2 товщина 5мм (виробник Германія). Виготовляється з міцних синтетичних волокон поліестеру.

* Примітка: дані с сайту-https://kiev.prom.ua/p912556054-vozdushnyj-filtr-dlya.html?primelead=MS4wMg%3D%3D

Стадія тонкого очищення повітря . Застосовують матеріал для даного типу фільтрів у складі гофрованого фільтрувального паперу на основі ультра і мікротонких скловолокон. Наприклад, Фільтр тонкого очищення повітря (ФТОП, HEPA)

* Примітка: https://sks-filter.com.ua/hepa.html

Очищення відпрацьованого повітря . Система очищення повітря, що відходить, впроваджена у виробництво порівняно недавно.Очищення повітря, що відходить, ускладнюється тим, що він має дуже високу відносну вологість (до 25 г вологи на 1 м3), і звичайні фільтри тонкого очищення швидко виходять із ладу. Експериментально доведено, що якщо з повітря, що відходить, конденсувати воду, то разом з нею віддаляється 99 % мікроорганізмів. Для очищення вихідного повітря можна використовувати волого- і термостійкі фільтри. Доцільно використовувати для очищення повітря, що відходить, парні фільтри, із яких один регенерується, другий працює, а в цілому система працює безупинно. Наприклад, Blauberg VENTO Expert A50-1 Pro.

* Примітка: https://almaz-klimat.lviv.ua/ventoexperta501pro

5.1.3. Обґрунтування вибору мийних та дезинфікувальних засобів

5.1.3.1 Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору мийних та дезінфікуючих засобів

Щоб обгрунтувати вибір допоміжних стадій виробництва, необхідно врахувати особливості культивування продуцента курдлану *Alcaligenes faecalis* WX-C12. Даний продуцент є облігатним аеробом, мезофілом, тому оптимальними умовами для культивування будуть: температура — 37^{o}C, нейтральне значення pH 7,0, глибинний спосіб з періодичним типом культивування. Отже, процес біосинтезу курдлану має проходити в асептичних умовах, щоб мінімізувати ризик контамінації.

Необхідна підготовка такого обладнання: ферментер об'ємом 12,5 м^3, інокулятор 1 об'ємом 1.25 м^3, інокулятор 2 об'ємом 0.16 м^3, інокулятор 3 об'ємом 0.02 м^3, збірники для підготовки та стерилізації компонентів поживного середовища,збірник для титрувальних розчинів, збірники для приготування підживлювальних розчинів, УБС-20, автоклав, качалки та інше лабораторне устаткування. Також необхідно зазначити що ферментер та інокулятори - ємнісне обладнання, яке потребує наявності обслуговуючого майданчика.Рекомендована мінімальна відстань між аппаратами , а також відстань від стін або вікон — не менше 1 м, так як обслуговуючий персонал має виконувати свої функції якісно, без ускладнень та не завдаючи шкоди власному здоров'ю. Також, слід відзначити, що ферментери геометричним розміром більше 10 м^3 встановлюють в окремому приміщенні.

Отже, підсумовуючи вище перераховане, приблизний план приміщення включає в себе:

- Цех виробничого біосинтезу, в якому будуть знаходитися збірник об'ємом 60 л (для приготування розчину NH_4Cl), збірник об'ємом 1,6 м^3 (для приготування підживлювального розчину), збірник об'ємом 20 л (для приготування титрувального розчину), збірник об'ємом 10 м^3 (для

приготування та стерилізації компонентів поживного середовища та ферментер об'ємом 12,5 $м^3$, УБС-20.

- Цех вирощування посівного матеріалу, в якому розміщені інокулятор 1 об'ємом 1.25 $м^3$, реактор-змішувач для пригтування поживного середовища об'ємом 1.25 $м^3$, інокулятор 2 об'ємом 0.16 $м^3$, реактор-змішувач для пригтування поживного середовища об'ємом 0.16 $м^3$, інокулятор 3 об'ємом 0.02 $м^3$, реактор-змішувач для пригтування поживного середовища об'ємом 0.02 $м^3$.
- Біохімічна лабораторія оснащена приладами для проведення різних видів контролю та для зважування компонентів середовища. Мікробіологічна лаботраторія в якій знаходиться авотоклав, бокс, холодильники тощо. Качалочна кімната де розміщені качалки.

Наведенний приблизний план приміщення (*рис.5.1*):

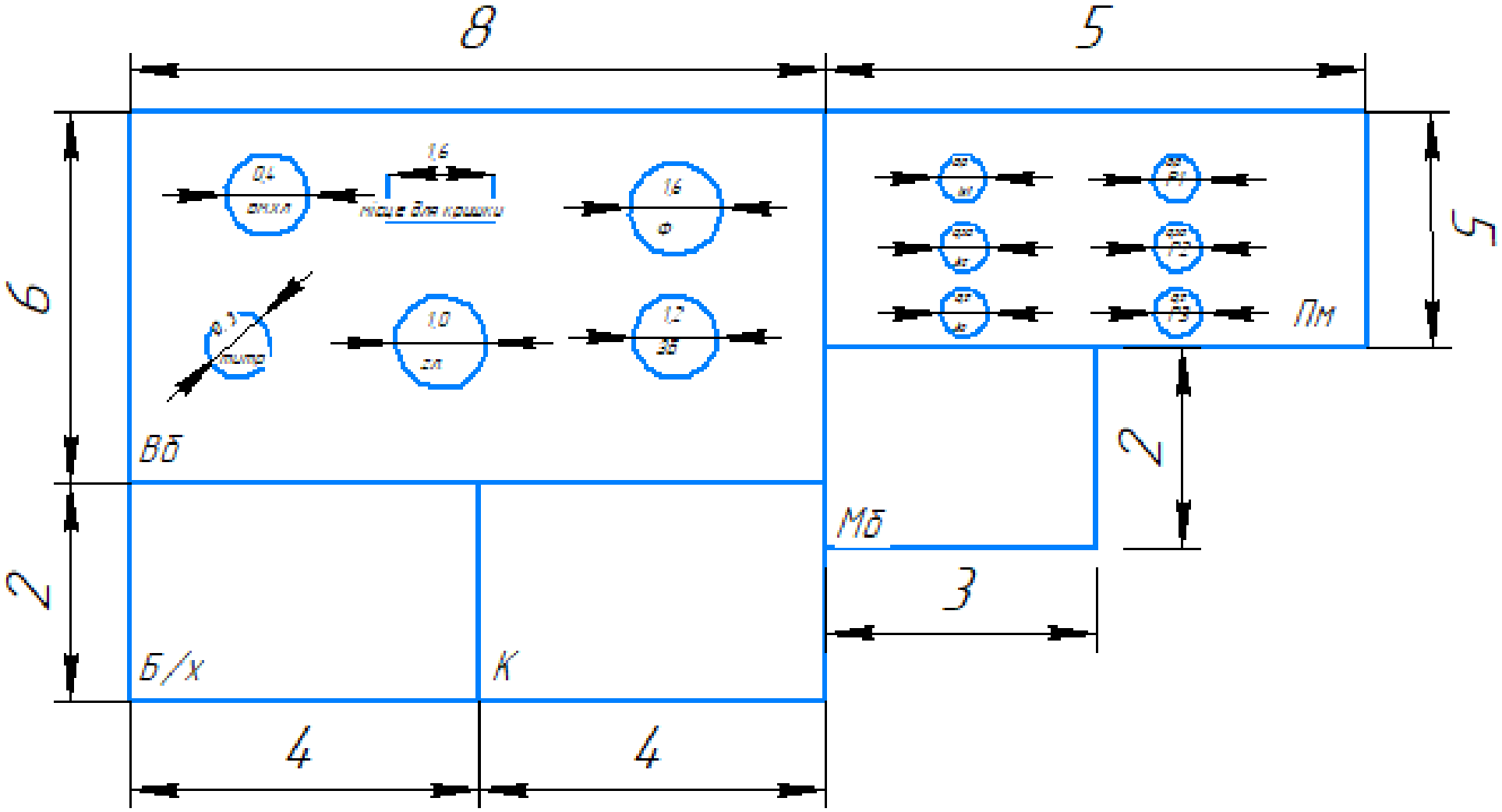

Рис.5.1 План приміщення для виробництва курдлану *Alcalsgenes faecalis* WX-C12.

Нижче в *табл.5.1* наведені розміри обладнання за даними https://bio-rus.ru, де вказано, що висота ферментура до його діаметру перебувають у співвідношенні 2:1.

Таблиця 5.1

Габаритні розміри основних обладнань

Обладнання	**Геометричний** об'єм, л	**Діаметр, м***
Ферментер	12 500	1,6
Реактор-змішувач для ферментера	12 500	1,6
УБС для ферментеру	10 000	1,2
Збірник з підживлювальним розчином глюкози	1 600	1.0
Збірник з підживлювальним розчином натрій хлориду	60	0.4
Збірник для титрувальних розчинів	20	0.3
Інокулятор 1	1 250	0,8
Реактор-змішувач для інокулятору 1	1 250	0,8
Інокулятор 2	160	0.38
Реактор-змішувач для інокулятору 2	160	0.38
Інокулятор 3	20	0.2
Реактор-змішувач для інокулятору 3	20	0.2
	Всього — **39 540**	

Отже, за даними *табл.5.1* , загальна площа обладнання становить 39 540 м^2.

За даними сайту про розміри об'ємно-планувальних параметрів виробничих приміщень https://besplatka.ua/obyavlenie/pomeshchenie-pod-proizvodstvo-e6f2d6,

висота стелі варіюється від 6-12 м, в залежності від виду призначення виробничого приміщення. Приблизно визначимо,що висота стін- 6 м.

З врахуванням рекомендованого проходу між аппаратами та стінами, які були вижче зазначені, загальна площа стін становитиме:

$$(6*6)+(8*6)*2= 168 \text{ м}^2.$$

Площа підлоги цеху виробничого, враховуючи місце майданчику для обслуговування ферментера, становить — 6*8=48 м^2.

Аналогічно розраховуємо площу стін та площу підлоги у цеху вирощування посівного матеріалу: $S_{ст}$= 5*5=25 м^2. $S_{підл}$= (5*6)+(5*6) *2=120 м^2

Площу стін та площу підлоги у біохімічній лабораторії: $S_{ст}$= 2*4=8 м^2. $S_{підл}$= (2*6)+(4*6) *2=72 м^2

Площу стін та площу підлоги у качалочній кімнаті: $S_{ст}$= 2*4=8 м^2. $S_{підл}$= (2*6)+(4*6) *2=72 м^2

Площу стін та площу підлоги у мікробіологічній лабораторії: $S_{ст}$= 3*2=6 м^2. $S_{підл}$= (3*6)+(2*6) *2=60 м^2

Таблиця 5.2

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м^2	Площа стін, м^2
Цех виробничого біосинтезу	48	168
Цех вирощування посівного матеріалу	25	120
Біохімічна лабораторія	8	72
Качалочна кімната	8	72
Мікробіологічна лабораторія	6	60
Загальна площа	**95**	492

Отже, загальна площа стін становить 492 м^2, а площа підлоги- 95 м^2.

Генеральне прибирання (стіни, двері,вікна) проводять один раз на місяць (з урахуванням кількості трудоднів: 30 днів – 1 раз), а щоденне миття обладнання – перед кожним циклом (30 днів + 1 додаткове миття), і миють підлогу 2 рази на день, з урахуванням кількості трудоднів – 60 разів.

Також, необхідно врахувати, що за приблизним планом виробництва передбаченний майданчик для обслуговування (для зняття кришки ферментера, збірника). Його також необхідно мити (як підлогу, тобто 60 разів) Площа підлоги для обслуговуючого майданчика складає: $S_{ст}$= 1,6*2=3,2 м^2.

Таблиця 5.3

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції стін та підлоги виробничих приміщень за весь період виробництва курдлану

Об'єкт миття та/або дезінфекції	**Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м^3 (л)**	**Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва**	**Загальна площа (об'єм) оброблюваного об'єкту за весь період виробництва, м^2 (л)**
Обладнання, інвентар, комунікації	39 540	31	1 225 740
Підлога	95	60	5 700
Стіни, двері, вікна	492	1	492
Обслуговуючий майданчик	3,2	60	192

Всього — **1 232 124 м^2**

Миття обладнання у виробничому цеху, цеху вирощування посівного матеріалу відбуваються циркуляційним способом автоматизованим методом (за допомогою CIP мийки [35]), так як загальна площа оброблюваного об'єкту

за весь період виробництва сягає 1 225 740 м^2. На сьогоднійшній день, сучасним вирішенням миття великих об'ємів обладнання є циркуляційна CIP мийка Comac Group (Італія) [35]. Автоматизована система мийки - CIP мийка (Cleaning In Place) призначена для забезпечення безрозбірного миття технологічного обладнання та трубопроводів на підприємствах харчової промисловості миючими розчинами, ополіскування і дезінфекції в автоматичному режимі. Перевагами такого циркуляційного способу миття є випуск безпечної і якісної продукції, підвищення терміну її придатності, а й істотне зниження поточних витрат підприємства на процедури поточного контролю технологічних процесів і продукції. Але, відомо, що втрати при мийці за допомогою автоматичної системи CIP мийки складають близько 20%. Розрахуємо, скільки необхідно миючих засобів з врахуванням витрат для загальної площі миття обладнання за весь період виробництва курдлану:

$$1\ 225\ 740 \times 0.2 = 246\ 424 \quad м^2$$

А загальна площа миття для підлоги, стін, дверей,вікон складає

$$5\ 700+492+192 = 6\ 384 \quad м^2$$

5.1.3.2 Обґрунтування вибору мийних та дезинфікувальних засобів

Так як, загальна площа для оброблення миючими та/ або дезінфекційними розчинами велика- 246 424 м^2 , то як вище було згадано, миття буде проводитися за допомогою CIP мийки, зважаючи на великі площу оброблювальної зони, до вибору мийних та дезинфікувальних розчинів необхідно поставити головні умови — економічно вигідну ціну, витрати на обробку площі та ефективність засобів.

5.1.3.3 Вибір мийного засобу для обладнання і комунікацій

В ході аналізу реєстру мийних та дезенфекційних засобів 2019 року, а також за ефективністю, безпечністю засобів та співвідношенням кількості миючих та/ або дезінфекційних розчинів для оброблення, іхньою ціною та

діючою речовиною, визначені мийні та дезинфікувальні речовини, узагальнену інформацію яких наведено у *табл.5.4.*

Таблиця 5.4

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва курдлану

Назва мийного/дезинфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття / дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м^2 (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництв, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн	Активна діюча речовина
Каустична сода [1]	Обладнання	2	1 225 740	246 424	12	0.24	59 142	Їдкий натрій
Вімол [2]	Обладнання	0.5	1 225 740	246 424	22	0.11	27 107	Суміш солей неорганічних кислот, поверхнево-активних речовин
Біомой [3]	Обладнання	0.3	1 225 740	246 424	116	0.35	86 249	Сульфонол,лужна протеаза
Полідез [4]	Обладнання	0.25	1 225 740	246 424	162	0.4	98 570	Алкілдиметилбензиламоній хлорид, перекис водню
Хлорантоін [5]	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2	6 384	639	54.6	0.1	64	Хлор активний
Ласепт [6]	Стіни, підлога, вікна, двері	0.2	6 384	639	150	0.3	192	Глутаровий альдегід
Мікробак форте [7]	Стіни, підлога, вікна, двері	1	6 384	639	78	0.78	500	алкідилдиметилбензиламоній хлорид
Дезоксон [8]	Стіни, підлога, вікна, двері	0.1	6 384	639	15	0.02	13	Надоцтова кислота

* Примітка: ціни наведені станом на 2019: 1 -https://prom.ua/p1020840677-natrij-edkij-zhidkij.html 2- https://prom.ua/p1009715191-vimol.html 3-https://kiev.prom.ua/p1648650-biomoj-sredstvo-dlya.html?primelead=MS4wMQ%3D%3D;4-https://kiev.prom.ua/p816;5-https://farmakos.ua;6-https://grig-ltd.com ;7-http://www.attis.com.ua/site/liquid/gembar.html 8-http://www.attis.com.ua/site/liquid/gembar.html

* Приклад розрахунку на основі каустичної соди: концентрація робочого розчину становить 2%, тобто 0.02 г/л. Ціна каустичної соди за 1 л складає 12 грн. А вартість 1 л робочого розчину складає — 12*0.02=0.24 грн/л. Загальна площа оброблюємого об'єкту становить 1 225 740 $м^2$. Кількість робочого розчину для загальної площі об'єкту становить- 1 225 740×0.2= 246 424 $м^2$ Загальна вартість дезенфекційного розчину- 246 424 *0.24=59 142 грн.

Отже, в ході аналізу ассортименту мийних та дезінфікувальних засобів, визначено,що для обробки обладнання варто використати вімол.

«Вімол» - це негорюча, нетоксична, поверхнево-активна речовина з дезінфікувальним ефектом.

Лужні і нейтральні солі забезпечують високу миючу дію препарату. Застосовується проти грампозитивних та грамнегативних вегетативних бактерій, грибів, ліпофільних вірусів. Розчин стабільний, при зберіганні не розкладається. Наявність в складі пом’якшувачів води дозволяє використовувати розчин препарату в районах з підвищеною жорсткістю води. Використовується для миття обладнання, тари та трубопроводів на підприємствах Зберігають в упакованому вигляді в закритих сухих провітрюваних приміщеннях при температурі від мінус 10 до 40 °С, відносної вологості повітря не більше 85%, захищають від дії сонячних променів.

Даному засобу характерний такий недолік як - адсорбція і нейтралізація такими матеріалами, як шерсть та бавовна. Оскільки при мийці ємнісного обладнання розчин з даними матеріалами не контактивуватиме, даний фактор виключаємо [31].

Для обробки стін, дверей, підлоги варто було б використати дезоксон, так як він економічно вигідний. Проте, він виявляє алергічні побічні реакції навіть при мінімальних концентраціях 0,05-0,2% та загрожує життю та здров'ю персоналу [32].

Отже, обираємо ласепт та хлорантіон.

Ласепт володіє антимікробною активністю відносно грамнегативних і грампозитивних бактерій (включаючи мікобактерії туберкульозу, збудників

внутрішньолікарняних і анаеробних інфекцій), вірусів (включаючи аденовіруси, віруси грипу, парагрипу, «пташиного» грипу, «свинячого» грипу і ін., збудники гострих респіраторних інфекцій, ентеровіруси, ротавіруси, вірус поліомієліту, віруси ентеральних, парентеральних гепатитів, герпесу, атипової пневмонії, ВІЛ-інфекції та ін.) і грибів (збудників кандидозів і дерматофітій), пліснявих грибів; засіб володіє спороцидною активністю, а також миючими та дезодоруючими властивостями. Засіб зберігає свої властивості після замерзання та наступного відтанення. Засіб є нетоксичним та нешкідливим для організму людини. (4 клас небезпеки).Термін зберігання робочих розчинів — 7 діб [33].

«Хлорантоін» - хлоративний, багатокомпонентний, поліфункціональний дезінфекційний засіб з миючим ефектом.

Хлорантоїн зберігають в упаковці виробника в критих, сухих, провітрюваних приміщеннях, недоступних для загального використання на відстані не менше 1 м від нагрівальних приладів, при температурі від 5 ° С до 30 ° С. Робочі розчини доцільно готувати безпосередньо перед обробкою, щоб запобігти розкладанню та інактивації діючої речовини. При роботі з засобами, що містять хлоративні речовини слід пам’ятати про засоби індивідуального захисту (маска на обличчя та захисні рукавиці) [34].

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для синтезу курдлану застосовують середовище, що забезпечує вихід екзополісахариду 72 г/л - нижче наведеного складу:

Середовище 1 (для вирощування посівного матеріалу): Глюкоза- 20 г/л ; дріжджж. екстр.- 10 г/л; KH_2PO4 – 1,74 г/л ; $MgSO4•7H2O$-0,49. г/л;

Середовище 2 (для біосинтезу): Глюкоза - 50 г/л; дріжджовий екстракт - 2 г/л;KH_2PO_4 - 2 г/л; NH_4Cl - 1,6 г/л; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5 г/л. 1 мл розчину мікроелементів: $FeCl_3$ - 1 г/л; $MnCl_2$ - 1 г/л; $CaCl_2$ - 1 г/л; NaCl - 1 г/л [4].

Проаналізувавши дане середовище ділимо його на композиції залежно від хімічної сумісності компонентів та режимів їх стерилізації *(табл.5.5)*.

Таблиця 5.5

Склад композицій поживного середоаища

	Склад	Режим стерилізації
Композиція А	глюкоза та дріжджовий екстракт	t=112°С та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.
Композиція В	KH_2PO_4	t=131°С та тиску 1,5 атм упродовж 40 хв.
Композиція С	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ та NH_4Cl	t=131°С та тиску 1,5 атм упродовж 40 хв.
Композиція D	Розчину мікроелементів	t=131°С та тиску 1,5 атм упродовж 40 хв.

З економічної точки зору та забезпечення мінімальної кількості обладнання і унеможливлення контамінації, композиції В, С, D можна простерилізувати разом з додаванням нестерильного 6 % розину HCl (pH-4,5-5) і подальшою стерилізацією за жорстких умов та наступним доведенням 6 % розину NaOH до pH 7,0. Саме за такого способу, солі не прореагують.

5.1.4.1 Обгрунтування способу підготовки допоміжних розчинів

Процес виробництва курдлану включає в себе двоступеневу ферментацію. Продуцент починає синтезувати курдлан після лімітування азоту. Для досягнення високого виходу кінцевого продукту (72 г/л курдлану) за 48 год культивування, була прийнята стратегія дробної подачі аміачної води для досягнення високої щільності клітин. Під час процесу біосинтезу,спочатку необхідно підтримувати pH на рівні - 7,0, а потім підтримувати на рівні 5,6 в умовах «азотного голодування» [4].

Приготування розчину мікроелементів

Для процесу ферментації необхідно приготувати розчин мікроелементів у кількості 6,2 (так як, за даними статті вказано, що необхідно 1 мл розчину мікроелементів на 1 л середовища) [4]. Розчин готують з усіма іншими компонентами пожвиного середовища в УБС-20.

Приготування підживлювального розчину NH_4Cl

При культивуванні *A. faecalis* WX-C12 для забезпечення надсинтезу курдлану на 14 годині біосинтезу збільшують концентрацію NH_4Cl з 1,6 г/л до 3,6 г/л. Готують 28 л NH_4Cl.

Приготування підживлювального розчину глюкози

Під час біосинтезу курдлану необхідно досягти 120 г/л концентрації глюкози. Таку кількість вуглецю вносити відразу недоцільно, бо це спричинятиме подовження лаг-фази та появу катаболітної репресії. Після 24 год культивування вносять підживлювальний розчин у вигляду 40 % розчину у кількості 980 л. Розрахунок підживлення наведено у *розділі 6.*

Приготування титрувальних розчинів NaOH та HCl

Для стерилізації солей та для контролю pH (на початку процесу виробничого культивування даного продуцента потрібно підтримувати pH на рівні 7,0, а після вичерпання джерел азоту на рівні - 5,6) необхідно приготувати розчини 6 % HCl та NaOH. Розчини HCl та NaOH варто готувати у розрахунку 2 мл 6% розчинів на 1 л середовища [4,36]

5.2. Обгрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Виділення екзополісахаридів має переваги перед виділенням внутрішньоклітинних, так як екзоглюкани утворюються, як правило, в значно більшій кількості, легше відокремлюються від біомаси і очищаються від домішок. Однак при виробництві екзополісахаридів є свої технологічні труднощі-накопичення полісахариду в середовищі призводить до обмеження доступу кисню до клітин, підвищена в'язкість середовища унеможливлює відділення полісахариду від клітин продуцента з нативної культуральної рідини. Її доводиться розбавляти в десятки разів, а після видалення клітин концентрувати до початкового або меншого обсягу. Вирішення цих проблем пов'язано з додатковими витратами [2].

5.2.1 Обґрунтування стадій виділення згідно із фізико-хімічними властивостями цільового продукту

Курдлан - водорозчинний позаклітинний полісахарид (екзополісахарид), що складається тільки з β- (1,3) залишків глюкози. У природному стані курдлан зустрічається у вигляді гранул. Гранули нерозчинні у воді та алкоголі, але легко розчиняється у водному NaOH, водному розчині три(етилендиамін)гідроксиді та диметилсульфоксиді (ДМСО) за рахунок іонізації водневих зв’язків [9,48].

Розчинність лінійних β- (1,3)- глюканів пов’язана зі ступенем полімеризації. Коли ступінь полімеризації перевищує 30-49, то курдлан розчиняється у NaOH та ДМСО (концентрацією більше 0,23 Н) і не розчиняється у воді. Це пов’язано з молекулярним переходом внутрішньої структури. А ступінь полімеризації курдлану становить близько 450 [9,8,10]. Тому, обробка солюбілізуючим агентом NaOH дозволить знизити в’язкість та спричинити руйнування системи.

Існує залежність між концентрацією лугу та в’язкістю курдлану: в’язкіть курдлану зменшується зі збільшенням концентрації лугу (рис.5.2).

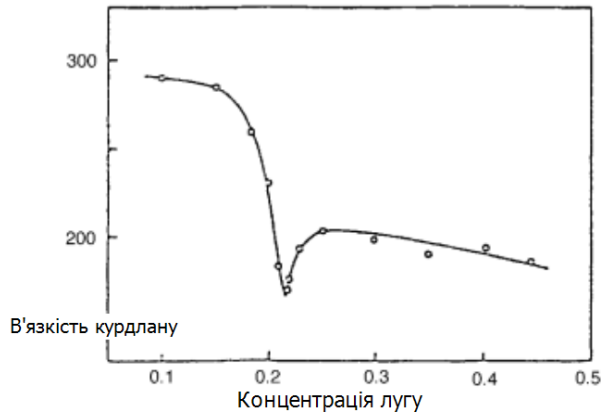

Рис.5.2 Графік залежності між концентрацією лугу та в’язкістю курдлану [48].

Оскільки курдлан не може розчинятися у воді, то використання гомогенізатора забезпечить утворення дисперсної суспензії, без порушення структури курдлана. Адже, коли курдлан диспергується у воді-утвориться пастоподібна суспензія, на відміну від глюкоманан ів, які утворюють суспензію з дуже високою в'язкістю

Курдлан утворює гель лише при нагріванні, інші фактори, такі як: pH, концентрація цукру, присутність катіонів – вплив на гелеуторювання не здійснюють.Стабільність гелю не змінюється між pH 3–10, і може бути посиленою додаванням борату в присутності сечовини. Додавання неорганічних солей не має значного впливу на міцність гелю та в’язкість курдлану. Курдлановий гель стійкий до ферментативних та кислих гідролізів. Повідомлялося, що танін, цукор і крохмаль здатні знизити синерезис гелю, тобто виділення рідини з гелю та зменшення його об’ємі [48].

Культуральна рідина містить і цільовий продукт, і залишки поживного середовища, і клітини продуцента та продукти метаболізму.

Тому, нижче представлена схема (рис.5.3) виділення та очищення екзополісахариду курдлану з культуральної рідини.

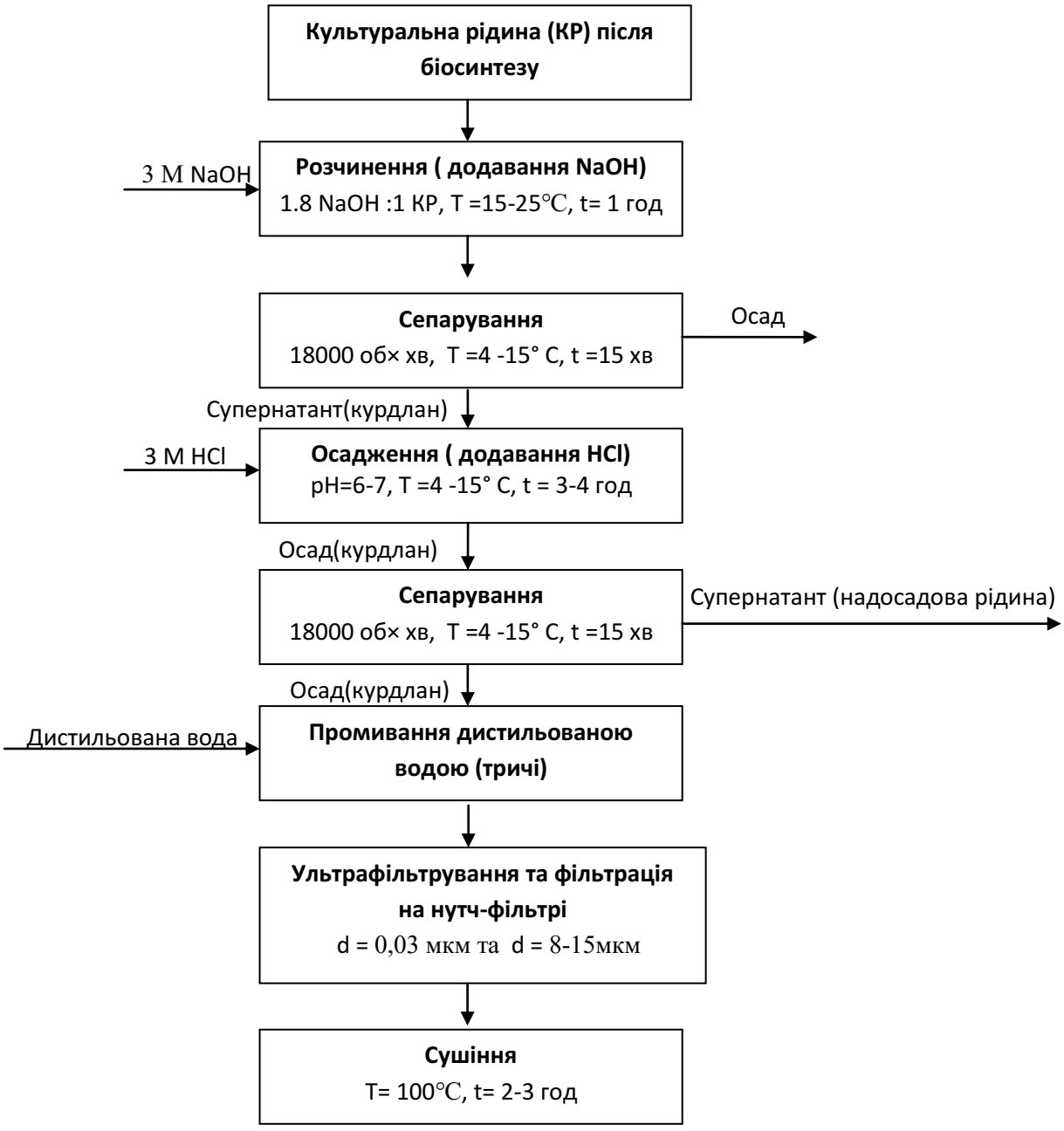

Рис.5.3 Схема виділення та очищення курдлану [9].

5.2.2 Обґрунтування вибору способу попередньої обробки культуральної рідини

Попередня обробка культуральної рідини потрібна для того, щоб було легше відділити клітини мікроорганізмів. Так як, відділенню клітин перешкоджають їх малі розміри і висока в´язкість середовища.Тому, в цьому випадку використовують розчинення культуральної рідини. Слід зазначити, що для розчинення культуральної рідини можна застосовувати воду та спирт. Але, за фізико-хімічними властивостями, курдлан розчиняється лише в лужних розчинах, а саме завдяки наявності екстенсивних внутрішньо- і міжмолекулярних кристалічних доменів, пов'язаних з воднем подібних до тих, що містяться в (1,4) -β-глюкані та потрійній спіральній конформації [9, 8,10].

Також для зниження в'язкості культуральної рідини, часто застосовують такий технологічний прийом, як підігрівання культуральної рідини. Але, обробка курдлану солюбілізуючими агентами дозволяє отримати гелеутворюючі похідні, без попереднього нагрівання [10].

Додавання NaOH: Для руйнування капсул і зменшення в´язкості розчину, додають 3 М NaOH в культуральну рідину у співвідношенні 1,8: 1 (NaOH : культуральна рідина). Це потрібно для того, щоб розчинити курдлан (солюбілізація курдлану) [9,8,10].

5.2.3 Обґрунтування вибору способу відділення біомаси

Існують наступні методи відділення біомаси від культуральної рідини: сепарування та центрифугування; фільтрація; осадження за допомогою флокулянтів; дистиляція; сублімація; осадження шляхом змін розчинності речовини; кристалізація; сорбція; екстракція; застосування вакуум-фільтрів; ультрафільтрація на мембранних фільтрах [44].

Фільтрація,ультрафільтрація, застосування вакуум-фільтрів неможливе без попередньої обробки культуральної рідини, тому що це пов'язано з малим розміром клітин та високою в'язкістю середовища, великою кількістю домішок, а також закупорюванням пор у фільтрах [11,44].

Флотація, осадження, кристалізація,сорбція, екстракція – є неефективними методами відділення біомаси даної культуральної рідини (КР) через свою невисоку ступінь очистки КР та економічну недоцільність процесу, адже всі ці процеси потребують попередньої обробки та підготовки КР, а це в свою чергу є економічно невигідним та громіздким для промислового виробництва та потребують додаткових витрат для реактивів та обладнання [44].

Доцільніше використовувати сепаратори, які застосовують для розділення суспензій зі значною та середньою концентрацією твердої фази, та в'язких суспензій та емульсій, а також дані способи є економічно доцільними, працюють у безперервному режимі з ручним вивантаженням осаду та максимально відділяють клітини.

Культуральну рідину можна сепарувати (18000 об\хв, 30 хв) для інтенсифікації солюбілізації курдлану за допомогою сепаратора з ручинм вивантаженням осаду, продуктивністю 20-30 $м^3$/ год, з можливістю підігрівати та охолоджувати культуральну рідину .

5.2.4 Обгрунтування способу виділення курдлану

Оскільки, курдлан – позаклітинний метаболіт, тому наступним завданням буде виділення кінцевого продукту з супернатанту. Для цього в промисловості застосовують такі стадії: попередня обробка супернатанту та наступне виділення кінцевого продукту з нього.

Попередня обробка супернатанту може включати в себе розчинення або осадження органічними/ неорганічними розчинниками. За фізико-хімічними особливостями, курдлан осаджується при дії на нього хлоридної кислоти, завдяки впорядкованій потрійній спіральній конформації та наявності екстенсивних внутрішньо- і міжмолекулярних кристалічних доменів, пов'язаних з воднем [21].

Осадження курдлану: 3 М HCl додають до супернатанту (надосадова рідина, яка містить курдлан) до pH 6-7. За даними наукової літератури [9, 11], найбільш розповсюдженим способом осадження курдлану є додавання HCl. Додавання неорганічних солей не має значного впливу на в'язкість екзополісахариду курдлану

[9].Далі суміш знову сепарують (18000 об\хв, 30 хв) для інтенсифікації процесу осадження.

5.2.5 Обґрунтування способу очищення курдлану

Так як, даний курдлан передбачається застосовуватись для виробництва БАД, у формі порошку [40,41], то кінцевий продукт має бути очищений від зайвих домішок та солей максимально. Для цього здійснюють тричі промивання дистильованою водою з ультрафільтруванням (тобто після кожного промивання водою слідує ультрафільтрування і так три рази), та подальше фільтрування на нутч-фільтрі. Нижче наведені різні типи фільтраційних установок (табл. 5.6).

Порівняльна характеристика фільтраційних установок

Таблиця 5.6

Апарат	Технічні характеристики	Переваги	Недоліки
Нутч-фільтри серії "Р"[37].	Поверхня фільтрації -8-16 $м^2$, Діаметр пор-8-15 мкм Фільтруючі елементи-полігідроксіалканоат, полікапролактон, перхлорвініл.	Обладнані зовнішньої сорочкою, що дозволяє здійснювати фільтрацію при різних температурних режимах. Охолодження камери для зниження розчинності осаду. Нагрівання- для запобігання кристалізації речовин.	Недостатнє очищення від залишків поживного середовища
Вакуум-фільтри дискового типу [38].	Площа фільтруючої поверхні- до 80 $м^2$, Фільтрування під вакуумом	Безперервне обертання барабана дозволяє фільтрувати, промивати, сушити і вивантажувати осад.	Незначна рушійна сила процесу
Ультрафільтраційна установка [39].	Сер. діа-тр пор 0,001-0,1мкм Мембрани виготовлені з полісульфона / полівінілідіну.	Простота конструкції, невеликі затрати, високий ступінь очистки Очистка від залишків поживного середовища	Габарити

Отже, обираємо ультрафільтраційну установку завдяки її вагомій перевазі - цільовий продукт не підлягає тепловим і хімічним впливам та максимально очищується, легко зберігається герметичність та асептика, апарат є простим в конструкції, компактним, має незначну енергоємність.

5.2.6 Обґрунтування способу сушіння курдлану

Сушіння: Курдлан подрібнюють і направляють на сушку. Процес здійснюють при температурі не нижче 60 °С до постійної ваги та до повного випаровування рідини .

Обґрунтування: Кінцевий продукт виділення та очищення має бути у вигляді порошку та використовуватися в подальшому, як основна речовина у складі БАД, яка має свої нормативно-технічні вимоги [40,41]. Недоліки та переваги основних сушильних установок наведені нижче в табл.5.7.

Таблиця 5.7

Порівняльна характеристика сушильних установок

Апарат	Технічні характеристики	Переваги	Недоліки
Шафа сушильна вакуумна[42].	Максимальна температура -200°С; Продуктивність по волозі до 100 кг/год Час висушування – до 20год.	Сушка розчинів з високою в'язкістю, Висока швидкість сушіння, висока продуктивність	Неможливість проведення безперервних процесів
Розпилюча сушарка типу [43].	Продуктивність до 192 кг/год, Час безперервного висушування – до 20год.	Розпилювальні сушарки дають м'які режими сушіння, що запобігають втратам БАР. Можливе суміщення процесів висушування та мікрокапсулювання. Інтенсифікування процесу випарювання.	Призначені для рідин (якщо в'язкий розчин- низька швидкість процесу сушіння)
Ліофільна сушильна установка[45].	Максимальне завантаження продукту – до 20 кг, Час висушування – 24-48 год	Процес упарювання відбувається при низькій температурі, завдяки чому не руйнуються білки,БАР. Відсутня небезпека окиснення нестабільних речовин.	Підготовка препарату до сушіння повинна бути ретельною, для повного висихання потрібно високий вакуум, сам процес досить тривалий і вимагає великих енерговитрат,висока ціна.
Сушіння «в киплячому шарі» [44].	Максимальна температура - 200°С; Продуктивність по волозі -до 180 кг/год	Інтенсивне перемішування обумовлює високий тепло-, масообмін, швидкість сушіння. Простота конструкції	Дуже енергозатратна

Отже, сушіння курдлану варто здійснювати за допомогою сушильної вакуумної шафи, так як економічно доцільно використовувати даний тип сушарки.

Упаковка: Курдлан фасують по 1,25,100 кг у водонепроникну упаковку з алюмінієвої фольги [40,41].

Обгрунтування: Отримання кінцевої товарної форми екзополісахариду курдлану для подальшого використання у складі БАД.

Для сипучих речовин в даний час повсюдно застосовуються фасувально-пакувальні машини. Їх продуктивність досягає 4 т /год. На терезах слід виставити необхідні показники і просто запустити установку. Коли необхідна вага буде досягнута (або 1 кг або 25, або 100), подача зупиниться автоматично. Засувка вагового бункера відкривається, а також закривається за допомогою пневмоциліндра. Стрічка конвеєра нідерландського виробництва - харчова, має реборди з поліуретану.[46].

5.3 Обґрунтування вибору необхідних допоміжних робіт при виділенні цільового продукту

До таких робіт відносять:

1. Підготовка мийних та дезинфікувальних засобів (див. Розділ 8)
2. Приготування розчинів для попередньої обробки КР – розчин натрію лугу та розчин соляної кислоти (див.Розділ 8)
3. Підготовка дистильованої води (див.Розділ 8) - після осадження та сепарування (згідно схеми рис.5.3), необхідно тричі промити курдлан в дистильованій воді для видалення солей. Тому доцільно очищувати воду на підприємстві.

РОЗДІЛ 6
МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ

Згідно техніко-економічного розрахунку, потреба в екзополісахариді курдлану для виробництва БАД SuperPure 1,3-β- глюкан становить 3 880 кг/рік з концентрацією 72 г/л за 30 днів виробництва, так як інші дні виробництва зайняті на біосинтез інших полісахаридів. Концентрація біомаси в культуральні рідині становить 11.9 г/л.

Виробничий біосинтез екзополісахариду курдлану *A. faecalis* WX-C12, за літературними даними [10], здійснюється на поживному середовищі наступного складу (г/л):

Глюкоза –C_1 = 50; Дріжджовий екстракт –C_2 = 2; KH_2PO_4 – C_3 = 2; NH_4Cl – C_4 = 1,6; $MgSO_4*7H_2O$ – C_5 = 0,5; 1 мл р – ну мікроелементів на 1 л середовища (г/л): ($FeCl_3$ – 1; $MnCl_2$ – 1; $CaCl_2$ – 1; NaCl – 1) – C_6 = 4. **Всього** – C_Σ = 60.1 г/л.

Посівний матеріал вирощують на поживному середовищі такого складу (г/л):

Глюкоза – C_1 = 20,0; Дріжджовий екстракт – C_2 = 10; KH_2PO_4 – C_3 = 1,74; $MgSO_4*7H_2O$ – C_4 = 0,49. **Всього** – C_Σ = 32,23 г/л.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні показники:

1. час циклу роботи ферментера, де $T_{Цф} = T_ф + T_{по}$ = 48 + 10 = 58 год, де $T_{по}$ – час підготовчих операцій; $T_ф$ — час на виробничий біосинтез; **$T_{цф}$ = 58** год;
2. коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій), **K_1 = 1,1;**

3 коефіцієнт заповнення ферментера, частка, $\mathbf{K_з = 0,6}$

4 коефіцієнт заповнення посівного апарата, частка, $\mathbf{K_{па} = 0,6;}$

5 коефіцієнт заповнення інокулятора, частка, $\mathbf{K_{ін} = 0,6}$

6 коефіцієнт заповнення колб, частка, $\mathbf{K_{кол} = 0,2;}$

7 коефіцієнт заповнення збірника , частка, $\mathbf{K_{зб} = 0,7;}$

8 сумарні втрати активності при виділенні готового продукту (сума всіх втрат по стадіям виділення готового продукту), частка, $\mathbf{E_{св} = 0,2;}$

9 концентрація посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка (0,05-0,1), $\mathbf{X_{вф} = 0,1;}$

10 концентрація посівного матеріалу для посівних апаратів, частка (0,02-0,1), $\mathbf{X_{па} = 0,1;}$

11 концентрація посівного матеріалу для інокуляторів, частка, $\mathbf{X_{ін} = 0,1;}$

12 концентрація посівного матеріалу для качалочних колб, частка, $\mathbf{X_{кол} = 0,1;}$

13 втрати культуральної рідини при біосинтезі, частка, $\mathbf{E_ф = 0,1;}$

14 втрати посівного матеріалу при його культивуванні в посівних апаратах, частка, **Епа = 0,1;**

15 втрати посівного матеріалу при його культивуванні в інокуляторах, частка, **Еін = 0,1;**

16 втрати посівного матеріалу при його культивуванні в колбах, частка, **Екол = 0,01.**

6.1. Розрахунок кількості виробничих циклів

Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)

Кількість продукту на добу, в кг/добу;

$$\mathbf{G_{нд} = G_{нт}/T_{рд} = 3\ 880/30 = 129,3\ кг/добу.}$$

Кількість курдлану за цикл, в кг/цикл;

$$\mathbf{G_{цк} = G_{нд}T_{цф}/24 = 129,3 \cdot 58/24 = 313\ кг/цикл.}$$

Кількість ферментацій (циклів) на рік (ціле число):

$$\mathbf{N_{цк} = G_{нт}/ G_{цк} = 3\ 880/313 = 13.}$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл), $м^3$:

$$\mathbf{V_{кр} = К_1 G_{цк} СР_{гп}/Р_{кр} (1\text{-}Е_{св}) = 1,1 \cdot 313 \cdot 0,94/72 \cdot 0.8 = 5,6\ м^3}$$

Вихід продукту з 1 $м^3$ культуральної рідини, $л/м^3$:

$$\mathbf{q_{ац} = G_{цк}1000/V_{кр} = 313 \cdot 1000/ 5,6 = 55,9.}$$

6.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу

6.2.1. Приготування та стерилізація поживного середовищ для виробничого біосинтезу

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

$$V_ф = V_{кр}/(1 - E_ф) = 5,6/(1 - 0,1) = 6,2\ м^3$$

Кількість поживного середовища в ферментері складе:

$$V_{пс} = V_ф/(1 + X_ф) = 6,2/(1 + 0,1) = 5,6\ м^3.$$

Необхідна кількість посівного матеріалу:

$$V_{пмф} = V_ф - V_{пс} = 6,2 - 5,6 = 0,6\ м^3 = 600\ л.$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $К_з = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе:

$$V_{гф} = V_ф/К_з = 6,2/0,6 = 10,3\ м^3.$$

Обираємо стандартний ферментер геометричним об'ємом 12,5 $м^3$.

6.2.1.1 Визначаємо кількість стадій вирощування посівного матеріалу

Оскільки кількість ПМ становить $X_ф = X_і = X_{колб} = 10$ % від кількості ПС визначаємо кількість ПМ для інших стадій. Приблизна кількість ПМ для інших стадій становитиме:

$V_{пмф}$= 0.6 м^3.

$V_{ін} = V_{пмф} /К_з$=0.6/0.6=1 м^3

Обираємо інокулятор з геометричним об'ємом 1.25 м^3

ПМ для інокуклятору геометричним об'ємом 0.16 м^3 (160 л)

$V_{пін1} = V_{пмф} X_{ін}$ = 600 · 0,1 = 60 л

$V_{ін} = V_{пін1}/К_З$ = 60/0,6 = 100 л

Обираємо інокулятор з геометричним об'ємом 0.16 м^3 (160 л)

ПМ для інокуклятору геометричним об'ємом 0.02 м^3 (20 л)

$V_{пін2} = V_{пін1} X_{ін}$ = 60 · 0,1 = 6 л

$V_{ін} = V_{пін2}/К_З$ = 6/0,6 = 10 л

Обираємо інокулятор з геометричним об'ємом 0.02 м^3 (20 л)

ПМ з качалочних колб:

$V_{пмк} = V_{пін1} X_{ін}$ = 6 · 0,1 = 0.6 л

$n_{колб} = V_{пмк}/ V_{колб} · К_{зколб}$=0.6/0.75· 0.2= 4 колби

Отже, маємо 4 ступеневу стадію отримання ПМ.

6.2.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері геометричним об'ємом 12,5 м^3

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{пс}$, складають (об'єм поживного середовища у ферментері складає $V_{пс}$=5,6 м^3):

$G_ф = V_{пс} · C_ф$ = 5,6 · 60.1 = 337 кг

В тому числі покомпонентно:

Глюкоза $G_1 = G_ф · C_1/ C_ф$ = 337· 50/60.1 =280,4 кг;

Дріжджовий екстракт $G_2 = G_ф \cdot C_2 / C_ф = 337 \cdot 2/60.1 = 11,2$ кг;

K_2HPO_4 $G_3 = G_ф \cdot C_3 / C_ф = 337 \cdot 2/60.1 = 11,2$ кг;

NH_4Cl $G_4 = G_ф \cdot C_4 / C_ф = 337 \cdot 1.6/60.1 = 9$ кг;

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $G_5 = G_ф \cdot C_5 / C_ф = 337 \cdot 0.5/60.1 = 2,8$ кг;

$FeCl_3$ $G_6 = G_ф \cdot C_6 / C_ф = 337 \cdot 1/60.1 = 5,6$ кг;

$MnCl_2$ $G_7 = G_ф \cdot C_7 / C_ф = 337 \cdot 1/60.1 = 5,6$ кг;

$CaCl_2$ $G_8 = G_ф \cdot C_8 / C_ф = 337 \cdot 1/60.1 = 5,6$ кг;

$NaCl$ $G_9 = G_ф \cdot C_9 / C_ф = 337 \cdot 1/60.1 = 5,6$ кг;

Якщо об'єм поживного середовища у ферментері складає $V_{пс} = 5,6$ м^3.

Тоді кількість конденсату становитиме $V_{фк} = V_{пс} \cdot К_{кон} = 5,6 \cdot 0,1 = 0.56$ м^3. При цьому частка конденсату – $К_{кон}$ становитиме 0,1.

Під час біосинтезу курдлану необхідно досягти 120 г/л концентрації глюкози. Таку кількість вуглецю вносити відразу недоцільно, бо це спричинятиме подовження лаг-фази та появу катаболітної репресії. Після 24 год культивування вносять підживлювальний розчин у вигляду 50 % розчину. Оскільки об'єм поживного середовища у ферментері складає $V_{псф}$ =5,6 м^3, то розрахуємо кількість глюкози для підживлення:

Розрахунок глюкозного підживлення

Вихідні дані:

Об'єм пожвиного середовища $V_{пс} = 5,6$ м^3

Коефіцієнт заповнення Кз = 0,6

Кінцева концентрація джерела вуглецю Ск = 120 г/л (кг/м^3)

Початкова концентрація джерела вуглецю Сп = 50 г/л (кг/м^3)

Концентрація розчину підживлення Сж = 400 г/л (кг/м^3)

1. Розрахунок початкової маси джерела вуглецю

mп= Vр· Сп = 5,6·50 =280 кг

2. Розрахунок сумарної кінцевої маси джерела вуглецю

mк = Vр· Ск = 5,6·120 = 672 кг

3. Розрахунок сумарної маси джерела вуглецю в підживленні

mж.сум. = mк – mп = 672 – 280= 392 кг

4. Розрахунок сумарного об'єму розчину підживлення

Vж.сум. = mж/ Сж = 392 /400 = 0,98 м^3 = 980 л

При стерилізації підживлювального розчину в реакторі-змішувачі частка конденсату становитиме 0,1: $V_{пжк}$ 980 × 0,1 = 98 л

Ще для отримання максимального виходу курдлану, готують підживлюючий розчин 40 % NH_4Cl для додаткового підживлення. Аналогічно до розрахунків з підживлюючим розчином глюкози:

Розрахунок підживлення NH_4Cl

Вихідні дані:

Об'єм пожвиного середовища $V_{пс}$ = 5,6 м^3

Коефіцієнт заповнення Кз = 0,6

Кінцева концентрація джерела NH_4Cl Ск = 3.6 г/л (кг/м^3)

Початкова концентрація джерела вуглецю Сп = 1.6 (кг/м^3)

Концентрація розчину підживлення Сж = 400 г/л (кг/м^3)

5. Розрахунок початкової маси джерела вуглецю

mп= Vр· Сп = 5,6·1.6 = 9 кг

6. Розрахунок сумарної кінцевої маси джерела вуглецю

mк = Vр· Ск = 5,6·3.6 = 20,2 кг

7. Розрахунок сумарної маси джерела вуглецю в підживленні

mж.сум. = mк – mп = 20,2 – 9 = 11,2 кг

8. Розрахунок сумарного об'єму розчину підживлення

Vж.сум. = mж/ Сж = 11,2/400 = 0.028 м^3 = 28 л

При стерилізації підживлювального розчину в реакторі-змішувачі частка конденсату становитиме 0,1: $V_{пжк}$ 28 × 0,1 = 2,8 л

Загальна кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$V_{вф} = V_{пс} - G_{ф} – V_{фк} - V_{під.гл} - V_{кон.гл} - V_{під.}{}_{NH_4Cl} - V_{кон.}{}_{NH_4Cl} = 5\ 600 – 337 – 560 - 980 - 98 - 28 - 2{,}8 = 3\ 594$ л.

Все поживне середовище буде стерилізуватися за допомогою УБС (потужністю 20 $м^3$) при pH 4.5 (що забезпечується для запобігання утворення нерозчинних солей фосфору та магнію).Формуємо композиції (табл..6.1):

Таблиця 6.1

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для виробничому ферментера за допомогою УБС-20

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 5,6 $м^3$ середовища, кг (л)**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, л**
Глюкоза	50	280	А	4 490
Дріжджовий екстракт	2	11,2		
K_2HPO_4	2	11,2		
NH_4Cl	1.6	9		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	2,8		
$FeCl_3$	1	5,6		
$MnCl_2$	1	5,6		
$CaCl_2$	1	5,6		
NaCl	1	5,6		
Вода		3 594		
Конденсат		560		
Підж.р-н глюкози		980	1 078	
Конденсат		98		
Підж.р-н NH_4Cl		28	31	
Конденсат		2,8		
Разом:		5 600	5 600	

6.2.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в інокуляторі геометричним об'ємом 1.25 м^3

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі з втратами становить

$V_{ін} = V_{пін}/(1-E_ф) = 600 /(1-0,1) = 667$ л.

Кількість поживного середовища:

$V_{псін} = V_{ін}/(1+X_ф) =667/(1+0,1) =606$ л.

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарату:

$V_{пмін} = V_{ін} – V_{псін} =667-606=61$ л.

Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для інокулятору:

Загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $G_{ін} = V_{псін} \cdot C_ф = 0.606 \cdot 32.23 = 19,5$ кг, в тому числі:

Глюкоза $G_1 = G_{ін} \cdot C_1/ C_ф = 19,5 \cdot 20/ 32.23 =12.1$ кг;

Дріжджовий екстракт $G_2 = G_{ін} \cdot C_2/ C_ф = 19,5 \cdot 10/ 32.23 = 6$ кг;

K_2HPO_4 $G_3 = G_{ін} \cdot C_3/ C_ф =19,5 \cdot 1.74/ 32.23 = 1$ кг;

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $G_5= G_{ін} \cdot C_5/ C_ф = 19,5 \cdot 0.49/ 32.23 =0.3$ кг;

Визначаємо кількість конденсату $V_{інк} = V_{псін} \cdot К_{кон} = 606 \cdot 0,1 = 60,6$ л Кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде $V_{вф} = V_{псін} – G_{ін} – V_{інк} = 606 – 19,5 – 60.6= 526$ л.

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

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

Глюкоза $V_{1в} = V_{вф} (C_1/C_ф) = 526(20/32.23) = 326,1$ л

Дріжджовий екстракт $V_{2в} = V_в (C_2/C_ф) = 526(10/32.23) = 163$ л

Отже, для приготування даної композиції 490 л води, стерилізація буде проходити в реакторі-змішувачі.

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

K_2HPO_4 $V_{3в} = V_в (C_3/C_п) = 526(1.74/32.23) = 26,3$ л

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $V_{5в} = V_в (C_5/C_п) = 526(0.49/32.23) = 5,3$л

Таблиця 6.2.

6.2 Композиції для стерилізації поживного середовища в інокуляторі *об'ємом 1.25 м^3*

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 606 середовища, кг (л)**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, л**
Глюкоза	20	12.1	А	510
Дріжджовий екстракт	10	6		
Вода		490		
K_2HPO_4	1.74	1	В	35
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.49	0,3		
Вода		31,6		
Конденсат		60,6	60,6	
Разом:		606	606	

**Примітка* Солі фосфатів та магнію стерилізуються разом при пониженому pH 4.5 а при введенні в біосинтез pH стабілізують до оптимального значення

6.2.5 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в інокуляторі геометричним об'ємом 0.16 м^3

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі з втратами становить:

$V_{ін} = V_{пін}/(1-E_ф) = 61/(1-0,1) = 68$ л.

Кількість поживного середовища :

$V_{псін} = V_{ін}/(1+X_ф) = 68/(1+0,1) = 62$ л.

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарату:

$V_{пмін} = V_{ін} – V_{псін} = 68-62 = 6$ л.

Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для інокулятору:

Загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища

$G_{ін} = V_{псін} \cdot C_ф = 62 \cdot 32.23 = 2$ кг, в тому числі:

Глюкоза $G_1 = G_{ін} \cdot C_1/ C_ф = 2 \cdot 20/ 32.23 = 1.2$ кг;

Дріжджовий екстракт $G_2 = G_{ін} \cdot C_2/ C_ф = 2 \cdot 10/ 32.23 = 0.6$ кг;

K_2HPO_4 $G_3 = G_{ін} \cdot C_3/ C_ф = 2 \cdot 1.74/ 32.23 = 0.1$ кг;

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $G_5 = G_{ін} \cdot C_5/ C_ф = 2 \cdot 0.49/ 32.23 = 0.03$ кг

Визначаємо кількість конденсату $V_{інк} = V_{псін} \cdot K_{кон} = 62 \cdot 0,1 = 6.2$ л

Кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде

$V_{вф} = V_{псін} – G_{ін} – V_{інк} = 62 – 2 – 6.2 = 53,8$ л.

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

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

Глюкоза $V_{1в} = V_{вф} (C_1/C_ф) = 53,8 (20/32.23) = 33,4$ л

Дріжджовий екстракт $V_{2в} = V_в (C_2/C_ф) = 53,8 (10/32.23) = 16,7$ л

Отже, для приготування даної композиції використаємо 50 л води, стерилізація буде проходити в реакторі-змішувачі.

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

K_2HPO_4 $V_{3в} = V_в (C_3/C_п) = 53,8 (1.74/32.23) = 2,7$ л

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $V_{5в} = V_в (C_5/C_п) = 53,8 (0.49/32.23) = 0.5$ л

Отже, для приготування даної композиції використаємо 3,2 л води, стерилізація буде проходити в інокуляторі.

Таблиця 6.3.

Композиції для стерилізації поживного середовища в інокуляторі *об'ємом 0.16 м^3*

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 62 л середовища, кг (л)**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, л**
Глюкоза	20	1.3	А	52
Дріжджовий екстракт	10	0.6		60.36
Вода		50		60.36
K_2HPO_4	1.74	0.1	В	3,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.49	0.03		
Вода		3,2		
Конденсат		6,2	6,2	
Разом:		62	62	

**Примітка* Солі фосфатів та магнію стерилізуються разом при пониженому pH 4.5 а при введенні в біосинтез pH стабілізують до оптимального значення

6.2.6 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в інокуляторі геометричним об'ємом 0.02 м^3 (20 л)

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі з втратами становить:

$V_{ін} = V_{пін}/(1-E_ф) = 6 /(1-0,1) = 6,7$ л.

Кількість поживного середовища

$V_{псін} = V_{ін}/(1+X_ф) = 6,7/(1+0,1) = 6,1$ л.

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарату:

$V_{пмін} = V_{ін} – V_{псін} = 6,7-6,1=0,6$ л.

Розрахунок кількості компонентів поживного середовища виробничого ферментера:

Загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $G_{ін}$ = $V_{псін} \cdot C_ф = 6.1 \cdot 32.23 = 197$ г , в тому числі:

Глюкоза $G_1 = G_{ін} \cdot C_1 / C_ф = 197 \cdot 20 / 32.23 = 122{,}3$ г;

Дріжджовий екстракт $G_2 = G_{ін} \cdot C_2 / C_ф = 197 \cdot 10 / 32.23 = 61{,}1$ г;

K_2HPO_4 $G_3 = G_{ін} \cdot C_3 / C_ф = 197 \cdot 1.74 / 32.23 = 10{,}6$ г;

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $G_5 = G_{ін} \cdot C_5 / C_ф = 197 \cdot 0.49 / 32.23 = 3$ г;

Визначаємо кількість конденсату $V_{інк} = V_{псін} \cdot K_{кон} = 6.1 \cdot 0{,}1 = 0.6$ л. Кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде $V_{вф} = V_{псін} - G_{ін} - V_{інк} = 6.1 - 0.197 - 0.6 = 5{,}3$ л.

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

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

Глюкоза $V_{1в} = V_{вф} (C_1/C_ф) = 5{,}3 (20/32.23) = 3.3$ л

Дріжджовий екстракт $V_{2в} = V_в (C_2/C_ф) = 5{,}3 (10/32.23) = 1{,}6$ л

Отже, для приготування даної композиції використаємо 4,9 л води, стерилізація буде проходити в реакторі-змішувачі.

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

K_2HPO_4 $V_{3в} = V_в (C_3/C_п) = 5{,}3 (1.74/32.23) = 0.3$ л

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $V_{5в} = V_в (C_5/C_п) = 5{,}3 (0.49/32.23) = 0.05$ л

Отже, для приготування даної композиції використаємо 0.35 л води, стерилізація буде проходити в інокуляторі.

Таблиця 6.4.

Композиції для стерилізації поживного середовища в інокуляторі геометричним об'ємом 0.02 м^3 (20 л)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6.1 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	20	122,3	A	5 100
Дріжджовий екстракт	10	61,1		
Вода		4 900		
K_2HPO_4	1.74	10,6	B	400
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.49	3		435.83
Вода		350		435.83
Конденсат		600	600	
Разом:		6 100	6 100	

**Примітка* Солі фосфатів та магнію стерилізуються разом при пониженому pH 4.5 а при введенні в біосинтез pH стабілізують до оптимального значення

6.2.7. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках.

Оскільки об'єм поживного середовища для качалочних колб готується в колбах і стерилізується в автоклаві, конденсат не утворюється.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить:

$V_{псм} = V_{кол} = 0.6$ л (600 мл)

Кількість поживного середовища в колбах, враховуючи втрати становить:

$V_{пск} = V_{псм}/(1-E_ф) = 6/(1-0,1) = 0.67$ л.

Кількість поживного середовища в колбах:

$V_{псі} = V_{ін}/(1+X_ф) = 0.67/(1+0,1) = 0,6$ л.

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву колб:

$V_{пмін} = V_{ін} – V_{псін} = 0.67\text{-}0.6 = 70$ мл

Загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $G_{ін}$ =

$V_{пск} \cdot C_ф = 600 \cdot 32.23 = 19{,}3$ г, в тому числі:

Глюкоза $G_1 = G_{ін} \cdot C_1 / C_ф = 19{,}3 \cdot 20 / 32.23 = 12$ г;

Дріжджовий екстракт $G_2 = G_{ін} \cdot C_2 / C_ф = 19{,}3 \cdot 10 / 32.23 = 6$ г;

K_2HPO_4 $G_3 = G_{ін} \cdot C_3 / C_ф = 19{,}3 \cdot 1.74 / 32.23 = 1$ г;

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $G_5 = G_{ін} \cdot C_5 / C_ф = 19{,}3 \cdot 0.49 / 32.23 = 0.3$ г;

Кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде 600 – 19,3 = 580 мл

Дану кількість води необхідно розподілити між трьома композиціями:

термолабільним дріжджовим екстрактом та глюкозою (композиція А),

K_2HPO_4 (композиція Б), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (композиція С).

Формуємо композиції:

Таблиця 6.5.

Композиції для стерилізації поживного середовища в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0.6 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	20	12	А	400
Дріжджовий екстракт	10	6		651.6
Вода		382		651.6
K_2HPO_4	1.74	1	В	100
Вода		99		48.4
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.49	0,3	С	100
Вода		100		
Разом:		600	600	

6.3. Розрахунок матеріального балансу.

Матеріальний баланс на один цикл виробництва.

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, л	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, $дм^3$
1	*2*	*3*	*4*	*5*
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (л, кг)			
1.1.	Глюкоза	0.012	Нестерильне ПС	0.6
1.2.	Дріжджовий екстракт	0.006		
1.3.	KH_2PO_4	0.001		
1.4.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0003		
1.5.	Вода	0,58		
1.6	**Всього:**	**0.6**	**Всього:**	**0.6**
2	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ (л)			
2.1.	Нестерильне ПС	0.6	Стерильне ПС	0.6
2.2	**Всього:**	**0.6**	**Всього:**	**0.6**
3.	ВИРОЩУВАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (л)			
3.1.	Стерильне ПС	0.6	Посівний матеріал	0.67
3.2.	Посівний матеріал	0.07		
3.3	Втрати (частка)	немає		немає
3.4	Всього:	**0.67**	Всього:	**0.67**
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА на 16 л (кг, л)			
4.1.	Глюкоза	0.122	Нестерильне ПС	5,5
4.2.	Дріжджовий екстракт	0.06		
4.3.	KH_2PO_4	0.011		
4.4.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.003		
4.5.	Вода	5,3		
4.6	**Всього:**	**5,5**	**Всього:**	**5,5**
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА (л)			
5.1.	Нестерильне ПС	5,5	Стерильне ПС	6.1

5.2.	Конденсат	0.6	(втрат немає)	0,0
5.3	Всього:	**6.1**	Всього:	**6.1**
6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ на 16 л (л)			
6.1.	Стерильне ПС	6.1	Посівний матеріал	6
6.3.	Посівний матеріал з колб на качалках	0,6		
6.4.	Втрати (частка)	0.1	Втрати (кількість)	0.7
6.5	Всього:	**6,7**	Всього:	**6,7**
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ НА 160 л (кг, л)			
7.1.	Глюкоза	1,3	Нестерильне ПС	55,8
7.2.	Дріжджовий екстракт	0,6		
7.3.	KH_2PO_4	0.1		
7.4.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,03		
7.5	Вода	53,2		
7.6	Всього:	**55,8**	Всього:	**55,8**
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ НА 160 л (л)			
8.1.	Нестерильне ПС	55,8	Стерильне ПС	62
8.2.	Конденсат	6.2	(втрат немає)	0,0
8.3	Всього:	62	Всього:	62
9.	ОДЕРЖАННЯПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 160 л (л)			
9.1.	Стерильне ПС	62	Посівний матеріал	61
9.2.	Посівний матеріал інокулятора	6		
9.3	Втрати (частка)	0.1	Втрати (кількість)	7
9.4	Всього:	**68**	Всього:	**68**
10	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 1,25 $м^3$ (кг, л)			
10.1.	Глюкоза	12.1	Нестерильне ПС	545
10.2.	Дріжджовий екстракт	6		
10.3.	KH_2PO_4	1		
10.4.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3		
10.5.	Вода	522		
10.6	Всього:	**545**	Всього:	**54**

12.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 1.25 $м^3$ (кг, (л)			
12.1.	Нестерильне ПС	545	Стерильне ПС	606
12.2	Конденсат	60,6	(втрат немає)	0,0
12.3	Всього:	**606**	Всього:	**606**
13.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 1,25 $м^3$ (л)			
13.1.	Стерильне ПС	606	Посівний матеріал	600
13.2.	Посівний матеріал	61		
13.3	Втрати(частика)	0.1	Втрати (кількість)	66,7
	Всього:	**667**	Всього:	**667**
14.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ у ферментері на 12,5 $м^3$ (кг, л)			
14.1.	Глюкоза	280	Нестерильне ПС	3 932
14.2	Дріжджовий екстракт	11,2	Нестерильний підживлювальний розчин глюкози	980
14.3.	KH_2PO_4	11,2	Нестерильний підживлювальний розчин NH_4Cl	28
14.5.	NH_4Cl	9		
14.6	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,8		
14.7	$FeCl_3$ $MnCL_2$ $CaCL_2$ NaCL	5,6		
14.8	Підживлюючий розчин глюкози	980		
14.9	Підживлюючий розчин NH_4Cl	28		
14.10	Вода	3 594		
14.11	**Всього:**	**4 940**	**Всього:**	**4 940**
15.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ БІОСИНТЕЗУ курдлану (л)			
15.1.	Нестерильне ПС	4 940	Стерильне ПС	5 600

15.2	Конденсат	560		
15.3	Нестерильний підживлювальний розчин глюкози	980		
15.4	Конденсат	98		
15.5	Нестерильний підживлювальний розчин NH_4Cl	28		
15.6	Конденсат	2,8		
15.7	Всього:	5 600	Всього:	**5 600**
16.	БІОСИНТЕЗ У ВИРОБНИЧОМУ ФЕРМЕНТЕРІ НА НА 1,25 $м^3$ (л)			
16.1.	Стерильне ПС	5 600	Культуральна рідина	5 600
16.3.	Посівний матеріал з посівного апарата	600		
16.4.	Втрати (частка)	0.1	Втрати (кількість)	620
16.5	Всього:	**6 200**	Всього:	**6 200**

Оскільки, кількість культуральної рідини згідно матеріального балансу (5 600 л) співпадає із кількістю культуральної рідини, розрахованої відповідно до п. 6.1 **(5,6 $м^3$)** розрахунку партій продукту, вважаємо, що матеріальний баланс зроблено вірно.

6.1.Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання.

6.1.1 Уточнюючий розрахунок кількості ферментерів.

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

$$V_{гф}=V_ф/К_з=6,2/0,6=10,3\ м^3$$

Обираємо ферментер найближчого об`єму 1,25 $м^3$.

Кількість виробничих ферментерів при заданому $К_з$:

$$N_{фр}= V_{гф}/ V_{нф}=10,3/12,5= 0,8–\ приймаємо\ 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$К_{зф}=V_ф/(V_{нф}\times N_{фр})=6,2/(12,5\times 1)=0,5$$

Оскільки, уточнюючий коефіцієнт не перевищує заданих меж (0.5-0.65), приймаємо до установки кількість ферментерів $N_{фр}$ + 1 запасний.

6.4 Уточнюючий розрахунок кількості посівних апаратів і інокуляторів

Розразунок кількості інокуляторів (кількість ПМ і середовища 667 л)

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому $К_з$=0,6:

$$V_{гін} = V_{ін}/К_з = 0{,}667/0{,}6 = 1{,}1 \text{ м}^3.$$

Обираємо ферментер стандартний на 1,25 м^3

Кількість інокуляторів при заданому $К_{зін}$:.

$$N_{інр} = V_{гін}/ V_{нін} = 1{,}1/1{,}25 = 0{,}9 – \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення

$$К_{зін} = V_{ін}/ (V_{нін}N_{інр}) = 0{,}667/(1{,}25 \times 1) = 0{,}5$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,5-0,7) приймаємо до установки інокуляторів $N_{інр}$ + 1 запасний.

Розразунок кількості інокуляторів (кількість ПМ і середовища 68 л)

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому $К_з$=0,6:

$V_{гін} = V_{ін}/К_з = 68/0{,}6 = 113{,}3$ л.

Обираємо інокулятор на 160 л

Кількість інокуляторів при заданому $К_{зін}$:

$$N_{інр} = V_{гін}/V_{нін} = 113{,}3/160 = 0{,}7 – \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення

$$К_{зін} = V_{ін}/(V_{нін}N_{інр}) = 68/(160 \times 1) = 0{,}5$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,5- 0,7) приймаємо до установки інокуляторів $N_{Інр}$ + 1 запасний.

Розразунок кількості інокуляторів (кількість ПМ і середовища 6,7л).

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому $К_з$=0,6:

$$V_{гін} = V_{ін}/К_з = 6{,}7/0{,}6 = 11{,}2 \text{ л.}$$

Обираємо ферментер на 20 л

Кількість інокуляторів при заданому $К_{зін}$:

$$N_{інр} = V_{гін}/ V_{нін} =11,2/20= 0,7 – приймаємо 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зін} = V_{ін}/ (V_{нін}N_{інр}) =6,7/(20 \times 1)=0,5$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,5-0,7) приймаємо до установки інокуляторів $N_{Інр}$ + 1 запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб

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

$$V_{гколб} = V_{колб}/K_{колб}=670/0,2=3\ 350 мл$$

Об'єм 1 качалочної колби $V_{нколб}$ = 750 мл.

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

$$N_{колб} = V_{гколб}/V_{нколб} =3350/750= 4 , 4 приймаємо 5 колб$$

6.5 Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері

6.4.1 Уточнюючий розрахунок реактора для приготування композицій А та для стерилізації в УБС-20

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції Б.$К_{зб}$ = 0.7

$V_{Апа} = V_А/К_{зб} =4\ \ 490/0,7=\ \ 6\ 413$ л, *обираємо реактор місткістю 20 м^3*

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить :

$N_р = V_{Апа}/V_{рст} =6\ 413/20000=0,87$– приймаємо 1 .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора

$К_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст}\times N_р) =6413/20000*1=0,69$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в межах (0,7 – 0,9),

приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

Уточнюючий розрахунок реактора для приготування та стерилізації підживлюючого розчину глюкози

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації підживлюючого розчину глюкози.$К_{зб}$ = 0.7

$V_{Апа} = V_А/К_{зб}$ =980/0,7= 1 400 л, обираємо реактор місткістю 1,6 $м^3$

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить :

$N_р = V_{Апа}/V_{рст}$ =1 400/1600=0,97– приймаємо 1 .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$К_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст}×N_р)$ = 980/1600*1=0,77

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в межах (0,7 – 0,9), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

Уточнюючий розрахунок реактора для приготування та стерилізації підживлюючого розчину NH_4Cl

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації підживлюючого розчину NH_4Cl .$К_{зб}$ = 0.7

$V_{Апа} = V_А/К_{зб}$ =28/0,7= 40 л, *обираємо реактор місткістю 0,06 $м^3$* Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить :

$N_р = V_{Апа}/V_{рст}$ =40/60=0,7– приймаємо 1 .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$К_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст}×N_р)$ = 28/60*1= 0.6

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в межах (0,7 – 0,9), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

Уточнюючий розрахунок реакторів-змішувачів для приготування композиції А і Б для інокулятору обємом 1.25 м3

Композиція А

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб} = 0.7$

$V_{Апа} = V_А/К_{зб}$ =510/0,7=730 л.

Обираємо реактор місткістю 1000 л

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить:

$N_р = V_{Апа}/V_{рст}$ = 730/1000=0,74 – приймаємо 1 .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$К_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст}×N_р)$ = 510/(1000*1)=0,6

Приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

Композиція Б

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції Б. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб} = 0.7$

$V_{Апа} = V_А/К_{зб}$ =35/0,7=50 л.

Обираємо реактор місткістю 60 л

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить: $N_р = V_{Апа}/V_{рст}$ =50/60= 0.9– приймаємо 1 .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактору

$К_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст}×N_р)$ = 35/(60*1)= 0.73

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,6 – 0,9), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції Б – 1 + 1 запасний (2 шт.).

Уточнюючий розрахунок реакторів-змішувачів для приготування композиції А і Б для інокулятору з обємом 0.16 м3

Композиція А

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб} = 0.7$

$V_{Апа} = V_А/К_{зб} = 52/0,7 = 74$ л.

Обираємо реактор змішувач на 100 л

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить: $N_р = V_{Апа}/V_{рст} = 74/100 = 0,75$– приймаємо 1 .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$К_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст} \times N_р) = 52/(100*1) = 0,6$

Приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

Композиція Б

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб} = 0.7$

$V_{Апа} = V_А/К_{зб} = 3,8/0,7 = 5,4$ л.

обираємо реактор змішувач на 10 л

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить:

$N_р = V_{Апа}/V_{рст} = 5,4/10 = 0,58$ – приймаємо 1 . Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора : $К_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст} \times N_р) = 3,8/(10*1) = 0.46$

Приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції Б – 1 + 1 запасний (2 шт.)

Уточнюючий розрахунок реакторів-змішувачів для приготування композиції А і Б для інокулятору з обємом 0.02 м^3

Композиція А

Підбираємо геометричний об’єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об’єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб}$ =0.7

$V_{Апа} = V_А/К_{зб}$ =5.1/0,7=7.3 л.

обираємо реактор змішувач на 10 л

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить:

$N_р = V_{Апа}/V_{рст}$ = 7.3/10=0,73 – приймаємо 1 .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$К_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст}×N_р)$ = 5.1/(10*1)= 0,6

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,6 – 0,9), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

Композиція Б

Підбираємо геометричний об’єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об’єм реактора- змішувача при заданому $К_{зб}$=0.7

$V_{Апа} = V_А/К_{зб}$ =0.4/0,7=0.57 л.

Обираємо колбу на 750 мл

Кількість колб при заданому $К_{зб}$ становить:

$N_р=V_{Апа}/V_{рст}$=0.57/0.75 =0,73– приймаємо 1.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$К_{зр}=V_{Апа}/(V_{рст}×N_р)$=0.4/(0.75*1)=0, 6

Приймаємо до установки кількість колб для приготування композиції Б – 1 + 1 запасний (2 шт.)

Розділ 7. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. *графічна частина*), наведена у табл. 7.1.

Таблиця 7.1.

Специфікація ділянки допоміжних робіт,виробничого біосинтезу та після ферментаційних робіт курдлану *A.faecalis WX-C12*

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Р-1	Реактор для відпрацьованого миючого засобу	1	Реактор для відпрацьованого миючого засобу номінальним об'ємом 15 м^3 (частина CIP-мийки), сталь AISI 316 L ASTM. Виробник: Виробник: «ПМ АТТІС» (Україна)[1*].
Р-4	Реактор-змішувач для приготування робчого розчину вімолу	1	Реактор-змішувач для приготування робчого розчину номінальним об'ємом 15 м^3 (частина CIP-мийки), сталь AISI 316 L ASTM, оснащений перемішувальним пристроєм, ізотермічною сорочкою. Виробник: Виробник: «ПМ АТТІС» (Україна)[1*].
ПЗ-6	Пристрій для забору повітря	1	Повітрозбірник А1И 017.000 Фірма: «НПЦ Вектор-Кондвент». Повітрозабірник, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень. Робочий тиск- 1,2 мПА[2*]
Ф-7	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр G4. Фільтруючий матеріал – скловолокно Pain Stop, Площа фільтруючої поверхні 0,48 м^2, продуктивність 2500-6300 м^3 / год.Виробник: Компанія «Элвент», Росія [3*]

К-8	Компресор	1	Компресор потужністю 16 л/с, робочий тиск 1 МПа. Виробник: «Airpol K7» (Польща) [4*]
Т-9	Теплообмінник-охолоджувач	1	Повітренагрівач канальний водяний Systemair VBC. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 150 ºС. Виробник: «Systemair» (Швеція). [5*]
Р-10	Ресивер	1	Ресивер Р 270.600. Об'єм 270 л, робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «ЭНТЕХ» (Україна).[6*]
Т-11	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітренагрівач канальний водяний Systemair VBC. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 150 ºС. Виробник: «Systemair» (Швеція). [5*]
Ф-12	Головний фільтр очистки	1	Фільтр HEPA. Фільтруючий матеріал – мікроскловолокно, швидкість фільтрування – 3 300 $м^3$/год, Е = 99,95 %. Виробник: «Технофильтр» (Росія). [7*]
Д-14 Д-17 Д-20	Дозатор	3	Об'ємно- ваговий дозатор призначений для дозування рідких та сипких компонентів від 1г з точністю 0,01 г. Виробник: «KELI» (Україна).[8*]
Д-22 Д-25 Д-35 Д-38 Д-42 Д-45	Дозатор	6	Об'ємно- ваговий дозатор з точністю ±3%.Призначений для дозування рідких та сипких компонентів поживного середовища до 10 000 л. Виробник: «Автомік» (Україна).[9*]
Н-26	Насос відцентровий	1	Насоси горизонтальні відцентрові GTP. Продуктивність 1.2 $м^3$/год, матеріал поліпропілен (PP/PVDF). Виробник: «Промнасос» (Росія)[10*]
Н-36	Насос відцентровий	1	Насоси горизонтальні відцентрові GTP Продуктивність 10.8 $м^3$/год, матеріалполіпропілен (PP/PVDF).Виробник:«Промнасос» (Росія)[10*]
Н-40	Насос відцентровий	1	Насоси горизонтальні відцентрові GTP.Продуктивність 9.6 $м^3$/год, матеріал поліпропілен (PP/PVDF). Виробник: «Промнасос» (Росія)[10*]

Н-50	Насос кулачковий	1	Насос кулачковий з резиновими лопатями типу LB. Продуктивність- 120 $м^3$/год Робочий тиск-10 бар Виробник: «Steiner»(Німеччина)[15*]
Ф-18 Ф-23 Ф-29 Ф-31 Ф-33 Ф-39 Ф-43 Ф-46 Ф-49	Індивідуальний фільтр	10	Фільтр повітряний *Ultradepth IIP-SRF*. Фільтруючий матеріал - боросилікат, діапазон температур від -20 до 200 °С, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 %.. Виробник: «Donaldson» (США).[12*]
ЗП-28	Засівний пристрій	1	Засівний пристрій для подачі посівного матеріалу вирощеного в колбі об'ємом 750 мл
ІН-27	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 20 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником і лопатевою мішалкою (20-300 об/хв), сталь 316L Висота- 0,6. Діаметр-0,3. Виробник: «BIORUS» (Росія)**[13*].**
Р-13	Реактор-змішувач для композиції Б	1	Реактор об'ємом 10 л, оснащений ізотермічною сорочкою, пробовідбірником і лопатевою мішалкою (20-300 об/хв), сталь 316L.Призначений для стерилізації. Висота- 0,5. Діаметр-0,25. Виробник: «Технолог» (Росія)**[17*]**
Р-16	Реактор-змішувач для композиції А	1	Реактор об'ємом 10 л, оснащений ізотермічною сорочкою, пробовідбірником і лопатевою мішалкою (20-300 об/хв), сталь 316L.Призначений для стерилізації. Висота- 0,5. Діаметр-0,25. Виробник: «Технолог» (Росія)**[17*]**
Р-19	Реактор-змішувач для композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 100 л оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь нержавіюча.Робоча температура -25+200°С. Висота- 0,7. Діаметр-0,35. Виробник: «СибМашПолимер» (Росія)[18*]

ІН-30	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 160 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником і лопатевою мішалкою (20-300 об/хв), сталь 316L. Висота- 0,7. Діаметр-0,38. Виробник: «BIORUS» (Росія)[13].*
Р-24	Реактор-змішувач для композиції Б	1	Реактор-змішувач для розчинення об'ємом 1 $м^3$ оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316.Емальований УЭС-300. Висота- 1,0. Діаметр-0,5 Виробник: «Технолог» (Росія)[17*]
Р-21	Реактор-змішувач для композиції А	1	Реактор-змішувач для стерилізації об'ємом 100 л оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (0-1000 об/хв), сталь 316L. Висота- 0,7. Діаметр-0,35. Виробник: «Промвит» (Росія)[16*].
ІН-32	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 1 250, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником і лопатевою мішалкою (20-300 об/хв), сталь 316L. Висота- 1,6. Діаметр-0,8. Виробник: «BIORUS» (Росія)[13*].
Р-34	Реактор-змішувач для поживного середовища	1	Реактор-змішувач для розчинення об'ємом 6,3 $м^3$оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Емальований УЭС-300. Робоча температура -25+200°С. Висота-1,7. Діаметр-1,2.Виробник: «СибМашПолимер» (Росія)[18*].
УБС-47	Установка безперервної стерилізації	1	УБС потужністю 20 $м^3$/год фірми «Hidroster»[14*]
Р-37	Реактор-змішувач для підживлювального розчину глюкози	1	Реактор-змішувач для стерилізації об'ємом 3.2 $м^3$,оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (0-1000 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. Висота- 2,0. Діаметр-1,0 Виробник: Виробник: «СартоСократ» (Україна)[19*]
Р-41	Реактор-змішувач для підживлювального розчину амонію хлориду	1	Реактор-змішувач для розчинення та стерилізації об'ємом 100 л оснащений ізотермічною сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв),робочий тиск-0,6 мПа сталь AISI 316. Емальований УЭС 300. Висота- 0,7. Діаметр-0,35 Виробник:«Технолог»(Росія)[17*]

Р-44	Реактор-змішувач для розчину 6% натрій гідроксиду	1	Реактор об'ємом 20 л, оснащений сорочкою, призначений для стерилізації, пробовідбірником і лопатевою мішалкою, сталь 316L. Висота- 0,6. Діаметр-0,3. Виробник: «СартоСократ» (Україна)[19*]
Фр-48	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 12,5 м^3, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником і перемішуючим пристроєм сталь нержавіюча AISI 316L. Висота- 3,2. Діаметр-1,6 Виробник: «BIORUS» (Росія)[13*]
З-49	Збірник	1	Збірник емальований об'ємом 6,3 м^3; Матеріал – сталь нержавіюча AIS; Обладнаний сорочкою; оснащений перемішуючим пристроєм; Діаметр - 1,2 м; Висота – 1,7 м; Виробник – Україна[32*]
З-63	Збірник	1	Збірник емальований об'ємом 50 м^3; Матеріал – сталь нержавіюча AIS; Обладнаний сорочкою; оснащений перемішуючим пристроєм; Діаметр - 3 м; Висота – 8 м; Виробник – Росія[20*]
З-52 З-55	Збірник	2	Збірник емальований об'ємом 10 м^3; Матеріал – сталь нержавіюча AIS; Обладнаний сорочкою; оснащений перемішуючим пристроєм; Діаметр - 2,2 м; Висота – 4,4 м; Виробник – Росія[31*]
З-61	Збірник	1	Збірник емальований об'ємом 6,3 м^3; Матеріал – сталь нержавіюча AIS; Обладнаний сорочкою; оснащений перемішуючим пристроєм; Діаметр - 1,2 м; Висота – 1,7 м; Виробник – Україна[32*]
З-57	Збірник	1	Збірник емальований об'ємом 25 м^3; Матеріал – сталь нержавіюча AIS; Обладнаний сорочкою; оснащений перемішуючим пристроєм; Діаметр - 2,8 м; Висота – 6 м; Виробник – Україна[32*]

З-65	Збірник	1	Збірник емальований об'ємом 20 $м^3$; Матеріал – сталь нержавіюча AIS; Обладнаний сорочкою; оснащений перемішуючим пристроєм; Діаметр - 2,5 м; Висота – 6 м; Виробник – Україна[32*]
Н-50 Н-60	Насос відцентровий	2	Насоси відцентрові шестиринчасті Продуктивність 20 $м^3$/год Виробник - Росія [36*]
Н-58	Насос відцентровий	1	Насоси відцентрові Packo типу FMS із високоякісної сталі Продуктивність 10,8 $м^3$/год Можливе перекачування в'язких розчинів Макисмальна подача на висоту до 10 м Виробник - Росія [35*]
Н-62	Насос відцентровий	1	Насоси відцентрові шестиринчасті Продуктивність 37 $м^3$/год Виробник - Росія [36*]
Н-53 Н-56	Насос	2	Насос 3LM4E 32-160/0.37 моноблочний потужністю 0.37 кВт з торцевим підключенням у відповідності із стандартом EN 733 виготовлені із нержавіючої сталі AISI 316. Максимальний робочий тиск: 1 МПа. Подача на висоту до 9 м; Продуктивність 10 $м^3$/год Виробник – Ebara Німеччина[22*]
Н-64	Насос	1	Насос поверхневого типу виготовлені із нержавіючої сталі AISI 316 Продуктивність – 50 $м^3$/год Виробник – Ezora Італія [37*]
Н-66	Насос	1	Насос поверхневого типу виготовлені із нержавіючої сталі AISI 316 Продуктивність – 100 $м^3$/год Виробник – Ezora Італія [37*]
Д-51 Д-54	Дозатор для рідких та сипучих компонентів	4	Дозатор для рідких та сипучих компонентів напівавтоматичний ДВСВ-S Дана система розливу і дозування виконана з харчової нержавіючої сталі. Установка доз від 0,2-1000 кг/доз Продуктивність- 1000 кг доз/год

			Похибка 0,1 % Виробник – «Политехник» Росія [23*]
С-59	Сепаратор	1	Сепаратор з автоматичним періодичним відцентровим розвантаженням осаду ОС3-НС Продуктивність – 10 $м^3$/год Повністю герметична сепарації система використовується для видалення часток розмірами від 0,5 до 500 мкм з рідини (сепарація бактерій, продуктів РДНК, ферментів, клітинних культур і вакцин) Оптимізовано для систем CIP. Виробник – «ХодПрофі» огруп, Росія [24*]
УФ-67	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка виконана з нержавіючої сталі AISI 316. Матеріал мембрани - полівініліденфторид Діаметр пор – 0,03 мкм Продуктивність – до 30 000 л /год Виробник – «Nagema» Україна [25*]
Ф-68	Нутч-фільтр	1	Нутч-фільтр серії D виготовлений з нержавіючої сталі AISI 316 . Знімне або фіксоване днище, система вивантаження осаду Фільтруюча поверхня – 8-16 $м^2$ Продуктивність – 1250 кг/год Виробник – «Евромаш» Україна [38*]
Т-69 Т-71 Т-73 Т-75	Транспортер	4	Транспортер стрічковий для харчових продуктів Максимальна довжина вигрузки – до 8 м Продуктивність – до 10 т/год (регулюється) Виробник – «Артмаш» Росія [26*]
СШ-70	Вакуум-сушильна шафа	1	Вакуум- сушильна шафа СВ-80 з нержавіючої сталі AISI 304. Зовнішній корпус шафи виготовлений зі сталі з полімерним порошковим покриттям. Потужність – 196-1873 л. Кількість полиць – 3- 14 шт. Загальна площа поверхні полиць 15,44 $м^2$. Максимальна температура поверхні полиць 200 ° С. Виробник- «СтандартМ» Україна [27*]

ФМ-74	Фасувальна машина	1	Фасувальна мащина ФСВ-50. Потужність- 6,5 кВт 380 ± 10% 50Гц Пакувальні матеріали: Сумки з покриттям (покрита плівка) , крафтові мішки ,пластмасова композитна плівка Продуктивність – 50 кг/год Виробник –«PachTech" США [28*]
Д-72	Дробарка	1	Дробарка молоткова з тангенціальним підводом повітря ДМ-60 Потужність - 250 кВт Діаметр сита- 0,3-1,5мм. Виконана з харчової нержавіючої сталі. Насипна щільність 0,2 - 0,8 кг/дм3 при вологості до 15%. Виробник –« Bühler " Швейцарія [30*]
ММ-76	Маркувальна машина	1	Маркувальна машина VARIOZET 4 Продуктивність – 3600 штампів/год Виробник –« Skilt» Китай [29*]

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

1http://www.attis.com.ua/site/equipment/CIP.html

2 - https://npc-vektor-kondvent.all.biz/vozduhosbornik-protochnoj-gorizontalnyj-a1i-017000-g189721

3-http://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtruyuschie-materialy/steklovolokno-filtruyuschij-material/filtruyuschij-material-iz-steklovolokna-pain-stop-i-dust-stop-dlya-pokrasochnoj-kamery-fl-k-fvr/#tabs-tehnicheskie_harakteristiki

4 - http://www.airpol.com.pl/kategoria/3-kw-22-kw-wykonanie-standardowe/91

5-http://www.systemair-ukraine.com/air-heaters.html

6 https://prom.ua/Resiver-900.html7 - www.debem.com.ua

7- http://tehnofilter.com.ua/filtry-vozdushnyye/filtr-tonkoy-ochistki-vozdukha-ftov-hepa

8http://avtomiks.com.ua/ua/pro_beton_ua/legki_betoni_ta_virobi_na_iih_osnovi/osnovni_tehnologichni_procesi_ta_obladnannja.html

9 - https://keli.com.ua/vesovye-dozatory-vidy-harakteristiki/

10-https://www.prom-nasos.com.ua/catalog/gtp/

11- https://www.reatorg.ru/equipment/item/laboratornyy-steklyannyy-reaktor-na-3l-fc302/

12- http://www.emea.donaldson.com

13- http://bio-rus.ru/

14-https://agrovektor.com/physical_product/620496-sterilizacionnoe-oborudovanie-nepreryvnogo-deystviya-hidroster.html

15-http://steiner-pumps.com/pumps/lobe-pump/kulachkovyj-nasos-s-rezinovymi-lopastyami-serii-lb/

16-https://promvit.com.ua/category/mashiny-po-prigotovleniyu/myagkix-i-zhidkix-lekarstvennyx-form/reaktory-promyshlennye-dlya-mazej-i-kremov/

17- https://tehnolog.com.ua/catalog/pharma/mixers-for-liquid-viscous-and-paste-like-products/
18- http://www.smp-prom.ru/goods/28947713-yemkost_promyshlennaya
19-http://sartorius.com.ua/laboratornij_fermenter__bioreaktor_biostat_b_plus.html
20. https://www.sibmashpolymer.ru/proekty/rektori_s_peremesh_ustroistvom

21. https://dalgakiran.ua/uk/products/vidcentrovi-nasosy-dlya-harchovoyi-i-farmacevtychnoyi-promyslovosti

22. https://watton.ua/ebara-nasos-3lm4e-32-160-037.html

23. https://polytechnic.com.ua/products-rus/dvsv-s-rus/

24. https://hprofi.com/p48331958-separator-slivkootdelitel-os3.html

25. https://ecosoft.ua/promyshlennaya-sistema-ultrafiltratsii-ecosoft-uf-30/

26. https://artmash.ua/ru/category/transportery

27. http://standart-m.com.ua/ispytatelnoe-oborudovanie/medicinskih-laboratorij/shkafy-sushilnye/sushilnie-vakuumnie-

28. https://packtech.com.ua/oborudovanie/fasovochnoe/avtomaty-serii-mastadont/af-10 v

29. https://www.spt-ukr.com/item/i537

30. https://former.buhlergroup.com/europe/ru/2103.htm

31. http://hp-sistema.ru/shop/product/25-sbornik-emkost-stal-naya-futerovannaya-ob-emom-10-m3.html

32. https://promvit.com.ua/reaktor-630-l-s-vstroennym-gomogenizatorom/

33. https://www.prostanki.com/board/item/185529

34. https://e4a.ru/category/emkosti/nerj-9-100

35. https://www.prom-nasos.com.ua/catalog/gtp/

36. https://global-torg.com.ua/p29923250-promyshlennyj-shesterenchatyj-nasos.html?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=9723602142&utm_term=&utm_content=427731446627&utm_position=&utm_matchtype=&utm_placement=&utm_network=u&gclid=Cj0KCQjwzZj2BRDVARIsABs3l9KovWQXxEXqbU742oi2h58RdSn4JOts9x7YclDL2xm5yogS0is8ypMaAnTuEALw_wcB

37. https://220volt.com.ua/nasos-poverhnostnij-aquatica-acm300c2-775271/

38. http://euromash.kiev.ua/ru/nutch_filtr_ru.php

Розділ 8. Опис технологічної схеми

Технологічна схема біосинтезу цільового продукту - екзополісахариду курдлану, складається зі стадій допоміжних робіт та стадій основного технологічного процесу.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка мийних та дезінфікуючих засобів

ДР 1.1.1. Приготування робочого розчину «Вімол» для миття обладнання.

Для здійснення миття ємнісної апаратури необхідно 246 424 л 0,5%-го робочого розчину *«Вімол ”.*

Для його приготування у реактор змішувач CIP мийки *Р-4*, об’ємом 15 м^3, обладнаного перемішуючим пристроєм через об’ємно-ваговий дозатор Д-3 вносять 1 1 232 г порошку «*Вімол*» та додають 245 192 л питної води. Для повного розчинення вмикають перемішуючий пристрій.

ДР 1.1.2 Приготування робочих розчинів дезінфікуючих засобів

ДР 1.1.2.1 Приготування робочого розчину «Хлорантіон» для генерального прибирання

Для приготування 0, 2 % розчину *«Хлорантіон»* у збірник, об’ємом 1м^3 додають 1,27 кг дезінфікуючого розчину та 638 л водопровідної води. Для повного розчинення вмикають перемішуючий пристрій.

ДР 1.1.2.2 Приготування робочого розчину «Ласепт» для щоденного прибирання

Для приготування 0,2 % розчину «Ласепт» у збірник, об’ємом 30 л додають 60 мл концентрату дезінфікуючого розчину та 29 940 мл водопровідної води.

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень

Для щоденного прибирання виробничих приміщень підприємства використовують воду та миючі засоби. При проведенні вологого прибирання виробничих приміщень користуються 0,2 % розчином «Ласепт» (від ДР 1.1.2.2).

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання приміщень

При генеральному прибиранні виробничого приміщення застосовується 0,2 %-й розчин *«Хлорантіон»* (від ДР 1.1.2.1).

ДР 1.3. Підготовка технологічного обладнання

ДР 1.3.1. Миття ферментаційного обладнання

Миття обладнання у виробничому цеху, цеху вирощування посівного матеріалу відбуваються автоматизованим методом (за допомогою CIP мийки).

ДР 1.3.2. Ополіскування обладнання

Проводять з метою змиву залишків миючих розчинів з поверхні обладнання за допомогою водои при температурі 20–25°С. Далі, після змиву, вода направляється на стадію знешкодження відходів до ЗВ 13.3.

ДР 1.3.2. Перевірка обладнання на герметичність

Перевірку на герметичність проводять створюючи в апараті тиск Р = 0,1–0,2 МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують покази манометра.

ДР 1.3.3. Стерилізація ферментаційного обладнання

Стерилізацію здійснюють гострою парою безпосередньо в апарат через барботер або нижній спуск за температури стерилізації $t_{ст}$ = 130–135 °С. При стерилізації апарата паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Враховуючи висоту будівлі підприємства (близько 6 м), забір атмосферного повітря відбуватиметься на висоті близько

2–4 м над будівлею, тобто 10 м. Забір здійснюється повітрозбірником *Пз-6.*

ДР 2.2. Грубе очищення повітря від пилу та часточок

На цій стадії з повітря видаляється основна маса великих механічних часточок та пилу. Для цього використовують фільтри грубої очистки *Ф-7*. Ступінь очищення 80 %.

ДР 2.3. Стиснення повітря

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

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Щоб запобігти випаданню вологи в крапле-вловлювачі, повітря «переохолоджують» до 25°С в теплообміннику *Т-9*. Далі у ресивері *Р-10* відбувається стабілізація вологості повітря W = 60 %.

ДР 2.5. Стабілізація термодинамічних показників

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

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Подальше очищення повітря відбувається у фільтрі *Ф-12*, як фільтрувальний матеріал використовують поліпропіленові волокна. Ступінь очистки такого повітря становить Е = 95 %. Головні фільтри, зазвичай, встановлюють поблизу ферментаційних відділень;

ДР 2.7. Очистка повітря в індивідуальному фільтрі

Кінцева стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальних фільтрах (*Ф-15, Ф-18 ,Ф-23,Ф-29,Ф-31,Ф-33,Ф-39,Ф-43, Ф-46, Ф-49*). Очищення в індивідуальних фільтрах. Повітря від головних фільтрів через трубопроводи (колектори) подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів, встановлених на ферментері. При цьому повітря очищають до ступеня очищення Е 99,99%.

Далі стерильне аераційне повітря надходить на інші стадії виробничого процесу.

ДР 3.1 . Підготовка титрувальних агентів

ДР 3.1.1 Приготування HCl.

Розчин HCl варто готувати у розрахунку 2 мл на 1 л середовища

Таблиця 8.1

Розрахунок кількості компонентів для приготування 6% HCl

Об'єм титрованого розчину,л	**Об'єм необхідної кількості 6% HCl (З 10% запасом),мл**	**Кількість HCl для приготування 6% титрувального розчину,л**	**Кількість води для приготування розчину,мл**
4,3	9,5	1,5	8
56	113	18	95
550	1 210	193	1 017
Всього на 610 л	**1 333**	**212,5**	**1 120**

ДР 3.1.1.1 Приготування 6% розчину хлоридної кислоти для інокулятору об'ємом 20 л

У колбу об'ємом 50 мл відміряють 8 мл питної води. Далі при постійному перемішуванні вносять 1,5 мл 37% розчину HCl.

ДР 3.1.1.2 Приготування 6% розчину хлоридної кислоти для інокулятору об'ємом 160 л

У колбу об'ємом 150 мл відміряють 95 мл питної води. Далі при постійному перемішуванні вносять 18 мл 37% розчину HCl.

ДР 3.1.1.3 Приготування 6% розчину хлоридної кислоти для інокулятору об'ємом 1 250 л

У колбу об'ємом 1, 5 л відміряють 1 017 мл питної води. Далі при постійному перемішуванні вносять 193 мл 37% розчину HCl.

ДР 3.2.1 Приготування стерильного 6% розчину гідроксиду натрію

Розчин 6% гідроксиду натрію застосовують для нейтралізації середовища тобто вирівнювання оптимального значення pH. Розчин NaOH варто готувати у розрахунку 2 мл на 1 л середовища.

Таблиця 8.2

Розрахунок кількості компонентів для приготування 6% NaOH

Об'єм титрованого розчину,л	**Об'єм необхідної кількості 6% NaOH (З 10% запасом),мл**	**Кількість NaOH для приготування 6% титрувального розчину,л**	**Кількість води для приготування розчину,мл**
6,1	13,4	0,8	12,6
62	136	7,4	128,6
606	1 333	75	1 258
5 600	12 320	697	11 623
Всього на 6 274 л	**13 802**	**780**	**13 022**

ДР 3.2.1.1 Приготування та стерилізація розчину 6% гідроксиду натрію для інокулятору об'ємом 20 л

На аналітичних вагах, зважують 0,8 г NaOH, який вносять у колбу об'ємом 100 мл, додають 12,6 мл питної води при постійному перемішуванні. Після повного розчинення стерилізують при температурі 131°С та тиску 1,15 МПа протягом 40 хв.

ДР 3.2.1.2 Приготування та стерилізація розчину 6% гідроксиду натрію для інокулятору об'ємом 160 л

На технічних вагах, зважують 7,4 г NaOH, який вносять у колбу об'ємом 150 мл, додають 128,6 мл питної води при постійному перемішуванні. Після повного розчинення стерилізують при температурі 131°С та тиску 1,15 МПа протягом 40 хв.

ДР 3.2.1.3 Приготування та стерилізація розчину 6 % гідроксиду натрію для інокулятору об'ємом 1250 л

На технічних вагах, зважують 75 г NaOH, який вносять у колбу об'ємом 1,5 л л, додають 1258 мл питної води при постійному перемішуванні. Після повного розчинення стерилізують при температурі 131°С та тиску 1,15 МПа протягом 40 хв.

ДР 3.2.1.4 Приготування та стерилізація розчину 6% гідроксиду натрію для ферментера об'ємом 12 500 л

Через об'ємно-ваговий дозатор, *Д-45*, зважують 697 г NaOH, який вносять у реактор, *Р-44* об'ємом 10 л, додають 11,6 л питної води при постійному перемішуванні 50 – 100 об/хв. Після повного розчинення стерилізують при 131^0С упродовж 40 хв.

ДР. 3.2 Приготування і стерилізація підживлювального розчину глюкози

Також готують 40% розчин глюкози для підживлення культури після 24 годин культивування. Через об'ємно-ваговий дозатор, *Д-35*, зважують 312 кг глюкози. Наважку поміщають в реактор *Р-34* об'ємом 1,6 $м^3$ та додають 980 л води. Вмикають перемішуючий пристрій та перемішують до отримання однорідної суспензії. Стерилізують гострою парою при температурі 112°С та тиску 0,05 МПа протягом 30 хв.

ДР 3.3 Приготування і стерилізація підживлювального розчину NH_4Cl

Готують розчин NH_4Cl для подальшого підживлення культури на 14 годині культивування.

Через об'ємно-ваговий дозатор, *Д-39*, зважують 11,2 кг NH_4Cl. Наважку поміщають у реактор, *Р-38* об'ємом 60 л та додають 28 л води. Вмикають перемішуючий пристрій і ретельно перемішують. Стерилізують гострою парою при температурі 131°С та тиску 1,15 МПа протягом 40 хв

ДР 3.4 Приготування реагентів для після ферментаційних процесів

ДР 3.4.1. Приготування 3М розчину NaOH

За даними літератури [48], для розведення культуральної рідини необхідно використати 3 М розчину гідроксиду натрію у співвідношенні (1.8 гідроксиду натрію : 1 культуральної рідини).

Згідно з розрахунками матеріального балансу, об'єм культуральної рідини становить 5,6 м^3 за цикл. Отже, необхідно приготувати 10 м^3 3М розчину гідроксиду натрію.

Для приготування 10 м^3 розчину лугу в збірнику (З-55) об'ємом 25 м^3 на об'ємно-ваговому дозаторі (Д-54) зважують 1 400 кг гідроксиду натрію та подають питну воду об'ємом 8 600 л. Проводять перемішування протягом 30 хв до повного розчинення лугу. Розчин передають за допомогою моноблочного насосу (Н-56) до збірника (З-57).

ДР 3.4.2 Приготування 3М розчину HCl

За даними літератури [48], для розведення культуральної рідини необхідно використати 3 М розчину хлоридної кислоти у співвідношенні (1.8 хлоридної кислоти : 1 культуральної рідини).

За аналогічними розрахунками (як для приготування розчину гідроксиду натрію) необхідно приготувати 10 м^3 хлоридної кислоти для осадження екзополісахариду курдлану.

Для приготування 10 м^3 розчину кислоти в збірнику (З-52) об'ємом 25 м^3 на об'ємно-ваговому дозаторі (Д-51) подають 780 л концентрованого розчину хлоридної кислоти та подають питну воду об'ємом 9 200 л. Проводять перемішування протягом 30 хв до повного розчинення кислоти. Розчин передають за допомогою моноблочного насосу (Н-53) до збірника (З-57).

ДР 3.4.3 Підготовка та зберігання дистильованої води

Очищена вода готується шляхом багаторазового випарювання у дистиляторі та подається у збірник (З-63). Дистильовану воду подають за допомогою моноблочного насосу (Н-64) до збірника (З-65).

ДР .4 Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР.4.1 Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках

Розрахунок вмісту компонентів представлено нижче *(табл.8.3)*

Таблиця 8.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 600 мл середовища

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 600 мл середовища, г (мл)**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, мл**
Глюкоза	20	12	A	230
Дріжджовий екстракт	10	6		
Вода		212		
K_2HPO_4	1.74	1	B	150
Вода		149		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.49	0,3	C	150
Вода		149,7		
Разом:				530

-ДР 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 12 гр глюкози та 6 гр дріжджового екстракту. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл, заливають 212 мл питної води і ретельно перемішують суміш, щоб утворилася однорідна суспензія. Закривають колбу ватно – марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112^{o}С та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

-ДР .4.1.2 Приготування і стерилізація композиції В

На аналітичних вагах у відтарованій ємності зважують 1 гр KH_2PO_4. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл, заливають 149 мл питної води і ретельно перемішують суміш. Закривають колбу ватно – марлевою пробкою і відправляють на стерилізацію в автоклав при темперетурі 131^{o}С та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

-ДР .4.1.3 Приготування і стерилізація композиції С

На аналітичних вагах у відтарованій ємності зважують 0.3 гр $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл, заливають 149,7 мл питної води і ретельно перемішують суміш. Закривають колбу ватно – марлевою пробкою і

відправляють на стерилізацію в автоклав при темпереТурі 131°С та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

-ДР 4.2. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л

Розрахунок вмісту компонентів представлено нижче *(табл.842)*

Таблиця 8.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6,7 л середовища

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 6,7 л середовища, г (мл)**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, мл**
Глюкоза	20	134	А	1 680
Дріжджовий екстракт	10	67		
Вода		1470		
K_2HPO_4	1.74	11,6	В	4 320
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.49	3.3		
Вода		4 300		
Разом:				6 000

-ДР .4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 134 гр глюкози та 67 гр дріжджового екстракту. Наважки переносять у конічну колбу об'ємом 3 л, заливають 1 470 мл питної води і ретельно перемішують, щоб утворилася однорідна суспензія. Стерилізують в автоклаві при температурі 112°С та тиску 0,5 атм протягом 30 хв. Потім в асептичних умовах вносять в попередньо простерилізований інокулятр Ін-27.

-ДР . 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор Д-14 зважують 11,6 гр KH_2PO_4 та зважують 3.3 гр $MgSO_4*7H_2O$. Наважки поміщають у реактор Р-13 об'ємом 10 л, заливають 4 300 мл питної води. Після цього ретельно перемішують, щоб утворилася однорідна суспензія. Стерилізують при темперетурі 131^oC та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв. Потім в асептичних умовах вносять в попередньо простерилізований інокулятр Ін-27.

-ДР 4.3. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 160 л

Таблиця 8.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 68 л середовища

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 68 л середовища, кг (л)**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, л**
Глюкоза	20	1,4	А	5
Дріжджовий екстракт	10	0.7		
Вода		2,9		
Конденсат		0,6		
K_2HPO_4	1.74	0.12	В	56
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.49	0.034		
Вода		50		
Конденсат		5,6		
Разом:				61

-ДР.4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор Д-17 подають 1.4 кг глюкози та 0.7 кг дріжджового екстракту. Наважки поміщають в попередньо простерилізований

реактор Р-16 об’ємом 10 л, заливають 2,9 л питної води, з врахуванням конденсату і вмикають перемішуючий пристрій, щоб утворилася однорідна суспензія. Стерилізують гострою парою при температурі 112^{o}С та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

-*ДР.4.3.2 Приготування і стерилізація композиції В*

Через об’ємно-ваговий дозатор Д-20 подають 0.12 кг KH_2PO4 та 0.034 кг $MgSO_{4*}7H_2O$. Наважки поміщають в попередньо простерилізований реактор Р-19 об’ємом 100 л. Через об’ємно-ваговий дозатор Д-20 подають воду - 50 л з врахуванням конденсату і перемішують, за допомогою мішалки. Після чого солі перекачують в попередньо простерилізований інокулятор Ін-30 та композицію А (від ДР 4.3.1) об’ємом 160 л і додають 6% HCl (від *ДР 3.1.1.2*). Вмикають перемішуючий пристрій, щоб утворилася однорідна суспензія. Стерилізують гострою парою при темперетурі 131^{o}С та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

-ДР . 4.4 Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об’ємом 1 250 л

Таблиця 8.6

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 667 л середовища

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 667 середовища, кг (л)**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, л**
Глюкоза	20	13,3	A	50
Дріжджовий екстракт	10	6,7		
Вода		29,5		
Конденсат		0,5		
K_2HPO_4	1.74	1.2	B	550
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.49	0,3		
Вода		493		
Конденсат		55		
Разом:				600

-ДР.4.4.1 Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор Д-22 подають 13,3 кг глюкози та 6,7 кг дріжджового екстракту. Наважки поміщають в попередньо простерилізований реактор Р-21 об'ємом 100 л, заливають 29,5 л води, з врахуванням конденсату і вмикають перемішуючий пристрій, щоб утворилася однорідна суспензія. Стерилізують гострою парою при температурі 112^oC та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

-ДР .4.4.2 Приготування і стерилізація композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор Д-25 подають 1.2 кг KH_2PO_4 та 0.3 кг $MgSO_4{*}7H_2O$. Наважки поміщають в попередньо простерилізований реактор Р-24 об'ємом 1 м^3. Через об'ємно-ваговий дозатор Д-25 подають воду - 493 л, з врахуванням конденсату і перемішують. Після чого солі перекачують насосом Н-26 в попередньо простерилізований інокулятор Ін-30 об'ємом 1250 л, додають

композицію А (від ДР 4.4.1) і додають 6% HCl (від *ДР.3.1.1.3*). Вмикають перемішуючий пристрій Стерилізують гострою парою при температури 131°С та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

-ДР .4.5 Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в ферментері об'ємом 12,5 м^3

Таблиця 8.7

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6 200 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6,2 м^3 середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	50	310	А	4 570
Дріжджовий екстракт	2	12,4		
K_2HPO_4	2	12,4		
NH_4Cl	1.6	9,9		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	3.1		
$FeCl_3$ $MnCl_2$ $CaCl_2$ NaCl Вода	1	6,2 4 190		
Підж.р-н глюкози		312		980
Вода		980		
Конденсат		98		
Підж.р-н NH_4Cl		11,2		28
Вода		28		
Конденсат		2,8		
Разом:				5 580

-ДР.4.5.1 Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор Д-35 подають 310 кг глюкози, 12,4 кг дріжджового екстракту, 12,4 кг KH_2PO4, 9,9 кг NH_4Cl 3.1 кг $MgSO_{4*}7H_2O$, та 6,2 г $FeCl_3$, 6,2 г $MnCl_2$, 6,2 г $CaCl_2$, 6,2 г NaCl. Наважки поміщають в попередньо простерилізований реактор Р-34 об'ємом 6 300 л, заливають 4 190 л питної води і вмикають перемішуючий пристрій, щоб утворилася однорідна суспензія. Далі за допомогою насоса Н-36 подають до УБС -47 потужністю 20 $м^3$\год, де й проходить стерилізація за температури 140°С та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 60 хв

ТП.5 Підготовка посівного матеріалу

-ТП .5.1 Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Alcaligenes faecalis* WX-C12 зберігають у пробірках зі скошеним м'ясо – пептонним агаром у холодильнику при температурі 4°С. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи за колекційною культурою проходять строго в асептичних умовах.

-ТП . 5.2 Одержання і вирощування робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з агаризованим середовищем, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із МПА в асептичних умовах, вирощують у термостаті при температурі 30°С упродовж 48 год.

-ТП .5.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані ізольовані колонії (від ТП 5.2) пересівають петлею у пробірки з МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування –48 год.

-ТП 5.4 Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 0,75 л вносять в асептичних умовах композицію А (від ДР 4.1.1), композицію В (від ДР 4.1.2) та композицію С (від ДР 4.1.3) і ретельно перемішують. Для засіву однієї колби, використовують суспензію клітин, одержану з однієї пробірки.

У пробірку з робочою культурою культурою *A. faecalis WX-C12*, вирощену на м'ясо-пептонному агарі, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру) піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію, одержану з однієї пробірки.

Культивування бактерій здійснюється у колбах на качалці (200-220 об/хв) при t = 30°С упродовж 48 год.

-ТП 5.5 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 20 л

В інокулятор Ін-27 об'ємом 20 л, попередньо простерилізованим гострою парою, в асептичних умовах додають стерильну композицію В від ДР 4.2.2 та композицію А — від ДР 4.2.1. Після цього за допомогою 6% NaOH (від ДР 3.2.1.1) доводять pH до 7,0, що створює сприятливі умови для біологічного агента. Вносять посівний матеріал (від ТП 5.4) і вмикають перемішуючий пристрій. Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 30°С упродовж 24 год. Швидкість перемішування 200-220 об/хв. В інокулятор подається стерильне стиснуте повітря, а виводиться відпрацьоване. У кожух ферментера подається гаряча та холодна вода, а також виводиться оборотна вода.

Під час культивування, кожні 8 годин відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю.

-ТП 5.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 160 л

В інокулятор Ін-30 об'ємом 160 л, попередньо простерилізованим гострою парою, перекачують самопливом композицію В (від ДР 4.3.2), та перекачують композицію А (від ДР 4.3.1) та після цього за допомогою 6% NaOH (від ДР 3.2.1.2) доводять pH до 7,0, що створює сприятливі умови для біологічного агента, а за допомогою труби перетискування перекачують посівний матеріал (від ТП 5.5) і вмикають перемішуючий пристрій. Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 30°С упродовж 24 год. Швидкість перемішування 200-220 об/хв. В інокулятор подається стерильне стиснуте повітря, а виводиться відпрацьоване. У кожух ферментера подається гаряча та холодна вода, а також виводиться оборотна вода.

Під час культивування, кожні 8 годин відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю.

-ТП 5.7. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 1250 л

В інокулятор Ін-32 об'ємом 1250 л, попередньо простерилізованим гострою парою, перекачують за допомогою перистатичного насосу Н-26 композицію В (від ДР 4.4.2), та перекачують самопливом композицію А (від ДР 4.4.1) та після цього за допомогою 6% NaOH (від ДР 3.2.1.3) доводять pH до 7,0, що створює сприятливі умови для біологічного агента, а за допомогою труби перетискування перекачують посівний матеріал (від ТП 5.6) і вмикають перемішуючий пристрій. Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 30°С упродовж 24 год. Швидкість перемішування 200-220 об/хв. В інокулятор подається стерильне стиснуте повітря, а виводиться відпрацьоване. У кожух ферментера подається гаряча та холодна вода, а також виводиться оборотна вода.

Під час культивування, кожні 8 годин відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю.

ТП 6. Біосинтез

-ТП 6.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 12 500 л

У ферментер Фр-48, обладнаний pH-метром, та попередньо простерилізованим гострою парою, перекачують за допомогою перистатичного насосу ,від УБС-47, композицію А (від ДР 4.5.1). Після цього, за допомогою 6% NaOH (від ДР 3.2.1.4) доводять pH до 7,0, що створює сприятливі умови для біологічного агента, а за допомогою труби перетискування перекачують посівний матеріал (від ТП 5.7). Вмикають перемішуючий пристрій, якою слугує якірна мішалка та подачу аеруючого повітря. Для дезінфекції та стерилізації труб і ємностей у фармацевтичному виробництві застосовують гостру водяну пару. Біосинтез проводять при t = 30 ºС, що досягається за допомогою теплообмінного кожуха, протягом 48 год. На 14 годині перекачують за допомогою самоплину розчин NH_4Cl (від ДР 3.3) до досягнення у середовищі концентрації хлориду амонію кількістю 3,6 г/л. Після 24 годин культивування, за допомогою насосу Н-40 перекачують 40% розчин глюкози (від ДР 3.2). Після цього за допомогою розчину NaOH (від ДР

3.2.1.4) підтримують pH на рівні 5,6 в умовах вичерпання джерел азоту, так зване «азотне голодування». Біосинтез здійснюють при температурі 30°С впродовж 48 год. Концентрація розчиненого кисню на рівні вище 50% від насичення повітрям, автоматично регулюючи швидкість перемішування, що становить 2000 обертів на хвилину. Культивування ведуть до досягнення максимального накопичення цільового продукту (72 г/л).

Під час культивування, кожні 8 годин відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю.

Після культивування культуральну рідину подають до З-49 для подальших трансформацій.

ТП 7. Підготовка культуральної рідини

ТП 7.1 Попереднє розведення

Культуральна рідина від ферментера (Фр-48) подається зі збірника (З-49) відцентровиим насосом (Н-50) у збірник (З-57) для попереднього зменшення в’язкості. Також у цей збірник подають розчину лугу (від ДР 3.4.1). Розведення відбувається при температурі 15-25 °С протягом 60 хв.

ТП 8. Відділення біомаси від культуральної рідини

ТП 8.1 Сепарування

Вмикаємо сепаратор (С-59), та подаємо розведену культуральну рідину (від ТП 3.1), зі збірника (З-57) при швидкості обертання 18 000 об/хв та темпаратурі 15-25 ºС відділяємо біомасу протягом 15-25 хв.

Біомасу за допомогою механізму розвантаження викидають у приймач, та передають до ЗВ 13.2 (знешкодження твердих відходів).

Супернантант подається до збірника (З-61) для подальшого осадження курдлану.

ТП 9. Виділення курдлану

ТП 9.1 Осадження хлоридною кислотою

До збірника (З-61), що вже містить супернатант від ТП 8.1, при включеній мішалці, додають 3 М хлоридну кислоту зі збірника (З-52) (ДР 3.4.2). Після чого

витримують 4 годин, при температурі 15 ºС. Після чого за допомогою насосу (Н-62) направляють на повторну сепарацію до (С-59).

ТП 9.2 Сепарування

Після того як відбулося осадження курдлану, зі збірника (З-61) осаджений полісахарид направляють у сепаратор (С-59) при швидкості обертання 18 000 об/хв та темпаратурі 15-25 ºС відділяємо курдлан протягом 15-25 хв, через відцентровий насос (Н-62). Супернатант, який містить хлоридну кислоту та інші домішки передають до ЗВ 13.3 (знешкодження рідких відходів).

Осадженний курдлан, тобто важка фракція шляхом вивантаження переноситься до збірника (З-65) на промивання.

ТП 10. Очищення курдлану від солей та домішок

ТП 10.1 Промивання дистильованою водою

Процес промивання проводять тричі, з метою досягнення вищого рівня чистоти готового продукту та очистки від хлоридної кислоти, оскільки він використовується у харчовій промисловості при виробництві БАД.

Дистильована вода від ДР 3.4.3 через насос (Н-64) подається зі збірника (З-63) у збірник (З-65). Промивання здійснюють при температурі 15 ºС.

ТП 10.2 Ультрафільтрування

Промитий екзополісахарид (від ТП 10.1) зі збірника (З-65) за допомогою відцентрового насосу (Н-66), перекачують в ультрафільтраційну установку (УФ) (УФ-67). Концентрат направляють на повторну очистку. Пермеат до Ф-68.

ТП 10.3 Промивання дистильованою водою

Концетрат подають до збірника (З-65) для другого етапу промивання. Внутрішні поверхні (УФ) промивають за допомогою CIP-мийки, та стерилізують водяною насиченою парою з тиском Р = 0,28–0,3 Мпа. При досягненні в апараті температури стерилізації 130–135 °С закривають усю запірну арматуру, крім парової, і витримують заданий час стерилізації.

ТП 10.4 Ультрафільтрування

У збірнику (З-65), завантажений курдлан, розчиняють дистильованою водою. Після чого за допомогою насосу (Н-66), при включеній мішалці, перекачують на (УФ) (УФ-67). Фільтрат направляють на доочищення.Пермеат до Ф-68.

ТП 10.5 Промивання дистильованою водою

Частково очищений курдлан подають вручну до збірника (З-65) для третього етапу промивання. УФ (УФ-67) повторно стерилізують. У збірнику (З-65), завантажений курдлан, розчиняють дистильованою водою. Після чого за допомогою насосу (Н-66), при включеній мішалці, перекачують на УФ (Ф-67).

ТП 10.6 Ультрафільтрування

Зі збірника (З-65) рідину направляють до УФ (УФ-67). Концентрат направляють до ЗВ 13.3 (знешкодження рідких відходів).Пермеат подають до Ф-68.

ТП 10.7 Фільтрування на нутч-фільтрі

Повністю очищений від залишків компонентів поживного середовища,солей, супутніх домішок необхідно профільтрувати суміш для ще більшого очищення .

З УФ-67 пермеат подають до Ф-68, звідки вологий продукт направляється до С-70.

ТП 11. Отримання сухого курдлану

ТП 11.1 Сушіння курдлану у вакуумній-шафі

У сушильну шафу (С-70) через транспортер (Т-69) подається вологий продукт- курдлан. Час висушування – 2 години при температурі 100°С.

ТП 11.2 Дробіння

З сушарки (С-70) сухий курдлан через транспортер (Т-71) подають до молоткової дробарки (Д-72). Діаметр сита – 1,5 мм.

ПМВ 12. Пакування, маркування та відвантаження

ПМВ 12.1 Пакування в первинну упаковку

Сухий продукт – курдлан від молоткової дробарки (Д-72) через транспортер (Т-73) подається в фасувальну машину (ФМ-74), куди також подаються крафтові мішки та поліетиленові пакети. Засувка вагового бункера відкривається, а також закривається за допомогою пневмоциліндра. Фасувальна машина містить автоматичний дозатор, за допомогою якого можна регулювати яка кількість сухого

готового продукту буде фасуватись у мішки. Курдлан фасують в мішки по-1,25,100 кг.

ПМВ 12.2 Маркування

Курдлан в мішках від ТП 12.1 через транспортер (Т-75) податься у маркувальну машину (ММ-76), де здійснюється нанесення маркування на упаковку.

Далі мішки за маркуванням транспортують на склад, де й вони зберігаються.

ЗВ 13. Знешкодження відходів.

ЗВ 13.1. Знешкодження газоподібних відходів

Очищення викидів з ферментерів здійснюють у фільтрах з попереднім охолодження газів. Під час очищення повітря використовують різноманітні фільтри з волокнистих матеріалів.Очищене повітря викидається через трубу розсіювання

ЗВ 13.2. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи (від ПМВ 12.1,12,2,12,3; ТП 8.1;) спалюють за високотемпературного режиму.

ЗВ 13.3. Знешкодження рідких відходів

Стічні води біотехнологічних виробництв можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини від ДР 1.2.1, від ДР 1.2., від ДР 1.3.1., від ТП 9.2, від ТП 10.2, від ТП 10.4, від ТП 10.6. На виході з цеху стічні води стерилізують і нейтралізують. Надалі їх спрямовують в каналізацію.

Розділ 9. Контроль виробництва

Всі точки контролю доферментаційних та післяферментаційних процесів наведено в *табл.9.1*.

Таблиця 9.1

9.1 Карта постадійного контролю виробництва культуральної рідини *A.faecalis* WX-C12

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх, 1.1.1. Приготування робочого розчину Вімол для миття обладнання	Концентрація робочого розчину вімолу	Хімічний метод	Після приготування розчину	С = 0,5 %
Кх, 1.1.2.1 Приготування робочого розчину Хлорантоіну для щоденного прибирання	Концентрація робочого розчину Хлорантоіну	Хімічний метод	Після приготування розчину	С = 0,2 %
Кх, 1.1.2.2 Приготування робочого розчину Ласепту для генерального прибирання прибирання	Концентрація робочого розчину Ласепту	Хімічний метод	Після приготування розчину	С = 0,2%
Км ,Кт 1.2.1. Щоденне прибирання	Підлога	Візуальний огляд, Мікробіологічний контроль	Під час та після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду КУО≤800/см^2
Км, Кт 1.2.2. Генеральне прибирання	Підлога, стіни, двері та вікна	Візуальний огляд Мікробіологічний контроль	Під час та після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду КУО≤300/см^2

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5
Кт 1.3.1. Миття обладнання	Мийний розчин, обладнання, температура робочого розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд після миття	t = 40-50 ºС, τ = 30-40 хв, чисте обладнання
Кт 1.3.3 Перевірка обладнання на герметичність	Герметичність роботи обладнання, температура, тиск, час, перепад тиску	Манометр технічний, термометр, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність, перепад тиску визначають після проведення операції	Р = 0,07 МПа, τ = 20–30 хв, ΔР < 0,01 Мпа
Кт 1.3.4. Стерилізація ферментаційного обладнання	Обладнання, час стерилізації, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	τ = 1 год, Р = 0,15 МПа
Кт 2.1. Забір атмосферного повітря	Висота забору повітря	Альтиметр	При проектуванні приміщень	h = 10 м
Кт 2.2. Грубе очищення повітря від пилу та часток	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	Е = 90 %, тиск згідно паспорту
Кт 2.3. Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	Р = 0,35–0,5 МПа, t = 120–150 ºС
Кт 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи	Охолоджене повітря, після видалення зайвої вологи температура	Термометр технічний, психометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	t = 25 ºС, W = 60 %
Кт 2.5. Стабілізація теромодинамічних показників	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 70–90 ºС
Кт 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Повітря на виході з головного фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	Е = 95%, тиск згідно паспорту

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5
Кт 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Повітря на виході з головного фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	Е = 95%, тиск згідно паспорту
Кт 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Повітря на виході з індивідуального фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря у індивідуальному фільтрі	Е = 99,99 %, тиск згідно паспорту
Кх 3.1.1.1,3.1.1.2,3.1.1.3 Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища в інокуляторах	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	С = 6 %
Кх, Кт, Км 3.2.1.1, 3.2.1.2,3.2.1.3,3.2.1.4 Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в інокуляторах та ферментері	Тиск, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину гідроксиду натрію	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль після стерилізації	Р = 0,15 МПа τ = 40 хв, відсутність сторонньої мікробіоти С = 6 %
Кх, Кт, Км 3.2. Приготування і стерилізація підживлювального розчину глюкози	Тиск, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину глюкози	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль після стерилізації	Р = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність сторонньої мікробіоти С = 40 %
Кх, Кт, Км 3.3. Приготування і стерилізація підживлювального розчину амонію хлориду	Тиск, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину амонію хлориду	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль після стерилізації	Р = 0,15 МПа τ = 40 хв, відсутність сторонньої мікробіоти С = 40 %
Кх 3.4.1 Приготування 3 М розчину гідроксиду натрію	Концентрація, показники дозаторів	Дозатори Датчики	До початку процесу	V=10 м^3 С=3 М

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5
Кх 3.4.2 Приготування 3 М розчину хлоридої кислоти	Концентрація, показники дозаторів	Дозатори Датчики	До початку процесу	V=10 м^3 С=3 М
Кт 3.4.3 Приготування та зберігання дистильованої води	Температура	Термометр	До початку процесу	t= 15°С
Кт, Км 4.1.1,,4.2.1 , 4.3.1, 4.4.1 Приготування і стерилізація композиції А	**Композиція А** Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Годинник,манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °С, τ=30 хв, Р=0,05 МПа, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.1.2., 4.2.2.,4.3.2,4.4.2 Приготування і стерилізація композиції В	**Композиція В** Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 40 хв, Р=0,15 МПа, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції С у колбах	**Композиція С** Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 40 хв, Р=0,15 МПа, відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 4.5.1 Приготування та стерилізація композиції А для виробничого синтезу у ферментері	**Композиція А** Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, годинник технічний, pH-метр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131ºС, Р = 0,15 МПа τ = 40 хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.1. Підтримання колекційної культури	**Культура *A. faecalis*,** тривалість, температура, мікробіологічна чистота	Холодильник	Мікробіологічний контроль	t = 4 ºС, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5
Км 5.2. Одержання робочої культури	**Культура *A. faecalis*,** Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин	t= 30±2 °С, τ= 48 год Відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках	**Посівний матеріал**, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота.	Термометр технічний, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин, концентрація біомаси в кінці культивування	t = 30ºС, n = 220 об/хв, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти,
Кх, Кт, Км 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л	**Посівний матеріал**, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність	Датчик pH, годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп, ФЕК, спектрофотометр,селек-тивна мембранна	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин та визначення концентрації джерела амонію хориду, біомаси	t= 30±2 °С, τ= 24 год,ω = 220 об/хв, $P_{надл.}$=0,02 МПа, pH=-7, відсутність сторонньої мікробіоти С (біом.)= 11,9±0,62 г/л,
Кх, Кт, Км 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 160 л	**Посівний матеріал**, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси	Датчик pH, годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп, ФЕК, спектрофотометр,селек-тивна мембранна	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин та визначення концентрації амонію хориду, біомаси	t= 30±2 °С, τ= 24 год,ω = 220 об/хв, $P_{надл.}$=0,02 МПа, pH=-7, відсутність сторонньої мікробіоти С (біом.)= 11,9±0,62 г/л,

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5
Кх, Кт, Км 5.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1250 л	**Посівний матеріал**, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси	Датчик pH, годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп, ФЕК ,спектрофотометр, селективна мембранна	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин та визначення концентрації джерела амонію хориду, біомаси	t= 30±2 °С, τ= 24 год,ω = 220 об/хв, $P_{надл.}$=0,02 МПа, pH=-7, відсутність сторонньої мікробіоти С (біом.)= 11,9±0,62 г/л,
Кх, Кт, Км 6.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 12,5 $м^3$	**Культуральна рідина** Тривалість культивування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, концентрація вуглецю, азоту, концнтрації клітин *A. faecalis* WX-C12 курдлану чистота культури, морфологічна відповідність	Датчик pH Годинник, термометр технічний, тахометр, манометр, мікроскоп, спектрофотометр, ФЕК, селективна мембранна	pH визначають в останні години культивування; температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування; мікроскопіювання – кожні 8 годин, концнтрація курдлану та визначення концентрації джерела амонію хориду, біомаси.	t= 30 °С, τ= 48 год, ω = 2000 об/хв, pH= 7, $P_{надл.}$=0,02 МПа, С (біом.)= 11,9±0,62 г/л, С(курд.)=72 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт 7.1 Розведення культуральної рідини	Температура, кількість лугу, час процессу, концентрація розведення	Датчик Годинник Термометр	Під час процесу	τ = 1 год t= 15-25°С С=40-45%
Кт 8.1 Сепарування	Розчин, швидкість обертання, час процессу	Датчик Годинник	Під час процесу	n=18 000 $хв^{-1}$ τ = 15 хв
Кх, Кт 9.1 Осадження	Розчин, кількість кислоти, час процессу, pH-рідини	Датчик Годинник	Під час процесу	τ = 4 год pH=6-7 t= 15°С
Кт 9.2 Сепарування	Розчин, швидк.оберт, час п процессу	Датчик Годинник	Під час процесу	n=18 000 $хв^{1}$ τ = 15 хв

Продовження табл.9.1

1	2	3	4	5
Кт 10.1 Промивання дистильованою водою	Температура води	Термометр	Під час процесу	t= 15°С
Кт 10.2 Ультрафільрування	Суспензія, діаметр пор		Під час процесу	D=0.03 мкм
Кт 10.3 Промивання дистильованою водою	Температура води	Термометр	Під час процесу	t= 15°С
Кт 10.4 Ультрафільрування	Суспензія, діаметр пор		Під час процесу	D=0.03 мкм
Кт 10.5 Промивання дистильованою водою	Температура води	Термометр	Під час процесу	t= 15°С
Кт 10.6 Ультрафільрування	Суспензія, діаметр пор		Під час процесу	D=0.03 мкм
Кт 10.7 Фільрування	Суспензія, діаметр пор		Під час процесу	D=8-15 мкм
Кт 11.1 Вакуум-сушильна шафа	Кристалічний полісахарид, Температура Час процессу Вміст сухих речовин Технологічні властивості курдлану Реологічні властивості курдлану Структурний аналіз курдлану	Термометр Годиинник аналізатор вологості Спектрофотометр Фур'є Текстометр Реометр	Під час процесу	t= 100 ºС τ = 120 хв W= 5% L= 4 $см^{-1}$
Кт 11.2 Дробіння	Сухий курдлан Діаметр частинок		Під час процесу	D=1,5 мм
Кт 12.1 Пакування маркування відвантаження	Вологість продукту Візуальний вигляд	Аналізатор вологості	До початку процесу	W=5%

9.2 Методи контролю доферементаційних процесів

Упродовж культивування кожні 8 год відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного та технологічного контролю, який включає в себе: визначення концентрації біомаси, кінцевого продукту- курдлану, джерел вуглецю та азоту.

9.2.1 Мікробіолоігчний контроль

Данний вид контролю здійснюється звичайним посівом культуральної рідини, яку необхідну взяти на пробу, на агаризоване середовище LB в чашці Петрі. Після чого чашку Петрі витримують 1-2 доби у термостаті при температурі 30-37 ℃. Своєрідною точкою контролю данного методу – є присутність лише *Alcaligenes faecalis* WX-C12 [47], та відсутність колоній інших мікроорганізмів.

Якщо в ході проведення мікробіологічного контролю виявлена стороння мікробіота – то проводять розсівання до окремих ізольованих колоній на таких агаризованих середовищах в чашках Петрі: - МПА (24-48 год при температурі 37℃ для виявлення бактерій); - СА (24-48 год при температурі 30℃ для виявлення грибів).

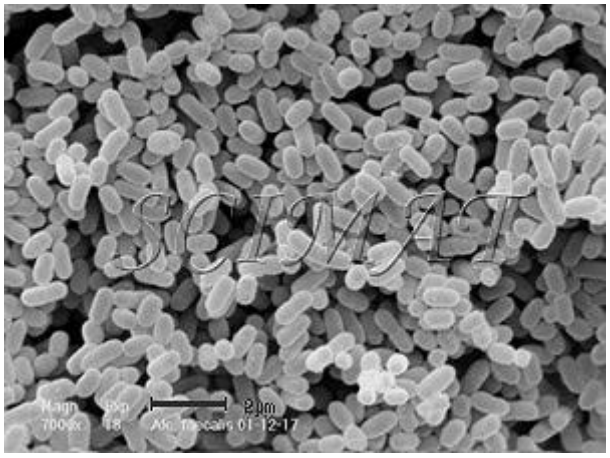

Рис 9.1. ***Alcaligenes faecalis електронне мікроскопіювання*** [47].

9.2.2 Визначення концентрації біомаси

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка.Біомасу визначали за допомогою спекторофтометра (Hatch, Colorado, USA) при 660 нм. У пробірки із 9 мл дистильованої води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтують, потім вимірюють оптичну густину. Після цього оптичну густину множать на фактор розведення, отримані дані перераховують за калібрувальним графіком [48].

9.2.3 Визначення концентрації амонію хлориду

Суть методу: використання мембранного електрода з мембранним селективним іоном амонію для визначення коефіцієнтів активності NH_4Cl. Як електрод порівняння використовували насичений хлорсрібний електрод з подвійним сольовим містком, заповненим 1 М розчином хлориду натрію. Це дозволяє при необхідності тривалий час витримувати електрод порівняння в уже згадуваному розчині, виключаючи заважаючий вплив іонів калію

Методика: Визначення концентрації амонію (азоту) в культуральних рідинах. У стаканчиках ємністю 50 мл поміщають 25 мл стандартного розчину моль / л хлориду амонію, що містить 0,2 моль / л хлориду літію для створення відповідної іонної сили. Ставлять стакан на магнітну мішалку і опускають туди електрод порівняння (насичений хлорсрібний електрод з подвійним сольовим містком, заповненим 1 М розчином хлориду натрію) і індикаторний амоній - селективний електрод. Після перемішування 1-2 хв записують усталене значення ЕРС (Е1). Потім вводять аліквоту 2,0 мл відфільтрованої культуральної рідини і записують через 2 хв стале значення потенціалу (Е2).

Розрахунок концентрації амонійного азоту CNH 4, моль / л, в культуральної рідини проводять за рівнянням:

$$C_{NH^+4} = C_{ст}\left[10^{(E_2 - E_1)/K} \left(\frac{V_{ст} + V_x}{V_x} \right) - \frac{V_{ст}}{V_x} \right].$$

9.2.4Визначення концентрації цільового продукту екзополісахариду курдлану

Суть методу: солюбілізація курдлану в розчині NaOH та осадження в HCl. Дана методика дозволяє легко виділити екхополісахарид з культуральної рідини за допомогою його фізико-хімічним властивостям.

Дана культуральна рідина має підвищену в'язкість, так як концентрація курдлану в культуральній рідині- 72 г/л. За методикою 3 М NaOH додають в культуральну рідину у співвідношенні 1,8: 1 (NaOH: середовище. Це потрібно для того, щоб розчинити курдлан (солюбілізація курдлану). Далі суміш центрифугують (18000 g, 30 хв) для відділення клітин. Далі 3 М HCl додають до супернатанту (надосадова рідина, яка містить курдлан) до pH 6–7. Осаджений курдлан центрифугують (18000 g, 30 хв. Виділений курдлан промивають дистильованою водою від солей та висушують до постійної ваги. . Концентрацію ЕПС ($К_{ЕПС}$, г/л) розраховують згідно формули (5.1.)

$$К_{ЕПС} = ((Ф_1 – Ф_0)/V)*1000$$

- $Ф_1$ — наважка фільтра з осадом ЕПС, г;
- Фо — наважка фільтра, г;

V — об’єм культуральної рідини, з якого осаджували ЕПС, (мл) [48].

9.2.5 Визначення концентрації глюкози за допомогою біосенсорів

Суть: визначення вмісту глюкози у вині за допомогою амперометричного біосенсора на основі платинового друкованого електрода SensLab та глюкозооксидази (ГОД).

Методика: Вимірювання вмісту глюкози за допомогою амперометричного біосенсора проводили у 20 мМ фосфатному буферному розчині, pH 7,2, при кімнатній температурі у відкритому об’ємі за інтенсивного перемішування. Визначення концентрації глюкози здійснювали за допомогою методу стандартних додавань. Для проведення аналізу пробу розводили у 250–1 000 разів. Після отримання кожного відгуку сенсор відмивали буферним розчином до стабілізації базового сигналу.

9.3 Методи контролю після ферментаційного виробництва

9.3.1Структурний аналіз: *метод раманівської спектроскопії*

Стандартні зразки та зразки, які отримали практично аналізували методом інфрачервоної спектроскопії трансформації Фур'є за допомогою інфрачервоного спектрометра Фур'є.

Принцип методу - у раманівській спектроскопії зразок опромінюється інтенсивним монохроматичним світлом (джерелом зазвичай є лазер). Більша частина випромінювання розсіюється зразком із тією самою довжиною хвилі, що й падаюче світло; цей процес відомий як релєєвське розсіяння або пружне світлорозсіяння. Тільки 10^{-6}–10^{-8} частка від падаючих фотонів розсіюється від зразка за довжин хвиль, що зсунені порівняно із довжиною хвилі джерела випромінювання; це розсіяне світло відоме як раманівське розсіяння або непружне світлорозсіяння. Різниці між довжиною хвилі падаючого світла та довжинами хвиль раманівського розсіяння відомі як раманівські зсуви й пов’язані із коливаннями молекул зразка.

Якісний аналіз - проводять пробопідготовку випробовуваної речовини та стандартного зразка за однаковою методикою і записують їхні спектри за однакових умов роботи приладу. Максимуми в спектрі, одержаному для випробовуваної речовини, мають відповідати за положенням та за відносною інтенсивністю відповідним максимумам у спектрі, одержаному для стандартного зразка.

Кількісний аналіз - потребує проведення вимірювань стандартного зразка та випробовуваної речовини за однакової інтенсивності та частоти лазера. Перевіряють, щоб вимірювання випробовуваної речовини проводились у такому самому фізичному стані (наприклад, рідина, тверда речовина) та діапазоні концентрацій, що й вимірювання стандартного зразка, використовуваного для калібрування.

Проведення аналізу:

Пробопідготовка - раманівські спектри можуть бути одержані для твердих речовин, рідин і газів, зазвичай без попередньої обробки або розчинення зразка. Проводять калібрування та тестування експлуатаційних характеристик системи відповідно до

інструкцій виробника. Калібрування шкали хвильових чисел систем Фур'є-перетворення здійснюється за допомогою внутрішнього лазера.

Проведення вимірювань - шкалу хвильових чисел раманівських зсувів перевіряють із використанням підхожих стандартів, які мають характеристичні максимуми за досліджуваних значень хвильових чисел. Вибирають як мінімум 3 значення зсувів хвильових чисел, які перекривають робочий діапазон, що планується до вимірювання. Стандартний зразок курдлану має зсув хвильових чисел в межах 4 $см^{-1}$. Критерії прийнятності можуть змінюватися в межах ± 10 % або менше [48].

Технологічний та реологічний аналіз

Технологічний аналіз - випробовуваний зразок перемішують за допомогою магнітної мішалки до досягнення однорідної дисперсії. Дисперсії нагрівали при 95 ° С / 1 год для оцінки здатності до гелеутворення. Зразок порівнювали зі стандартним зразком.

Реологічний аналіз - випробовуваний зразок готували у трьох концентраціях: 20 г/л , 40 г/л і 80 г/л у воді. Курдлан розчиняли за допомогою мішалки при кімнатній температурі протягом 5 хв. Зразки аналізували в реометрі з контрольованим навантаженням.

Для оцінки міцності гелю зразок у концентрації 20 г/л витримували на водяній бані при 61 ° С - 1 год для приготування термозворотньогогелю та при 95 ° С - 1 год для приготування термонезворотнього гелю. Міцність гелів оцінювали у текстометрі, використовуючи 36-мм зонд для аналізу компресії [48].

Розділ 10. Автоматизація ділянки виробництва

Автоматизація — один із напрямів науково-технічного прогресу, застосування саморегулюючих технічних засобів, економіко-математичних методів і системам управління, які звільняють людину від участі у процесах отримання, перетворення, передачі й використання, матеріалів чи інформації, які зменшують ступінь цієї участі чи трудоємкості виконуваних операцій. Потребує додаткового застосування датчиків (сенсорів), пристроїв введення, управляючих пристроїв (контролерів), виконавчих пристроїв, пристроїв виведення, використовують електронну техніку й методи обчислень, іноді копіюють нервові і мисленнєві функції людини. Поруч із терміном автоматичний, використовується поняття автоматизований, на не велику ступінь участі людини під час роботи автоматизуються: виробничі процеси; проектування; організація, планування і управління; бізнес-процеси.

Мета автоматизації — підвищення продуктивності праці, поліпшення якості продукції, оптимізація управління, усунення людини від виробництв, підвищення надійності і точності виробництва, збільшення конвертованості і зменшення часу обробки даних.

Автоматизація, крім найпростіших випадків, вимагає комплексного, підходу до вирішення завдання, тому рішення завдань, як і автоматизацію завдань зазвичай називаються системами, наприклад:

система автоматичного управління (САУ);

система автоматизації проектних робіт (САПР);

автоматизована система управління технологічним процесом (АСУ ТП).

Автоматизація технологічного процесу — сукупність методів і коштів, призначена для реалізації системи чи систем, дозволяють здійснювати управління самим технологічним процесом без особистої участі людини, або залишення за людиною права затвердження найбільш відповідальних рішень. Основа автоматизації технологічних процесів — це перерозподіл матеріальних, енергетичних та інформаційних потоків відповідно до прийнятим критерієм управління (оптимальності).

Основними цілями автоматизації технологічних процесів є:

· Підвищення ефективності виробничого процесу.

· Підвищення безпеки.

· Підвищення екологічності.

Автоматизація технологічних процесів у межах одного виробничого процесу дозволяє організувати основу на впровадження систем управління виробництвом і як і системам управління підприємством.

10.1 Опис апаратурно-технологічної схеми автоматизації

Процес біосинтезу курдлану буде проходити у ферментері об'ємом 12.5 $м^3$ який і буде автоматизовано в індивідуальному завданні. Технічне завдання для створення схеми автоматизації у вигляді показників які необхідно контролювати наведено в табл. 10.1.

Після процесу біосинтезу необхідно виділити екзополісахарид курдлан з культуральної рідини. Для цього використовують метод осадження хлоридною кислотою. Процес осадження відбувається в реакторі, оснащеному сорочкою для охолодження та нагрівання, мішалкою та датчиками, що вказують на рівень рідини. Процес осадження триває при температурі 20°С протягом 3-4 год з постійно вімкнутою мішалкою (150 об/хв). Температуру регулюємо за допомогою сорочки, встановленої на реакторі. Після процесу осадження екзополісахарид курдлан надходить на сепарацію, а далі на трьохкратне промивання дистильованою водою та фільтрацію на нутч-фільтрі, і подальше висушування у вакуум- сушильній установці. Отриманий кінцевий продукт фасують в пакети по 1,10,100 кг

10.2. Завдання на розробку схеми автоматизації

Таблиця 10.1

№	Машина, апарат	Параметр, місце відбору сигналу	Допустиме значення параметру	Вид автоматизації	Характер контролю управління	Засоби управління та контролю, реалізація управ-ляючої дії
1	Ферментер	Температура КР	35±2°С	Контроль, регулювання	Моніторинг	Керування аналоговим пневматичним клапаном (подача води у сорочку)
		Оберти перемішуючого пристрою	2000 об/хв	Контроль, управління	Покази	Керування двигуном (дискретне)
		pH	7,0	Контроль	Моніторинг	Керування аналоговим пневматичним клапаном (подача натрій гідроксиду)
		Конц-рація кисню	Конц-ація розчиненого кисню на рівні вище 50%	Контроль, регулювання Підтримання на заданому значенні Сигналізація при значному відхиленні (світлова)	Моніторинг	Керування аналоговим пневматичним клапаном (подача стисненого очищеного повітря)
		Рівень піни	Заданий рівень	Контроль, регулювання	Реєстрація Сигналізація	Керування двигуном піногасника (дискретне)

Продовження таблиці 10.1

№	Машина, апарат	Параметр, місце відбору сигналу	Допустиме значення параметру	Вид автоматизації	Характер контролю управління	Засоби управління та контролю, реалізація управляючої дії
2	Реактор для осадження	Температура	(20±1)ºС	Регулювання	Підтримка на заданому значенні	АРМ оператора
		Рівень поживного середовища	0,7± 0,005	Управління	Дистанційне	АРМ оператора Вплив на подачу води у збірник
		Кількість обертів мішалки	220 об/хв	Контроль Регулювання	Сигналізація звукова Підтримка на заданому значенні	Керування двигуном (дискретне)
		Конц-рація кисню	Конц-ація розчиненого кисню на рівні вище 50%	Контроль, регулювання Підтримання на заданому значенні Сигналізація при значному відхиленні (світлова)	Моніторинг	Керування аналоговим пневматичним клапаном (подача стисненого очищеного повітря)
		Рівень піни	Заданий рівень	Контроль, регулювання	Реєстрація, Сигналізація	Керування двигуном піногасника (дискретне)

10.3. Вибір засобів автоматизації та опис функціональної схеми автоматизації

Біосинтез курдлану у ферментері:

Контур 1. Рівень піни в інокуляторі вимірюється ємнісним датчиком з електропередачою сигналу (поз. 1а). Дискретний сигнал від датчика подається на ПЛК і приводить у дію виконуючий механізм – двигун піногасника М (поз. КМ1). Уніфікований сигнал до ВМ надходить з панелі керування (поз. 1б).

Контур 2. Показник pH необхідно фіксувати як під час процесу біосинтезу так і при здійсненні допоміжних робіт (стерилізації поживного середовища). Значення pH вимірюється первинним перетворювачем (потенціометричним датчиком pH-метра) (поз. 2а). Аналоговий сигнал від датчика подається на ПЛК перетворюючись у цифровий. При відхиленнях значення pH подача лугу автоматично дозується регулюючим органом – аналоговою заслінкою. (поз. 2д), що приводиться в дію за допомогою мембранного виконавчого механізму (поз. 2г). Уніфікований пневматичний сигнал до ВМ надходить з електро-пневмоперетворювача (поз. 2в). Паралельно дані фіксуються на ПК і при значних відхиленнях сигналізують оператора (технолога) для подальших технологічних дій.

Контур 3. Показник вмісту розчиненого кисню у культуральній рідині вимірюється рідинним газоаналізатором (поз. 3а). Аналоговий сигнал від датчика подається на МПК перетворюючись у цифровий, і в залежності від інтенсивності споживання кисню мікроорганізмами, автоматично дозується подача аераційного повітря пари в інокулятор регулюючим органом – аналоговою заслінкою (поз. 3д), що приводиться в дію за допомогою мембранного виконавчого механізму (поз. 3г). Уніфікований пневматичний сигнал до ВМ надходить з електро-пневмоперетворювача (поз. 3в).

Контур 4. Температура культуральної рідини вимірюється постійно за допомогою термоелектричного перетворювача (термопари) (поз. 4а). Сигнал від термодатчика у вигляді величини термоелектрорушійної сили (ТЕРС)

надходить до нормуючого перетворювача (поз. 4б) і перетворюється в уніфікований електричний сигнал. Останній йде до ПЛК, конвертується у цифровий. При відхиленнях температури (екзотермічний процес) подача води технічної холодної в сорочку інокулятора автоматично дозується виконавчим механізмом – насосом М (поз. КМ2). Уніфікований електричний сигнал до ВМ надходить з електроперетворювача (поз. 4в).

Регулювання перемішуючого пристрою. При натисканні кнопки «Пуск» на моторі М (поз. КМ3) відбувається перемішування культуральної рідини в апараті із заданою частотою обертів. Керування можна здійснювати як по місцю за допомогою ключа керування так і на щиті (панель дистанційного ручного керування).

Осадження курдлану в збірнику:

При осадженні курдлану в реакторі контролюється температура осадження. Температуру вимірюють контуром 5, що містить пневматичний регулюючий клапан, який працює в комплекті з електро-пневмо перетворювачам. Також, важливим показником контролю осадження є рівень рідини, який не має перевищувати 80%. Принцип дії датчика рівня: 5а – при русі вимірюваної речовини знизу вгору при досягненні датчика віри досягненні датчика він автоматично замикається та посилає сигнал на контролер. Коли рідина опускається датчик розмикається. Вмикання і вимикання проводиться автоматично.

За допомогою датчику рівня контролюють та регулюють рівень культуральної рідини та хлоридної кислоти в реакторі з використанням електромагнітних клапанів.

10.4 Специфікація на прилади та засоби автоматизації

Таблиця10.2

Позиція	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Завод виготовлювач
1	2	3	4	5	6
1а	Рівень	По місцю	Ємнісний датчик для безконтактного контролю положення предметів, виготовлених з електропровідних і не електропровідних матеріалів, відстань спрацьовування до – 4…25 мм, максимальна частота 50 Гц, вихід - дискретний	EC3025 PPAPL	Carlo Gavazzi
1б	Рівень	По місцю	Блок ручного управління імпульсними виконавчими механізмами, вхід – імпульсний, вихід – імпульсний, перехід ручний/автоматичний режим	БРУ5	ТОВ «Мікрол» Україна
КМ1	Рівень	По місцю	Магнітний пускач, робочий струм – 7 А, потужність двигуна – 3 кВт, управляючий сигнал – 220 В	3RT2015-1AP01	SIEMENS
2а	pH	В агрегаті	pH електроди, матеріал – скло, пластик, діапазон вимірювань pH 1…12, максимальна температура – до 80 градусів С, максимально допустимий тиск – 6 бар	APS	Kobold
2б	pH	По місцю	Перетворювач вимірювання pH і окисно-відновного потенціалу, аналоговий вихід	APM-Z	Kobold
2в	pH	На щиті	Електропневматичний перетворювач, вихідний сигнал – 4…20 мА, вихідний сигнал 20…100 кПа	2713-WP	Dwyer

Продовження таблиці 10.2

1	2	3	4	5	6
3а	Розчиненний кисень	В агрегаті	Промисловий екстрактивний газоаналізатор 3-х компонентний, CO – 0…250 мг/м^3, CO_2 – 0…400 мг/м^3, SO_2 – 0…400 мг/м^3	ULTRA-MAT 23	SIEMENS
3б	Розчиненний кисень	По місцю	Перетворювач вимірювання O_2, аналоговий вихід	ULTRA-MAT 23	SIEMENS
3в	Розчиненний кисень	На щиті	Електропневматичний перетворювач, вихідний сигнал – 4…20 мА, вихідний сигнал 20…100 кПа	2713-WP	Dwyer
3г	Розчиненний кисень	По місцю	Мембранний виконавчий механізм прямої дії для управління кранами та заслінками, управляючий сигнал – 20…100 кПа, крутячий момент – 5…30 нм/бар, кут повороту – 90º	KUP	Kobold
4а	Температура КР	В агрегаті	Термоелектричні перетворювачі (термопари), матеріал– латунь, градуювальна характеристика хромель-копель (К), діапазон вимірювань: – 50…+1100°С, клас точності – 1,0.	1-3, ТХА (К)	ПАО «Тера» Україна
4б	Температура КР	На щиті	Універсальний нормуючий перетворювач для встановлення в шкаф управління, вихідний сигнал термометра опору/термопари, вихідний сигнал – 4…20 мА, напруга живлення -- = 24 В	НПТ1	Овен
4в	Температура КР	На щиті	Перетворювач частоти серії Altivar61, потужність – 45 КВт, максимальний струм – 94 А	ATV61 HD45N4	Schneider Electric

4г	Температура КР	По місцю	Пульт управління перетворювачем частоти, графічний термінал	VW3A1101	Schneider Electric
КМ2	Температура КР	По місцю	Магнітний пускач, робочий струм – 7 А, потужність двигуна – 3 кВт, управляючий сигнал – 220 В	3RT2015-1AP01	SIEMENS
5а	Температура	По місцю	Датчик термоперетворювач опору ТСП, НСХ-Pt100, діапозон (0 – 100)ºС, з уніф. вих. сигнал 4…20 мА	ТСМ0193-01 ЧТП	“Теплоприбор” м. Челябинск
5б	Рівень	По місцю	Контактний датчик рівня, з вихідним сигнал по напрузі	SITRANS L Pointek CLS 200	ДП “Сименс Україна” м.Київ
Км 3	Оберти	По місцю	Частотний перетворювач	Altivar 71	“СВ Альтера” м.Київ

Список використаної літератури:

1. Курдлан у промисловості. Товарний вигляд. [Електронний ресурс].- Режим доступу: https://znaytovar.ru/new3304.html

2. *Хусаїнов І.А., Канарска З.А.*, Тенденції розвитку виробництва бактеріальних полісахаридів // Вісник технологічного університету. – 2014. – Т 17. – № 6. – с. 208-212

3. *Stivala S.* Industrial Polysaccharides: Conference on Recent Developments in Industrial Polysaccharides // Biotechnology and Advanced Methodologies Held at the Stevens Institute of Technology.-1986.- P. 1- 541.

4. *Wu J, Zhan X, Liu H, Zheng Z.* Enhanced production of curdlan by *Alcaligenes faecalis* by selective feeding with ammonia water during the cell growth phase of fermentation // Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.- 2008.- Vol.24, № 6.- P.1035-1039.

5. *Prakash, S., Rajeswari, K., Divya, P., Ferlin, M., Rajeshwari, C. T., Vanavil.* Optimization and production of curdlan gum using *Bacillus cereus* PR3 isolated from rhizosphere of leguminous plant // Preparative Biochemistry and Biotechnology. -2018. - Vol. 48, №5. - P.408–418.

6. *Донченко Л.В, Сокол Н.В, Красноселова Е.А*. Пищевая химия. Гидроколлоиды.- 2-е изд., испр. и доп.- М.: Издательство Юрайт, 2018. - 180с.

7. *Michael J. Gidley, Katsuyoshi Nishinari.* Chemistry, biochemistry, and biology of 1-3 beta glucans and related polysaccharides // Biomacromolecules. - 2009. - Vol.73, №2. - P. 663-677.

8. *Fidel Toldrá.* Advances in Food and Nutrition Research. - Valencia; Spain: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC). - 2018. - P.446.

9. *Zhang, R., Edgar, K. J.* Properties, chemistry, and applications of the bioactive polysaccharide curdlan // Biomacromolecules. - 2014. - Vol.15, №4. - P.1079–1096.

10. *Nishinari, K., Zhang, H., & Funami, T*. Curdlan // Handbook of Hydrocolloids. - 2009. - Vol.75, № 5.-P. 567–591.

11. Common chemistry. CAS solution. Substance Details-[Електронний ресурс].Режим доступу:http://www.commonchemistry.org/ChemicalDetail

12. *Ноивков Д.А.* Виділення та очистка продуктів біотехнології // Методическое пособие– Минск.: БГУ, 2014. – 256 с

13. Курдлан у промисловості. Товарный вигляд. [Електронний ресурс].- Режим доступу: https://znaytovar.ru/new3304.html

14. *Anane F, Sun H, Zhao L., Wang L.* Improved curdlan production with discarded bottom parts of Asparagus spear // Microbial Cell Factories.- 2017.- Vol.16, № 1.- P. 168-177.

15. *Zhang, Q., Sun, J., Wang, Z., Hang, H., Zhao, W., Zhuang, Y., & Chu, J.* Kinetic analysis of curdlan production by *Alcaligenes faecalis* with maltose, sucrose, glucose and fructose as carbon sources // Bioresource Technology. -2018. - Vol.259, №1.- P.319–324.

16. *Liang, Y., Zhu, L., Gao, M., Zheng, Z., Wu, J., & Zhan, X.* Influence of Tween-80 on the production and structure of water-insoluble curdlan from *Agrobacterium sp* // International Journal of Biological Macromolecules.-2018. - Vol.106, №1.- P.611–619.

17. *Wang XY, Dong JJ, Xu GC, Han R, Ni* .Enhanced curdlan production with nitrogen feeding during polysaccharide synthesis by *R. radiobacter* // Carbohydr Polym. - 2016. - Vol.150. - P. 385-391.

18. Morphology of *Alcaligenes faecalis* - [Электронный ресурс] – Режим доступу: URL: http://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=105#

19. *Химич Т.Ю.* Применение бета-глюкана в качестве иммуномодулирующей терапии у часто и длительно болеющих пациентов / Химич Т.Ю //Современная педиатрия. - 2014. - № 5. - С. 106-110.-[Електронний ресурс]. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Sped_2014_5_24

20. *Douwes J., Eduard W., Thorne P. S.* Bioaerosols // International Encyclopedia of Public Health.-2017.- P. 210–218.

21. *Li P., Zhang, X., Cheng Y., Li, J., Xiao Y., Zhang, Q., Wang, F.* Preparation and *in vitro* immunomodulatory effect of curdlan sulfate // Carbohydrate Polymers.- 2014.- Vol.102,№ 1.- P. 852–861.

22. Супрун Е.В. Імунотропні препарати //Фармацевтична енциклопедія. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3313/imunotropni-preparati

23. Biotus. SuperPure, бета-1,3-глюкан.The synergy company.- [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://biotus.com.ua/mul-tivitaminy-multi-vita-min-the-synergy-company-organik-60-tabletok-31238.html

24. Центр громадського здоров'я МОЗ України.Інфекційна захворюваність населення України протягом серпня 2018-2019 року.-[Електронний ресурс]. Режим доступу: https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/inshi-infekciyni-zakhvoryuvannya/infekciyna-zakhvoryuvanist-naselennya-ukraini

25. Центр громадського здоров'я МОЗ України. Інформаційні бюлетені за 52 тижні (з 1.01.2018 - по 31.12.2018) .- [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://moz.gov.ua/article/newsletter/informbjul

26. Державна служба статистики України. Заклади охорони здоров'я та захворюванність населення України на 2017р. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2018/zb/06/zb_zoz_17.pdf

27. *Пирог Т.П., Ігнатова О.А***.** Загальна біотехнологія. Підручник. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с.

28. *Zhan, X.-B., Lin, C.-C., Zhang, H.-T.* Recent advances in curdlan biosynthesis, biotechnological production, and applications//Applied Microbiology and Biotechnology.-2011.- Vol. 93, №2.-P.525–531

29.*Пирог Т.П. Загальна мікробіологія :* Підруч.-2-е вид., доп. і перероб.-К.: НУХТ, 2010 – 632 с.

30. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.-Vol.2: The Proteobacteria (PartC).- [Электронный ресурс] URL: https://www.springer.com/us/book/9780387241456

31. Віомой. Характеристика та інструкція до використання. [Електронний ресурс].- Режим доступу: https://farmakos.ua/vimol.html

32. Методические указания по применению дезоксона-4 для целей дезинфекции и стерилизации. -[Електронний ресурс].- Режим доступу: http://docs.cntd.ru/document/1000000027

33. Методичні вказівки щодо застосування дезінфекційного розчину «Ласепт». -[Електронний ресурс].- Режим доступу: https://lasept.com.ua/sites/default/files/manuals/lasept_forte_metodicheskie_ukazaniya_0.pdf

34. Хлорантоин методические рекомендации (инструкция по применению). [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://dezmed.com.ua/ru/instrukcii/765-khlorantoin-metodicheskie-rekomendacii-instrukciya-po-primeneniyu.

35. Циркуляційна CIP мийка Comac Group (Італія). [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.palladium-milk.com.ua/ukr/catalog/moechnoe-oborudovanie/CIP-moika/

36. *Saudagar P.S, Singhal R.S.* Fermentative production of curdlan // Appl. Biochem Biotechnol. - 2004. - Vol.18, № 1-3.- P.21-31.

37. Нутч-фільтр. Принцип роботи. [Електронний ресурс].-Режим доступу: http://nutch-filters.ho.ua/

38. Дискові вакуумні фільтри ДОО. Принцип роботи та технічні характеристики дискових вакуумних фільтрів типу ДОО. - [Електронний ресурс].- Режим доступу: https://orhey.org/ultrafiltracionnaya-ustanovka-nagema-5000-lch-g1662915

39. Ультрафільтраційна установка. - [Електронний ресурс].- Режим доступу:https://ua.all.biz/uk/ultrafiltracijna-ustanovka-nagema-5000-lch-g1662915

40. Нормативно-технічні вимоги на БАД, у складі яких присутні глюкани.- [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://a24.com.ua/products/solgar-beta-glyukany-tabletki-60-sht-solgar

41. Сертифікат аналізу якості курдлану. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://russian.alibaba.com/product-detail/food-additive-curdlan-gum-for-rice-noodles-60668909019.html

42. Вакуумна шафа. Технічні характеристики. [Електронний ресурс].- Режим доступу: https://ua.uoslab.com/sushylne-obladnannia/vakuumni-shafy/vakuumnyj-sushilnyj-shkaf-sv-50

43. *Данилов І.П, Самійленко С.І.* Апарати мікробіологічної промисловості: навч. посібник. – Харків : НТУ «ХПІ», 2008. – 272 с.

44. Методичні вказівки до виконання практичних робіт з курсу ―Вступ до фаху‖ для студентів спеціальності ―Промислова біотехнологія‖ усіх форм навчання / Укл.: О.В. Кузнецова, С.М. Лисицька. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2008. – 45 с.

45. Ліофільна сушка. Принцип дії. . [Електронний ресурс].-Режим доступу: https://biotechno.ru/about_company/articles/liofilnaya-sushka-istoriya-printsip-tsena/

46. Фасувально-пакувальна машина ВМ30.- [Електронний ресурс].-Режим доступу:- https://redler.com.ua/p509232541-fasovochno-upakovochnaya

47. *Quiroz-Castañeda, R. E., Mendoza-Mejía, A., Obregón-Barboza, V., Martínez-Ocamp* .Identification of a new *Alcaligenes faecalis* strain MOR02 and assessment of its toxicity and pathogenicity to insects // BioMed Research International. - 2016. - P. 1–10.

48. *Mangolim C. S, Silva T. T, Fenelon V. C.* Description of recovery method used for curdlan produced by Agrobacterium sp. IFO 13140 and its relation to the morphology and physicochemical and technological properties of the polysaccharide // Plos one journal. -2017.- Vol. 12, № 2.- P. 408–418.

49. *Головнев Н.Н.* Способ опредиления аммонийного азота в культуральной жидкости. .- [Електронний ресурс].-Режим доступу:- https://yandex.ru/ /doc/SU1703697A1_19920107

50. Оптимізація методики визначення вмісту глюкози у виноматеріалі ензимним амперометричним біосенсором / Т.Б. Горюшкіна, О.В. Остроухова, О.П. Солдаткін, С.В. Дзядевич // Біотехнологія. — 2009. — Т. 2, № 1. — С. 88-98. — Бібліогр.: 24 назв. — укр.

МЕТОДИ

УДК 577.15:573.6

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ГЛЮКОЗИ У ВИНОМАТЕРІАЛІ ЕНЗИМНИМ АМПЕРОМЕТРИЧНИМ БІОСЕНСОРОМ

Т. Б. Горюшкіна[1, 2]
О. В. Остроухова[3]
О. П. Солдаткін[1]
С. В. Дзядевич[1]

[1]Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ
[2]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ
[3]Національний інститут винограду та вина «Магарач», Ялта

E-mail: tatiana_goryushkina@yahoo.com

Відпрацьовано методику визначення вмісту глюкози у вині за допомогою амперометричного біосенсора на основі платинового друкованого електрода SensLab та глюкозооксидази (ГОД). Досліджено селективність біосенсорів, розроблених із застосуванням двох різних методів іммобілізації ГОД. Показано, що датчик на основі ГОД, іммобілізованої у парах глутарового альдегіду (ГА), не дає відгуку на основні інтерферуючі речовини вина, на відміну від біосенсора з ГОД, іммобілізованою у полімері полі-(3,4-етилендіокситіофен) (ПЕДТ). Вивчено операційну стабільність створеного датчика на основі іммобілізованої у парах ГА ГОД та його стабільність під час зберігання. За допомогою розробленого біосенсора проведено аналіз концентрації глюкози у винах різного типу та в суслі. Показано високу кореляцію отриманих результатів із даними високоефективної рідинної хроматографії. Встановлено, що біосенсор з іммобілізованою у полімері ПЕДТ ГОД має надзвичайно широкий динамічний діапазон роботи і може бути успішно застосований для аналізу глюкози в середовищах, які не містять етанолу та гліцеролу, наприклад у крові.

Ключові слова: амперометричний біосенсор, глюкоза, вино, сусло.

Глюкоза — один із головних тваринних і рослинних вуглеводів. Її кількісне визначення є необхідним у біохімії, клінічній хімії та харчовій промисловості [1].

Особливе практичне значення має аналіз глюкози у виноробстві, адже глюкоза є джерелом вуглецю для дріжджів, які здійснюють ферментацію виноматеріалу, та субстратом, що лімітує їх ріст [2, 3]. До того ж моніторинг вмісту глюкози у суслі (бажано разом з іншими ключовими компонентами) дозволяє контролювати процес бродіння та, в разі потреби, оперативно регулювати його, запобігаючи тим самим значним економічним витратам [4]. Моносахариди також відіграють важливу роль у формуванні органолептичних якостей вина, пом'якшують і збагачують його смак, а вступаючи у реакції меланоїдоутворення, поліпшують аромат та колір вин типу мадери, портвейну, марсали. Окрім того, вуглеводи є джерелом утворення діоксиду вуглецю у процесі виробництва ігристих вин [5].

Існує низка традиційних методів кількісного аналізу глюкози у вині — газова та високоефективна рідинна хроматографія, спектрофотометрія, рефрактометрія, ензиматичний аналіз, ЯМР- та мас-спектроскопія, капілярний електрофорез [3, 6]. Проте аналітична процедура із застосуванням більшості з перерахованих методів є довготривалою, трудомісткою, затратною і часто потребує значної кількості хімічних реактивів, деякі з яких є небезпечними для навколишнього середовища [3]. Окрім цього, застосування класичних методів для аналізу глюкози у вині інколи не забезпечує повної достовірності результатів [7].

Дедалі зростаюча потреба у кількісному визначенні глюкози зумовлює необхідність в більш швидкому, зручному та дешевому методі детекції такої сполуки, який можна було б упровадити безпосередньо у процес винного виробництва. Проведені останнім часом дослідження свідчать, що ефективним альтернативним методом аналізу глюкози у вині може стати застосування амперометричного біосенсора, який уможливлює високу селективність і чутливість визначення та не потребує складного устаткування

і підготовки проби [8]. Окрім того, відгук амперометричних біосенсорів не залежить від буферної ємності та іонної сили розчину, в якому здійснюється вимірювання, а це, безперечно, є великою перевагою при проведенні аналізів реальних зразків [7].

Амперометричні біосенсори, призначені для аналізів глюкози, найчастіше розробляють на основі трьох ензимів — НАД$^+$-залежної глюкозодегідрогенази (НАД$^+$-ГД) [9], піролохінолін хінонзалежної глюкозодегідрогенази (ПХХ-ГД) [2, 10–12] або глюкозооксидази (ГОД) [1, 7, 13–20]. При цьому у біосенсорів з іммобілізованою НАД$^+$-ГД є суттєвий недолік: вони потребують наявності екзогенного кофактора НАД$^+$, а часто ще й медіатора, що ускладнює аналітичну процедуру, зменшує стабільність датчиків та підвищує витрати на їх використання [2]. На відміну від НАД$^+$-ГД, ПХХ-ГД має у своєму складі кофактор піролохінолін хінон [2, 12], однак через його слабкий зв'язок з апоензимом біосенсори на основі цього ензиму також, як правило, не виявляють високої стабільності та придатні лише для одноразового використання [11, 12]. Застосування ГОД для розроблення глюкозного біосенсора видається більш перспективним, оскільки цей ензим має у своєму складі сильнозв'язаний природний кофактор (ФАД) та виявляє високу стабільність після іммобілізації у біоселективну мембрану [18, 19].

Створені із застосуванням НАД$^+$- та ПХХ-залежних глюкозодегідрогеназ біосенсори здатні детектувати від 9–10 мкМ глюкози [2, 9, 12]. Межа визначення біосенсорів на основі ГОД є дещо вищою — 30–60 мкМ [7, 13, 14, 17, 19], і лише для описаного у роботі [15] датчика вона становила 4,4 мкМ. Верхня межа лінійного діапазону для біосенсорів з іммобілізованою ГД становить 0,8 мМ [2, 9], з ГОД — 1,5 [17], 3 [13], 8 [7] і навіть 25 мМ [16].

Датчики з іммобілізованою ГОД — високостабільні, вони виявляють 100% активності через місяць [13, 16] та до 95% через 8 місяців зберігання [19]. Стабільність біосенсорів, створених на основі дегідрогеназ, є значно нижчою — 80% від початкового сигналу через місяць зберігання для ПХХ-ГД [2] та 30% через 2 тижні для НАД$^+$-ГД [9]. Операційна стабільність біосенсорів з іммобілізованою ГОД також є вищою — 100% активності через 120 год безперервної роботи [16], тимчасом як датчик з ПХХ-ГД після 20 год вимірювань зберігає 60% від початкового відгуку [2].

Наведені дані свідчать про перспективність розроблення глюкозного біосенсора саме на основі глюкозооксидази, однак його використання для контролю якості вина може супроводжуватися низкою складнощів під час проведення аналізу. Передусім це пов'язано з наявністю у вині цілого спектра різноманітних речовин, що можуть впливати на відгук біосенсора і спричинювати виникнення похибок, а іноді й унеможливлювати застосування біосенсорів у виноробстві. До таких інтерферуючих речовин належить, зокрема, аскорбінова кислота, яка міститься у вині та суслі у значній кількості й у процесі аналізу призводить до появи неспецифічного сигналу, ускладнюючи інтерпретацію результатів [7]. Електрохімічно активні фенольні компоненти, на які особливо багаті червоні вина, також можуть істотно впливати на роботу амперометричного біосенсора [18], особливо вони перешкоджають аналізу сухих вин з незначним вмістом глюкози — менше 1 г/л [20]. Наприклад, у роботі [7] повідомляється, що біосенсор на основі іммобілізованої у парах глутарового альдегіду (ГА) ГОД та вуглецевого електрода дає відгук близько 200 нА на внесення в електрохімічну комірку 0,25 мМ аскорбінової кислоти. Нанесення додаткової нафіонової мембрани дозволило знизити цей неспецифічний сигнал майже у 10 разів.

У ще одному дослідженні [1] встановлено, що біосенсор з іммобілізованою у парах ГА ГОД дає незначний відгук на етанол та лимонну кислоту. Проте істотний відгук спостерігався у цьому разі на внесення в електрохімічну комірку 10 мМ аскорбінової кислоти або 20 мМ фруктози — він був еквівалентним відгуку на 0,138 мМ глюкози. Іншою групою дослідників [19] встановлено, що іммобілізована у парах ГА ГОД не реагує на етанол та фруктозу, проте на внесення 10 мМ аскорбінової кислоти дає відгук, рівний відгукові на 0,36 мМ глюкози.

Дослідження селективності біосенсора на основі іммобілізованої ПХХ-ГД показало, що він не реагує на внесення в електрохімічну комірку етанолу та гліцеролу [2]. Аналіз впливу інших інтерферуючих речовин на роботу створеного глюкозного біосенсора не проводився.

Таким чином, залежність роботи глюкозних датчиків від інтерферуючих речовин ускладнює, а іноді й унеможливлює визначення за їх допомогою вмісту глюкози у реальних зразках виноматеріалів. Тому в разі використання глюкозних біосенсорів для аналізу вина та виноматеріалів їхня селективність

має бути поліпшена, а неспецифічний відгук — мінімізований.

Метою даної роботи була оптимізація методики визначення глюкози амперометричним біосенсором на основі іммобілізованої глюкозооксидази та платинового друкованого електрода SensLab для проведення її аналізу у винах та виноматеріалах.

Матеріали і методи

У роботі використовували ензим глюкозооксидазу з *Penicillium vitale* виробництва фірми КНПО «Діагностикум» (Львів, Україна) з активністю 130 од. акт./мг.

Для електрохімічної полімеризації ензиму застосовували мономер 3,4-етилендіокситіофен (ЕДТ) виробництва фірми Baytron M (Німеччина) та полі(етиленгліколь) 1450 фірми Sigma (Швейцарія). Для іммобілізації ензиму використовували бичачий сироватковий альбумін (БСА) виробництва фірми Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l. (Франція) та глутаровий альдегід виробництва фірми Fluka (Швейцарія).

Також у роботі застосовували реагенти $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4, глюкозу та L-аскорбінову кислоту виробництва фірми Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l. (Франція), пероксид водню виробництва фірми «Фармед» (Україна), лактат натрію виробництва фірми Sigma (США), етанол виробництва фірми Fluka (Німеччина) і гліцерол виробництва України. Усі реактиви, як вітчизняного, так й імпортного виробництва були кваліфікації «ос. ч.» і «х. ч.».

Вимірювання. Усі електрохімічні експерименти було виконано за допомогою традиційної триелектродної системи, в якій друкований електрод SensLab (SensLab GmbH, Leipzig, Німеччина) поєднав у собі всі три електроди: платиновий робочий, допоміжний та електрод порівняння [21].

Платинові друковані електроди SensLab досліджували на відтворюваність та працездатність у діапазоні потенціалу від 0 до +600 мВ (швидкість розгортання потенціалу 20 мВ/с). Циклічну вольтамперометрію було виконано на потенціостаті PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди). На рис. 1 наведено циклічну вольтамперограму, отриману на промисловому платиновому електроді SensLab у робочому буфері з додаванням 50 мкМ пероксиду водню.

Встановлено, що з додаванням у робочу комірку пероксиду водню спостерігається поява окиснювального струму та підвищення сигналу датчика. Як компроміс між чутливістю біосенсора та зменшенням впливу на його відгук інтерферуючих частинок (які зазвичай окиснюються при більш високих потенціалах) потенціал +200 мВ було обрано нами як робочий.

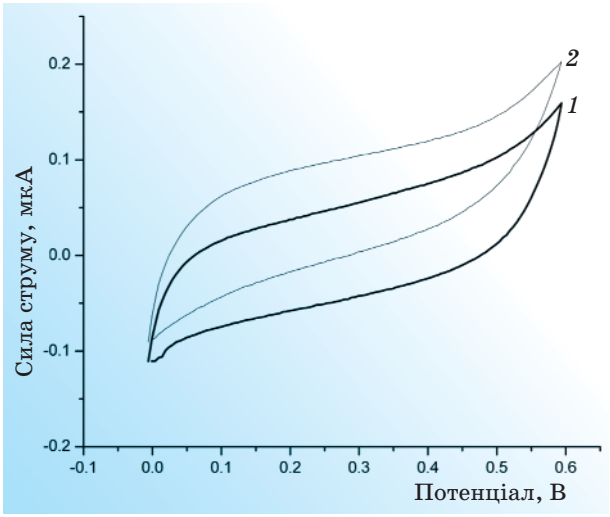

Рис. 1. **Циклічна вольтамперограма, отримана на промислових платинових друкованих електродах SensLab у фосфатному буфері (*1*) та з додаванням 50 мкМ пероксиду водню (*2*)**

Амперометричне вимірювання за постійного потенціалу проводили в електрохімічній комірці об'ємом 5 мл за допомогою потенціостата PalmSens.

Іммобілізація ГОД електрохімічною полімеризацією у полімері ЕДТ. Процес електрохімічної полімеризації становить особливий інтерес, тому що є технологічно зручним. Він дозволяє обирати й підтримувати розмір, форму і товщину матриці та забезпечує чіткий контроль за процесом осадження ензиму і носія [22, 23]. Окрім того, одержані із застосуванням цього методу напівпроникні полімерні плівки можуть виступати селективним бар'єром для електрохімічно активних інтерферуючих частинок, таких як аскорбінова кислота [16, 23].

Для електрохімічної полімеризації у роботі використовували суміш компонентів, приготованих у 20 мМ фосфатному буфері, pH 6,2, яка складалася з 10^{-2} М 3,4-етилендіокситіофену, 10^{-3} М поліетиленгліколю та 30 мг/мл розчину ГОД.

Полімеризацію ЕДТ здійснювали, прикладаючи потенціал від +0,2 В до +1,5 В зі швидкістю 0,1 В/с протягом 15 циклів.

Іммобілізація ГОД у парах глутарового альдегіду. Для утворення біоселективних мембран готували суміш, що містила 30 мг/мл ГОД та 5 мг/мл БСА в 10 мМ фосфатному буфері, pH 7,2. У суміш додавали

гліцерол до кінцевої концентрації 10% для стабілізації іммобілізованого ензиму, а також для запобігання передчасному висиханню суміші, нанесеної на поверхню перетворювача. Для полімеризації мембран датчики вміщували в атмосферу насичених парів глутарового альдегіду на 10 хв, після чого підсушували на повітрі.

Визначення вмісту глюкози у модельних розчинах. Вимірювання проводили при кімнатній температурі у відкритому об'ємі за інтенсивного перемішування. Як робочий буфер використовували розчин 20 мМ KH_2PO_4 — Na_2HPO_4, pH 7,2, оскільки, як було встановлено [8, 19], саме такий pH є оптимальним для функціонування іммобілізованої ГОД.

Концентрацію субстратів змінювали, додаючи певні аліквоти концентрованих розчинів. Після отримання кожного відгуку сенсор відмивали робочим буферним розчином до стабілізації базового сигналу.

Визначення вмісту глюкози у вині та в суслі. Аналіз глюкози проводили у 12 зразках вин різного типу, а також у 2 зразках білих та червоних виноматеріалів, вироблених в умовах мікровиноробства в Інституті винограду та вина «Магарач».

Вимірювання вмісту глюкози у вині та в суслі за допомогою амперометричного біосенсора проводили у 20 мМ фосфатному буферному розчині, pH 7,2, при кімнатній температурі у відкритому об'ємі за інтенсивного перемішування. Визначення концентрації глюкози здійснювали за допомогою методу стандартних додавань. Для проведення аналізу пробу розводили у 250–1 000 разів. Після отримання кожного відгуку сенсор відмивали буферним розчином до стабілізації базового сигналу.

Контрольне визначення глюкози у суслі та в готових винах проводили за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на хроматографі Agilent з використанням рефрактометричного детектора.

Результати та обговорення

Робота амперометричних біосенсорів на основі ГОД базується на такій ензиматичній реакції:

$$\text{Глюкоза} + O_2 \xrightarrow{\text{ГОД}} \text{Глюконолактон} + H_2O_2.$$

Процес ензиматичного перетворення глюкози супроводжується виділенням електрохімічно активної речовини — пероксиду водню, що окиснюється з утворенням електронів, які реєструються амперометричним перетворювачем:

$$H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H^+ + 2\,e^-.$$

На перших етапах роботи для іммобілізації ГОД застосовували метод електрохімічної полімеризації у полімері ПЕДТ, що довів свою ефективність під час розроблення амперометричного біосенсора для визначення лактату [24]. Калібрувальну криву амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої у ПЕДТ глюкозооксидази подано на рис. 2. Мінімальна концентрація глюкози, що визначається розробленим біосенсором, становить 0,04 мМ, діапазон визначення вмісту глюкози в межах 0,04 — 50 мМ.

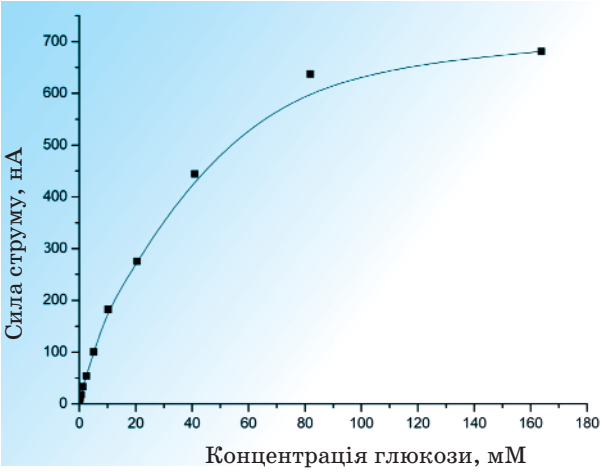

Рис. 2. **Калібрувальна крива амперометричного біосенсора на основі платинового друкованого електрода SensLab та іммобілізованої у ПЕДТ глюкозооксидази.**
Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, pH 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

Такий діапазон роботи біосенсора виявився неочікуваним, оскільки він був значно ширшим за визначений для біосенсорів з іммобілізованою іншими методами ГОД, описаних у роботах [1, 7, 13, 14, 17]. Було зроблено припущення, що глюкоза може окиснюватись на електродах без використання ензиму. Для дослідження цього феномену на поверхню амперометричного перетворювача замість ГОД було іммобілізовано бичачий сироватковий альбумін у ПЕДТ і отримано відгуки на внесення в електрохімічну комірку глюкози та інших основних компонентів вина (рис. 3,*а*). Як видно з рисунка, полімерна мембрана з ПЕДТ без ензиму дає відгуки на етанол та гліцерол, проте практично не реагує на глюкозу у межах концентрацій, в яких реєструється

надзвичайно широкий динамічний діапазон роботи біосенсора з іммобілізованою ГОД. Окрім того, у роботі [24] було показано, що біосенсор на основі лактатоксидази, електрохімічно іммобілізованої на поверхню амперометричного електрода SensLab у ПЕДТ, також не давав сигналу на глюкозу. При цьому нами встановлено, що платиновий друкований електрод SensLab сам по собі, без будь-якої ензимної мембрани, практично не дає відгуку на основні інтерферуючі речовини вина (рис. 3, *б*). Усе це свідчить про те, що такий нетипово широкий динамічний діапазон створеного датчика не є результатом неспецифічного окиснення глюкози, а зумовлений конформаційними змінами глюкозооксидази під час електрохімічної іммобілізації в ПЕДТ. Варто також зазначити, що у роботі [16], в якій ГОД було іммобілізовано на поверхню платинового електрода також шляхом електрохімічної полімеризації у полімері полі-(*о*-фенілендіамін), верхня межа динамічного діапазону визначення біосенсора теж була досить високою — 25 мМ.

Після одержання таких перспективних результатів біосенсор з іммобілізованою в ПЕДТ ГОД досліджували на селективність. Було отримано калібрувальні криві розробленого датчика за етанолом (у межах концентрацій від 1 до 160 мМ), гліцеролом (0,05–51 мМ), лактатом (0,5–40 мМ) та аскорбіновою кислотою (0,001–0,5 мМ). З рис. 4 можна зробити висновок, що іммобілізована у ПЕДТ ГОД майже не реагує на лактат та аскорбінову кислоту, проте дає істотні відгуки на внесення в електрохімічну комірку гліцеролу та етанолу, причому величина сигналу біосенсора на етанол становить близько 50% від величини відгуку на еквівалентну концентрацію глюкози. Оскільки вміст етанолу у винах є великим (до 20% за об'ємом [3]), очевидно, що аналіз вина за допомогою такого біосенсора супроводжуватиметься значною похибкою. Платиновий друкований електрод SensLab без ензимної мембрани, як видно з рис. 3, *б*, дає дуже малі неспецифічні відгуки на етанол та гліцерол (15 нА та 12 нА на додавання 100 мМ етанолу і гліцеролу відповідно). Тобто поява неспецифічного сигналу глюкозного біосенсора на етанол та гліцерол зумовлена реакцією останніх не з поверхнею голого електрода, а з електродом, модифікованим ПЕДТ (рис. 3, *а*), і цей метод іммобілізації ГОД є непридатним у разі створення біосенсора для аналізу глюкози у вині. Тому з метою зниження неспецифічного сигналу

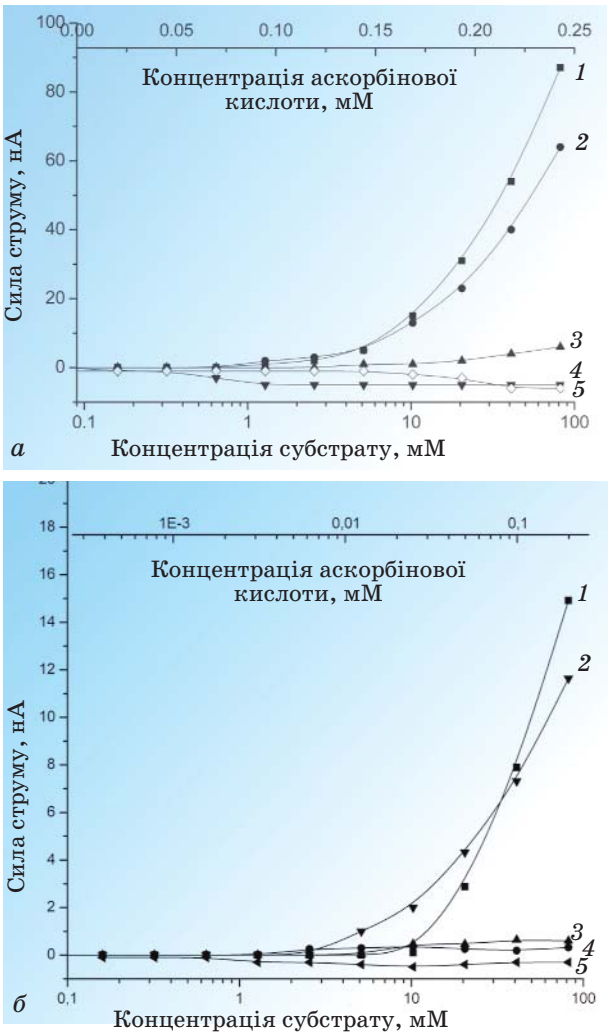

Рис. 3. **Відгуки платинового друкованого електрода SensLab з іммобілізованим у ПЕДТ бичачим сироватковим альбуміном (*а*) та без ензимної мембрани (*б*) на внесення в електрохімічну комірку різних концентрацій: етанолу (*1*); гліцеролу (*2*); глюкози (*3*); лактату (*4*); аскорбінової кислоти (*5*).**
Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, pH 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

глюкозного біосенсора нами було використано інший метод іммобілізації ГОД на поверхню платинового друкованого електрода SensLab, а саме — іммобілізацію в парах глутарового альдегіду в БСА мембрані.

На рис. 5 наведено калібрувальну криву амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої у парах ГА глюкозооксидази. Мінімальна концентрація глюкози, що визначається, становить 0,04 мМ, як і у випадку електрохімічної полімеризації у ПЕДТ. Лінійний діапазон цього біосенсора є значно вужчим 0,04–2,5 мМ, що повністю узгоджується з попередніми роботами [1, 17],

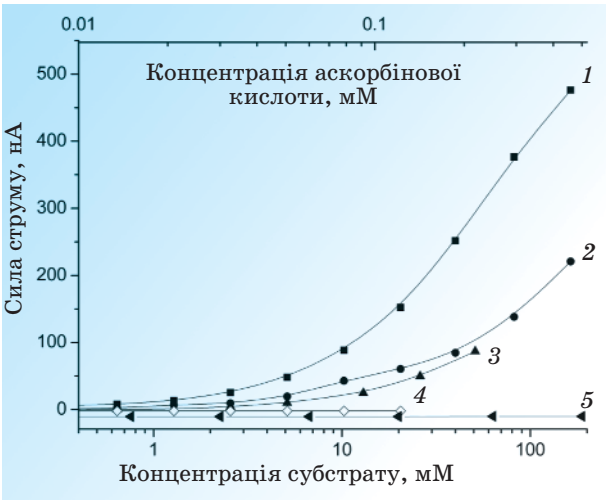

Рис. 4. **Відгуки амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої в ПЕДТ глюкозооксидази на внесення в електрохімічну комірку різних концентрацій: глюкози (*1*); етанолу (*2*); гліцеролу (*3*); лактату (*4*); аскорбінової кислоти (*5*).** Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, pH 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

в яких показано, що обмеження за верхньою межею визначення глюкози (близько 2 мМ) пов'язано саме з браком у розчині кисню — косубстрату ензиматичної реакції.

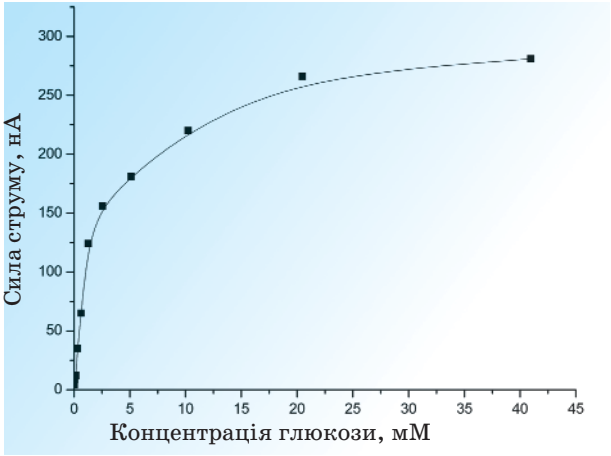

Рис. 5. **Калібрувальна крива амперометричного біосенсора на основі платинового друкованого електрода SensLab та іммобілізованої у ГА глюкозооксидази.** Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, pH 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

Аналіз селективності розробленого біосенсора показав, що іммобілізована у парах ГА ГОД зовсім не реагує на лактат та гліцерол, дає мінімальний негативний сигнал на аскорбінову кислоту та незначний відгук на етанол у концентраціях понад 10 мМ (рис. 6). Таким чином, створений на основі ГОД, іммобілізованої у парах ГА, амперометричний біосенсор демонструє кращу, порівняно з біосенсором на основі ГОД у ПЕДТ, селективність, і його відгук на глюкозу значно перевищує величину неспецифічних сигналів на основні компоненти вина.

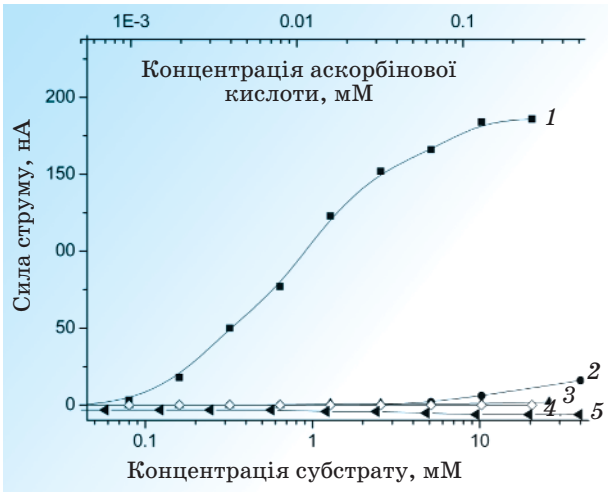

Рис. 6. **Відгуки амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої в ГА глюкозооксидази на внесення в електрохімічну комірку різних концентрацій: глюкози (*1*); етанолу (*2*); гліцеролу (*3*); лактату (*4*); аскорбінової кислоти (*5*).** Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, pH 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

З метою встановлення впливу на роботу створеного датчика інших компонентів вина (наприклад, фенольних сполук), нами було проведено такий дослід. До проби вина Кара-Даг було додано препарат ГОД у кількості 1 мг і проведено інкубацію з ензимом для розщеплення глюкози (згідно з даними ВЕРХ, концентрація глюкози у цьому вині становить 83 г/л). Потім було отримано відгуки біосенсора на внесення 10 мкл цієї суміші, відібраної через певні проміжки часу після змішування проби та ензиму. Показано, що вже через годину інкубації суміші величина відгуку біосенсора зменшилась у 2 рази, а через 24 год інкубації, коли глюкозу було повністю розщеплено ензимом, біосенсор не реагує на внесення проби вина в електрохімічну комірку. Цей експеримент свідчить, що нами було розроблено дійсно високоспецифічний та селективний біосенсор для аналізу глюкози у вині.

Дослідження чутливості та селективності глюкозного амперометричного біосенсора

на основі іммобілізованої у парах ГА ГОД уможливило проведення за його допомогою аналізу глюкози у реальних зразках.

На першому етапі роботи з виноматеріалами визначали оптимальне розведення проб вина для аналізу їх за допомогою розробленого амперометричного біосенсора. На рис. 7 зображено відгуки біосенсора на основі іммобілізованої ГОД на внесення в електрохімічну комірку різних аліквот сусла та трьох типів вин з різним вмістом глюкози, що відповідало розведенню у 5 000, 1 000, 500, 250, 100 та 50 разів. Для дослідження було використано проби вина аліготе (вміст глюкози, згідно з методом ВЕРХ 0,12 г/л, що становить 0,67 мМ), мадера (7 г/л, або 39 мМ глюкози), портвейн білий (33 г/л, або 183 мМ глюкози), а також сусло біле (125 г/л або 694,4 мМ глюкози). З рисунка видно, що для сухого вина аліготе розведення більш ніж у 500 разів є непридатним через дуже низький вміст глюкози у пробі. Сусло, навпаки, не має сенсу розводити менше, ніж у 250 разів, оскільки у діапазоні розведень 50–250 відгук біосенсора на пробу майже не змінюється через насичення ензиму субстратом. Для двох інших проб вина чітка прямолінійна залежність між об'ємом внесеної проби та відгуком біосенсора спостерігається при розведенні у 100–500 разів.

Враховуючи одержані результати, для подальшої роботи нами було обрано таке розведення проб: для сусла — у 1 000 разів, для сухих вин — у 250 разів, для всіх інших використаних вин — у 500 разів. Варто зазначити, що максимально можливий вміст основних інтерферуючих речовин у суслі та вині, розведених у 500 разів, такий [3]: етанол — до 7 мМ, гліцерол — до 0,25 мМ, лактат — до 0,1 мМ, аскорбінова кислота — до 0,005 мМ, а, як свідчать результати, наведені на рис. 5, біосенсор на основі ГОД, іммобілізованої в ГА, є зовсім не чутливим до цих речовин у наведених концентраціях.

Для визначення вмісту глюкози у винах за допомогою амперометричного біосенсора застосовували метод стандартних додавань. Для цього спочатку отримували відгук біосенсора на внесення в електрохімічну комірку проби вина, що аналізується. Потім до ідентичних об'ємів вина додавали стандартні розчини глюкози з певними концентраціями та реєстрували сигнали датчика на внесення цих сумішей. Після здійснення серії послідовних аналізів (з використанням стандартних розчинів з різною концентрацією глюкози) отримували набір точок — пряму лінію, яка після екстраполяції на вісь абсцис відсікала на ній значення концентрації глюкози у пробі аналізованого вина. З рис. 8 видно, що вміст глюкози в комірці в разі внесення розведеної у 250 разів проби вина аліготе становив 9,6 мкМ, розведених у 500 разів проб вин мадера та портвейн білий — 84 та 351 мкМ відповідно, розведеної у 1 000 разів проби сусла білого — 694 мкМ. Це означає, що в цих винах та виноматеріалі концентрація глюкози така: 0,43 г/л (2,4 мМ) для аліготе, 7,56 г/л (42 мМ) для мадери, 31,6 г/л (176 мМ) для портвейну білого та 124,9 г/л (694 мМ) для сусла білого.

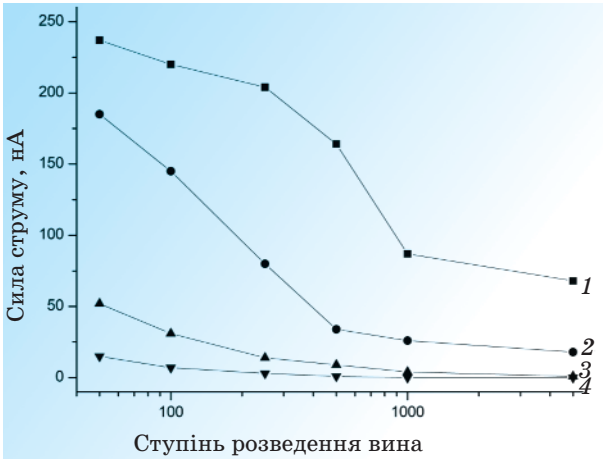

Рис. 7. **Відгуки амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої в парах ГА глюкозооксидази на внесення в електрохімічну комірку різних аліквот сусла білого (крива *1*, 125 г/л глюкози) та вина: портвейн білий (крива *2*, 33 г/л глюкози), мадера (крива *3*, 7 г/л глюкози), аліготе (крива *4*, 0,12 г/л глюкози).** Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, pH 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

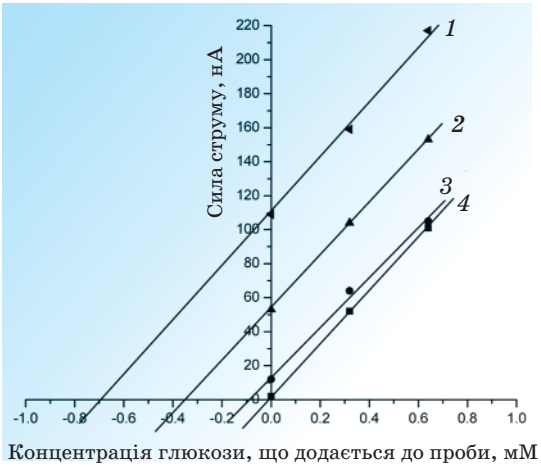

Рис. 8. **Визначення концентрації глюкози в білому суслі (*1*) та у зразках вина портвейн білий (*2*), мадера (*3*) та аліготе (*4*) за допомогою методу стандартних додавань.** Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, pH 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

Наступним етапом роботи було порівняння результатів аналізу глюкози у виноматеріалі, одержаних за допомогою біосенсора, із даними традиційного методу аналізу — високоефективної рідинної хроматографії. Як об'єкт дослідження було використано 12 проб вина різного типу та 2 проби білого й червоного сусла. Отримані дані наведено в таблиці. Слід відзначити високу кореляцію між результатами, одержаними із використанням амперометричного біосенсора та класичного хроматографічного методу визначення глюкози. Деяка розбіжність між даними ВЕРХ та біосенсора спостерігається лише в разі аналізу сухих вин, концентрація глюкози в яких є надто малою.

Урешті-решт, було досліджено відтворюваність відгуків та операційну стабільність створеного глюкозного біосенсора та показано, що через 8 год безперервної роботи біосенсор демонструє дещо більші, порівняно з початковими відгуками, сигнали на додавання розчину глюкози (рис. 9). Зростання відгуку біосенсора протягом першої доби після іммобілізації ГОД у парах ГА можна пояснити тим, що молекули ензиму поступово набувають найбільш оптимальної для їх функціонування конформації у мембрані [10]. А з додаванням у комірку проби вина відгук зменшився на 13% від початкового через 8 год безперервної роботи сенсора.

Також було вивчено стабільність глюкозного амперометричного біосенсора під час зберігання його в сухому стані при + 4 °С. Наведені на рис. 10 дані свідчать, що через 2 місяці після іммобілізації ГОД залишається

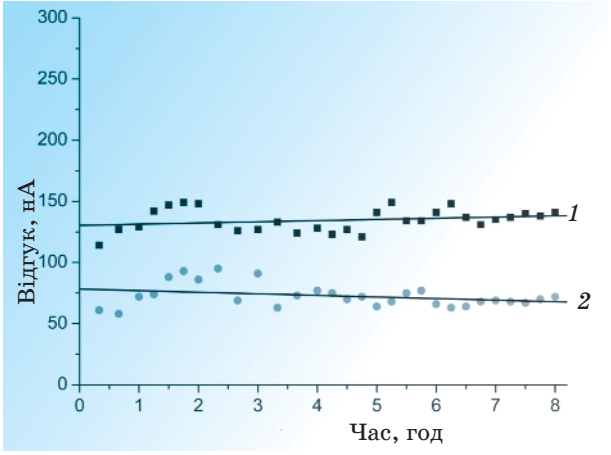

Рис. 9. **Дослідження відтворюваності відгуків та операційної стабільності амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої у парах ГА глюкозооксидази. Концентрація глюкози, що додається в електрохімічну комірку, — 1,3 мМ (*1*), проба вина — 10 мкл (*2*).**
Вимірювання проводили в 20 мМ фосфатному буфері, pH 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

близько 100% від початкової активності ензиму, а потім величина відгуку починає поступово зменшуватися. Такий ефект можна пояснити тим, що зниження активності ГОД протягом перших двох місяців зберігання не призводить до зменшення величини відгуку біосенсора, оскільки ензим у чутливій мембрані перебуває в надлишку і на каталіз ензиматичної реакції вистачає навіть його зменшеної активності. Подальше ж падіння активності ГОД нижче того рівня, який забезпечував повне розщеплення субстрату, спричинює поступове падіння активності біосенсора.

Концентрація глюкози у 12 зразках вина та у 2 зразках виноградного сусла, визначена за допомогою біосенсора та методу високоефективної рідинної хроматографії

Проба	Тип	Концентрація глюкози, г/л	
		Біосенсор	ВЕРХ
Ркацителі «Коктебель»	Біле, столове, сухе	0,63±0,1	0,29
Аліготе «Коктебель»	Біле, столове, сухе	0,47±0,05	0,12
Мерло «Коблево»	Червоне, столове, сухе	0,84±0,05	0,51
Каберне «Коктебель»	Червоне, столове, сухе	0,70±0,05	0,32
Монте Блан «Коктебель»	Біле, столове, напівсолодке	16,70±0,3	16,40
Портвейн 777 червоний	Червоне, міцне	32,76±0,2	34,54
Портвейн 777 рожевий	Рожеве, міцне	32,22±0,2	33,24
Портвейн білий	Біле, міцне	31,50±0,1	32,78
Мадера «Масандра»	Біле, міцне	7,56±0,15	7,15
Кокур «Коктебель»	Біле, десертне	87,18±0,3	87,12
Кара-Даг «Коктебель»	Червоне, десертне	85,32±0,6	83,05
Кагор український	Червоне, десертне	87,30±0,4	87,18
Сусло біле	–	125,28±0,25	124,99
Сусло червоне	–	131,31±0,6	134,54

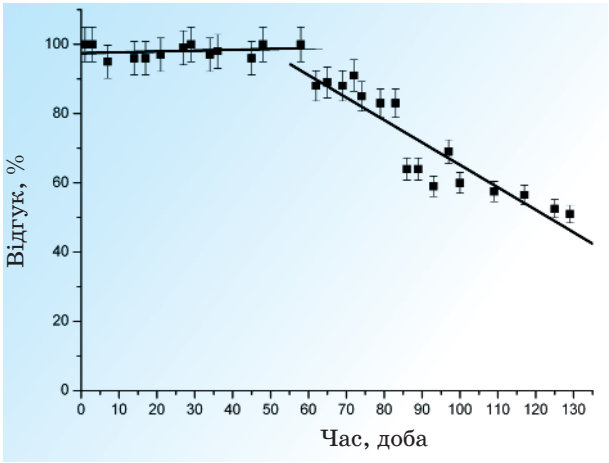

Рис. 10. **Залежність величини відгуку амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої у парах ГА глюкозооксидази від часу зберігання при + 4 ^{0}С у сухому стані. Концентрація глюкози, що додається в електрохімічну комірку, — 5 мМ.** Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, pH 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

Таким чином, у ході роботи відпрацьовано методику визначення вмісту глюкози у вині за допомогою амперометричного біосенсора на основі платинового друкованого електрода SensLab та глюкозооксидази. Досліджено селективність амперометричних біосенсорів, розроблених із застосуванням двох різних методів іммобілізації глюкозооксидази. Показано, що датчик на основі ГОД, іммобілізованої у парах глутарового альдегіду, є селективним і не демонструє неспецифічного відгуку на основні компоненти вина, на відміну від біосенсора з ГОД, іммобілізованою у полімері ПЕДТ. Вивчено відтворюваність відгуків та операційну стабільність створеного датчика на основі іммобілізованої у парах глутарового альдегіду ГОД та досліджено його стабільність під час зберігання. За допомогою розробленого біосенсора проведено аналіз концентрації глюкози у винах різного типу та в суслі. Показано високу кореляцію результатів, отриманих за допомогою глюкозного амперометричного біосенсора, із даними традиційного методу аналізу глюкози — високоефективної рідинної хроматографії. Крім того, у ході роботи встановлено, що біосенсор з іммобілізованою у полімері ПЕДТ ГОД виявляє надзвичайно широкий динамічний діапазон роботи (до 50 мМ глюкози) і може бути успішно застосований для аналізу глюкози в середовищах, що не містять етанолу та гліцеролу, наприклад у крові.

Частину цієї роботи було виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технічних потреб».

ЛІТЕРАТУРА

1. *Wu B., Zhang G., Shuang S.* Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane // Talanta. — 2004. — V. 64. — P. 546–553.
2. *Niculescu M., Mieliauskiene R., Laurinavicius V., Csooregi E.* Simultaneous detection of ethanol, glucose and glycerol in wines using pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases based biosensors // Food Chemistry. — 2003. — V. 82. — P. 481–489.
3. *Горюшкіна Т. Б., Дзядевич С. В.* Виноградні вина. Хімічний склад та методи визначення // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, №2. — С. 24–38.
4. *Niculescu M., Erichsen T., Sukharev V. et al.* Quinohemoprotein alcohol dehydrogenase-based reagentless amperometric biosensor for ethanol monitoring during wine fermentation // Anal. Chim. Acta. — 2002. — V. 463, №1. — P. 39–51.
5. *Шольц Е. П., Пономарев В. Ф.* Технология переработки винограда. — М.: Агропромиздат, 1990. — 447 с.
6. Office International de la Vigne et du Vin (OIV). Recueil des methods internationles d'analyse des vine et des mouts. — Paris: OIV, 2006. — 321 p.
7. *Горюшкіна Т. Б., Дзядевич С. В.* Ферментні біосенсори для кількісного аналізу компонентів вина // СЕМСТ. — 2008, №1. — С. 49–67.
8. *Шкотова Л. В., Солдаткин А. П., Дзядевич С. В.* Адаптация амперометрического ферментного биосенсора для анализа глюкозы в винах // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 3. — С. 114–121.

9. *Antiochia R., Gorton L.* Development of a carbon nanotube paste electrode osmium polymer-mediated biosensor for determination of glucose in alcoholic beverages // Biosens. and Bioelectr. — 2007. — V. 22. — P. 2611–2617.
10. *Razumiene J., Vilkanauskyte A., Gureviciene V. et al.* New bioorganometallic ferrocene derivatives as efficient mediators for glucose and ethanol biosensors based on PQQ-dependent dehydrogenases // J. of Organomet. Chem. — 2003. — V. 668. — P. 83–90.
11. *Laurinavicius V., Razumiene J., Kurtinaitiene B. et al.* Bioelectrochemical application of some PQQ-dependent enzymes // Bioelectrochemistry. — 2002. — V. 55. — P. 29–32.
12. *Alkasrawi M., Popescu I.C., Laurinavicius V. et al.* A redox hydrogel integrated PQQ-glucose dehydrogenase based glucose electrode // Anal. Commun. — 1999. — V. 36. — P. 395–398.
13. *Miertus S., Katrliik J., Pizzariello A. et al.* Amperometric biosensors based on solid binding matrices applied in food quality monitoring // Biosens. and Bioelectr. — 1998. — V. 13, N7–8. — P. 911–923.
14. *Guzman-Vaazquez de Prada A., Penna N., Parrado C. et al.* Amperometric multidetection with composite enzyme electrodes // Talanta. — 2004. — V. 62. — P. 896–903.
15. *Gonzalo-Ruiz J., Alonso-Lomillo M. A., Munnoz F. J.* Screen-printed biosensors for glucose determination in grape juice // Biosens. and Bioelectr. — 2007. — V. 22. — P. 1517–1521.
16. *De Corcuera J. I. R. Cavalieri R. P., Powers J. R.* Improved platinization conditions produce a 60-fold increase in sensitivity of amperometric biosensors using glucose oxidase immobilized in poly-o-phenylenediamine // J. of Electroanal.Chem. — 2005. — V. 575. — P. 229–241.
17. *Florescua M., Bretta C. M. A.* Development and evaluation of electrochemical glucose enzyme biosensors based on carbon film electrodes // Talanta. — 2005. — V. 65. — P. 306–312.
18. *Zhao M., Hibbert D. B., Gooding J. J.* An oxygen-rich fill-and-flow channel biosensor // Biosens. and Bioelectron. — 2003. — V. 18. — P. 827–833.
19. *Yang X. Zhou Z., Xiao D, Choi M. M. F.* A fluorescent glucose biosensor based on immobilized glucose oxidase on bamboo inner shell membrane // Ibid. — 2006. — V. 21. — P. 1613–1620.
20. *De Luca S., Florescu M., Ghica M. E. et al.* Carbon film electrodes for oxidase-based enzyme sensors in food analysis // Talanta. — 2005. — V. 68. — P. 171–178.
21. *Бережецький А. Л., Щувайло О. М., Архипова В. М. та ін.* Дослідження та оптимізація різних перетворювачів для створення амперометричних біосенсорів // Sens. Electron. and Microsyst. Technol. — 2005. — №2. — С. 55–62.
22. *Шкотова Л. В., Горюшкіна Т. Б., Сластья Є. А. та ін.* Амперометричний біосенсор для аналізу лактату у вині та у виноградному суслі у процесі його ферментації // Укр. біохім. журн. — 2005. — Т. 77, №5. — С. 123–130.
23. *Azevedo A. M., Prazeres M. F., Cabral J. M. S., Fonseca L. P.* Ethanol biosensors based on alcohol oxidase // Biosens. and Bioelectron. — 2005. — V. 21. — P. 235–247.
24. *Горюшкіна Т. Б., Шкотова Л. В., Сластья Є. А. та ін.* Оптимізація методики визначення лактату у виноматеріалі амперометричним ферментним біосенсором // СЕМСТ. — 2008, №2. — С. 39–47.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В ВИНОМАТЕРИАЛЕ ЭНЗИМНЫМ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ БИОСЕНСОРОМ

Т. Б. Горюшкина[1, 2], *Е. В. Остроухова*[3], *А. П. Солдаткин*[1], *С. В. Дзядевич*[1]

[1]Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев
[2]Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
[3]Национальный институт винограда и вина «Магарач», Ялта

E-mail: tatiana_goryushkina@yahoo.com

Отработана методика определения глюкозы в вине с помощью амперометрического биосенсора на основе платинового печатного электрода SensLab и глюкозооксидазы (ГОД). Исследована селективность биосенсоров, разработанных с применением двух разных методов иммобилизации ГОД. Показано, что датчик на основе ГОД, иммобилизованной в парах глутарового альдегида (ГА), не дает отклика на основные интерферирующие вещества вина, в отличие от биосенсора с ГОД, иммобилизованной в полимере поли-(3,4-этилендиокситиофен) (ПЭДТ). Изучены операционная стабильность созданного датчика на основе иммобилизованной в парах ГА ГОД и его стабильность при хранении. С помощью разработанного биосенсора проведен анализ концентрации глюкозы в винах разного типа и в сусле. Показана высокая корреляция полученных результатов с данными высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлено, что биосенсор с иммобилизованной в полимере ПЭДТ ГОД обладает чрезвычайно широким динамическим диапазоном работы и может быть успешно применен для анализа глюкозы в средах, не содержащих этанол и глицерол, например в крови.

Ключевые слова: амперометрический биосенсор, глюкоза, вино, сусло.

OPTIMIZATION OF METHODS OF GLUCOSE CONTENT DETERMINATION IN WINE BY ENZYME AMPEROMETRIC BIOSENSOR

T. B. Goriushkina[1, 2], *O. V. Ostroukhova*[3], *O. P. Soldatkin*[1], *S. V. Dzyadevych*[1]

[1]Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
[2] Taras Shevchenko National University, Kyiv
[3] Institute for Vine and Wine «Magarach», Yalta

E-mail: tatiana_goryushkina@yahoo.com

A method of glucose determination in wine by an amperometric biosensor on the basis of platinum printed electrode SensLab and glucose oxidase was optimized. Selectivity of glucose biosensors created on the basis of two different methods of glucose oxidase immobilization was investigated. Main wine interferents were demonstrated to have no effect on work of the biosensor with glucose oxidase immobilised in glutaraldehyde vapor, but they influenced on work of the biosensor with glucose oxidase immobilised in PEDT polymer. Reproducibility, operational and storage stability of the created biosensor on the basis of glucose oxidase immobilised in glutaraldehyde vapor were investigated. Glucose concentration in several types of wine and must was determined with the created biosensor, and the results were compared with those obtained by traditional analytical method — HPLC. Good correlation between data obtained by the biosensor method and HPLC was shown. It was also determined that biosensor with glucose oxidase in PEDT polymer is characterized by extremely wide dynamic range of work and it can be successfully used for glucose analysis in the liquids without ethanol and glycerol — for example, in blood.

Key words: amperometric biosensor, glucose, wine, must.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Description of recovery method used for curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 and its relation to the morphology and physicochemical and technological properties of the polysaccharide

Camila Sampaio Mangolim[1], Thamara Thaiane da Silva[2], Vanderson Carvalho Fenelon[3], Luciana Numata Koga[3], Sabrina Barbosa de Souza Ferreira[3], Marcos Luciano Bruschi[3], Graciette Matioli[1,3]*

1 Postgraduate Program in Food Science, State University of Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brazil, **2** Department of Food Engineering, State University of Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brazil, **3** Postgraduate Program in Pharmaceutical Science, State University of Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brazil

* gmatioli@uem.br

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Mangolim CS, Silva TTd, Fenelon VC, Koga LN, Ferreira SBdS, Bruschi ML, et al. (2017) Description of recovery method used for curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 and its relation to the morphology and physicochemical and technological properties of the polysaccharide. PLoS ONE 12(2): e0171469. doi:10.1371/journal.pone.0171469

Editor: Krishnendu Acharya, University of Calcutta, INDIA

Received: October 21, 2016

Accepted: January 21, 2017

Published: February 28, 2017

Copyright: © 2017 Mangolim et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data is in the paper and supporting information files.

Funding: The authors are thankful to the Brazilian Agencies CAPES, CNPq and Fundação Araucária for their financial support of this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Curdlan is a linear polysaccharide considered a dietary fiber and with gelation properties. This study evaluated the structure, morphology and the physicochemical and technological properties of curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 recovered by pre-gelation and precipitation methods. Commercial curdlan submitted or otherwise to the pre-gelation process was also evaluated. The data obtained from structural analysis revealed a similarity between the curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (recovered by both methods) and the commercial curdlans. The results showed that the curdlans evaluated differed significantly in terms of dispersibility and gelation, and only the pre-gelled ones had significant potential for food application, because this method influence on the size of the particles and in the presence of NaCl. In terms of technological properties, the curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) had a greater water and oil holding capacity (64% and 98% greater, respectively) and a greater thickening capacity than the pre-gelled commercial curdlan. The pre-gelled commercial curdlan displayed a greater gelling capacity at 95˚C than the others. When applied to food, only the pre-gelled curdlans improved the texture parameters of yogurts and reduced syneresis. The curdlan gels, which are rigid and stable in structure, demonstrated potential for improving the texture of food products, with potential industrial use.

Introduction

Polysaccharides are an extremely diverse family of natural biopolymers, which are industrially used as thickeners, stabilizers and gelling agents in foodstuffs [1]. There is currently growing interest in their biological functions, such as their antioxidant and prebiotic activity. Although polysaccharides are derived from various sources such as microorganisms, algae and higher plants, the market is dominated by polysaccharides obtained from algae (such as carrageenans, alginates and agar) and higher plants (such as starch, cellulose and pectin) [2].

The synthesis of microbial polysaccharides has emerged as an important source of new biopolymers for industrial use [3]. It is an attractive alternative as microorganisms can grow under controlled conditions and produce a large variety of polysaccharides with unique properties. Production can be carried out in large quantities by biotechnological routes and from renewable and low-cost raw materials, which are easily recovered [4]. One of the microbial polysaccharides of industrial interest is curdlan, a neutral exopolysaccharide composed exclusively of glucose residues joined by β-(1→3) bonds, commercially produced by bacterial species of *Agrobacterium* [2,5–7].

After being discovered by Harada in 1966, curdlan has received considerable attention in both the food and non-food industry due to its physicochemical properties, which are unique when compared to other polysaccharides commonly used, such as starch. When in aqueous suspension, curdlan may form a thermoreversible gel (low-set gel) when heated to temperatures close to 55˚C with subsequent cooling. This gel has similar behavior to agar and gelatin gels. In addition, curdlan can form a thermoirreversible gel (high-set gel) when its aqueous suspension is heated to temperatures above 80˚C, which is very stable. Furthermore, gels with different strengths can be formed by varying the temperature, the heating time and the concentration of curdlan [1,6].

Curdlan was approved for use in foodstuffs in Korea, Taiwan and Japan in 1989 and registered in 1996 by the FDA (*Food and Drug Administration*) in the USA as a food additive with the following functions: a formulation and processing aid, and a stabilizer, thickener and texturizer [8]. It is widely used due to its ability to form the thermoirreversible gel, which exhibits great stability during the industrial processes of autoclaving, frying and freezing-thawing cycles. It has no taste, color or odor, can form gels at a wide pH range (from 2 to 10) and can mimic the palatability of foods containing fat [9]. It is also considered a dietary fiber, thus improving the functionality of various food products. The versatility of its applications associated with its health benefits make curdlan a valuable tool in the development of innovative food systems [1,3].

The dispersion and gelation characteristics of curdlan in an aqueous system, as well as its mechanical properties, are associated with several factors such as concentration, temperature, heating time, dispersal method, and the presence of ions, salts and low molecular weight sugars [10]. Therefore, the form of recovery from the culture medium and the purification of the polysaccharide are steps which decisively influence the physical and technological properties of curdlan, which directly affect the sensory characteristics of foods in which the polysaccharide is inserted. So, it is necessary to study these properties to define the most appropriate form of the implementation of the polysaccharide in the industry [11].

Considering the interest in the properties of dispersion, viscosity, gelation and the health benefits of curdlan, the present study aimed to characterize the physicochemical and technological properties of curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 and recovered using the pre-gelation and precipitation methods, as well as commercial curdlan subjected or otherwise to pre-gelation treatment. The methodologies employed for the recovery of the curdlans

were studied. The structures of all curdlans were compared by FT-Raman spectroscopy. In addition, the application of curdlans in yogurts was evaluated.

Materials and methods

Materials

The bacterial strain *Agrobacterium* sp. IFO 13140 was purchased in lyophilized form from the Institute for Fermentation of Osaka (Japan). Commercial curdlan was acquired from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). All solvents were of analytical grade.

Curdlan production by *Agrobacterium* sp. IFO 13140

The culture medium used to reactivate the microorganism was proposed by the supplier (g L^{-1}), pH 7: polypeptone (10), yeast extract (2), $MgSO_4.7H_2O$ (1). 30 mg of the lyophilized bacteria were incubated in 100 mL of the medium at 30˚C and 120 rpm for 48 h. The cells were recovered through centrifugation (6000 ×g, 10 min), washed with 9 g L^{-1} NaCl and transferred to the production medium. For curdlan production, the liquid medium described by Martinez et al. [12], pH 7, was used (g L^{-1}): glucose (50), KH_2PO_4 (2.7), NH_4Cl (1.6), $MgSO_4$ (0.5) and trace elements (10 mL L^{-1}). The composition of the trace elements (g L^{-1}) in HCl 0.1 mol L^{-1} was: $FeCl_3.6H_2O$ (1), $MnCl_2.4H_2O$ (1), ZnCl (1), $CaCl_2$ (1) and $CaCO_3$ (0.03). The reactivated microorganisms were transferred to Erlenmeyer flasks containing 100 mL of the production medium and maintained at 30˚C and 150 rpm for 5 days.

Recovery of curdlan from production medium

Two methodologies were used to recover curdlan from the medium. In pre-gelation method [12,13], NaOH 3 mol L^{-1} was added to the Erlenmeyer flasks containing the production medium at a ratio of 1.8:1 (NaOH:medium) for curdlan solubilization. This mixture was centrifuged (18000 ×g, 15 min, 4˚C) to separate the cells. HCl 3 mol L^{-1} was added to the supernatant until pH 6–7 to obtain the curdlan gel, which was recovered by centrifugation (18000 ×g, 15 min, 4˚C). Subsequently, it was washed three times with distilled water and lyophilized. The commercial curdlan was subjected to the same treatment and it was named pre-gelled commercial curdlan.

The precipitation method is an adaptation of the industrial purification of curdlan. Industrially produced curdlan is purified by dissolution in a strong alkaline solution and dried in a spray-dryer, then washed with water until neutralization [14]. NaOH 3 mol L^{-1} was added to the Erlenmeyer flasks containing the production medium at a ratio of 1.8:1 (NaOH: medium) to solubilize the curdlan and the mixture was centrifuged at 18000 ×g for 15 min at 4˚C to separate the cells, before being lyophilized. The dried mixture was resuspended in water, filtered to remove larger impurities and then ultra-filtered using the system described by Fenelon et al. [15] with a 30 kDa membrane and pressure of 1 kgf cm^{-2}. During ultrafiltration, the material was washed with water until the pH was neutralized, causing the precipitation of the curdlan, that was thereafter lyophilized.

Structural analysis of curdlans by FT-Raman

Samples of the commercial and commercial pre-gelled curdlans and those produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation and precipitation methods) were analyzed by Fourier transform Raman scattering infrared spectroscopy (FT-Raman) using a Fourier Transform infrared spectrometer (Vertex 70v model with Ram module II, Bruker, Germany) equipped

with a Germanium detector cooled with liquid nitrogen. A Nd:YAG laser was used for excitation at 1064 nm. The spectra were based an average of 200 scans with a resolution of 4 cm^{-1}.

Morphology of curdlans

The morphology of the commercial and commercial pre-gelled curdlans, and the curdlans produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation and precipitation methods) was analyzed in a scanning electron microscope (SS-550 model, Superscan, Shimadzu, Japan), at an accelerating voltage of 15 kV.

Physicochemical characterization of curdlans

The commercial and commercial pre-gelled curdlans and those produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation and precipitation methods) were characterized for their carbohydrate, moisture and sodium content. The carbohydrate content was determined through the phenol-sulfuric method [16]. The moisture content was determined by the gravimetric method [17] and sodium was identified using atomic absorption spectrometry [18].

Technological properties of curdlans

Water dispersion and gel formation capacities of curdlans. To verify the dispersal capacity in water of the commercial and commercial pre-gelled curdlans and those produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation and precipitation methods), they were subjected to stirring in a mixer and/or in a magnetic stirrer until homogeneous dispersion was achieved. The dispersions were heated at 95˚C/1 h to assess the gel formation capacity.

Rheological characteristics and gel strength of curdlans. Dispersions of the pre-gelled commercial curdlan and the curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) were prepared at three concentrations: 20 g L^{-1}, 40 g L^{-1} and 80 g L^{-1} in water. The curdlans were dispersed in water using a mixer at room temperature for 5 min, sonicated for 10 min and then stirred in a magnetic stirrer for 12 h at 40˚C. The samples were analyzed in a controlled stress rotational rheometer (HAAKE MARS II model, Thermo Fisher Scientific Inc., Newington, Germany), with steel cone/plate geometry (60 mm, gap 0.052 mm). The elastic (G') and viscous (G") modulus, and the apparent viscosity were measured depending on temperature (20–60˚C) at a frequency of 10 Hz. For gel strength evaluation, the dispersions of both samples at the concentration of 20 g L^{-1} were kept or not in a water bath at 61˚C/1 h to prepare the low-set gel and at 95˚C/1 h for preparation of the high-set gel [19]. After heating, they were cooled at room temperature. The strength of the suspensions and gels was evaluated in triplicate in a Stable Micro Systems texturometer (TA-XT Plus model, Texture Technologies Corp., UK), using a 36 mm probe for compression analysis.

Water Holding Capacity (WHC), Oil Holding Capacity (OHC) and Water Solubility Index (WSI). Samples of 0.25 g of the commercial and pre-gelled commercial curdlans and curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) were diluted in 10 mL of distilled water or soya oil at 30˚C, homogenized in a magnetic stirrer for 30 min and centrifuged (1500 ×g, 10 min). The WHC was expressed as g of water absorbed per g of curdlan sample and the OHC was described as g of oil absorbed per g of curdlan sample. To determine the WSI, the supernatant of the WRI analysis was oven dried at 105˚C and the ratio between the weight of the solid residue present in the supernatant after drying and the weight of the curdlan sample was calculated [11].

Application of curdlan in yogurt

Preparation of yogurts. Eight yogurt samples were prepared: A1) without curdlan or heat treatment; A2) without curdlan and with heat treatment; B1) with commercial curdlan and without heat treatment; B2) with commercial curdlan and heat treatment; C1) with pre-gelled commercial curdlan and without heat treatment; C2) with pre-gelled commercial curdlan and heat treatment; D1) with curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) without heat treatment; D2) with curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) with heat treatment.

The curdlan was mixed in UHT (ultra-high temperature) whole milk at a concentration of 15 g L^{-1} using a mixer. Subsequently, the milk of the samples subjected to heat treatment was heated at 90˚C for 120 seconds and cooled to 42˚C. For samples without heat treatment, the milk was directly heated to 42˚C. Next, all samples were inoculated with 2 g L^{-1} of mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, and maintained at 42˚C for 6 h. The yogurts were cooled and refrigerated for 24 h for rheological, texture and syneresis analysis [3,20].

Texture Profile Analysis (TPA). The TPA of the yogurts was carried out in a TA-XT Plus texturometer (Stable Micro Systems, Godalming, UK), equipped with Texture Expert software (Stable Micro Systems, Godalming, UK). A 10 mm cylindrical probe was used (ref. P/0.5R, Stable Micro Systems). Two cycles were applied, at a velocity of 2 mm s^{-1} and a depth of 15 mm, producing force-time curves which were used to determine the firmness, cohesiveness, adhesiveness, springiness, gumminess and chewiness of the samples. The analysis was performed in triplicate, at 8˚C.

Syneresis. The syneresis analysis of each preparation was performed after 28 days of storage of the yogurt at 8˚C in triplicate. Yogurt samples (30–40 g) were centrifuged (222 ×g, 10 min, 4˚C) and the supernatant was separated and centrifuged again (222 ×g, 10 min, 4˚C), weighed and the syneresis (%) was calculated from the ratio between the mass of the supernatant and the initial mass of the yogurt [20].

Rheological analysis. The rheological properties of flow of the yogurts were analyzed in triplicate, in a controlled stress rotational rheometer (HAAKE MARS II model, Thermo Fisher Scientific Inc., Newington, Germany), with steel cone/plate geometry (60 mm, gap 0.052 mm). The measurements were performed at 8˚C. The scan of the deformation rate was performed from 0 to 116 s^{-1}, obtaining the outward and return data. The flow and viscosity curves were obtained by determining the stress and viscosity versus the shear rate [20]. The rheological parameters K (consistency index) and n (flow behavior index) were calculated using the Ostwald de Waele model, while the parameter τ_0 (yield stress) was calculated by the Herschel-Bulkley model. The hysteresis was calculated from the area of the flow curves of the yogurts using the RheoWin 4.10.000 software program (HAAKE software, Thermo Fisher Scientific Inc., Newington, Germany).

Statistical analysis

Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA), and means were compared with the Tukey Test ($p<0.05$) using the Statistica 8.0/2008 software package (Stat Soft, Inc., Tulsa, USA).

Results and discussion

Structural analysis of curdlans by FT-Raman

Fig 1 shows FT-Raman spectra of commercial and pre-gelled commercial curdlans and those produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation and precipitation methods). From the

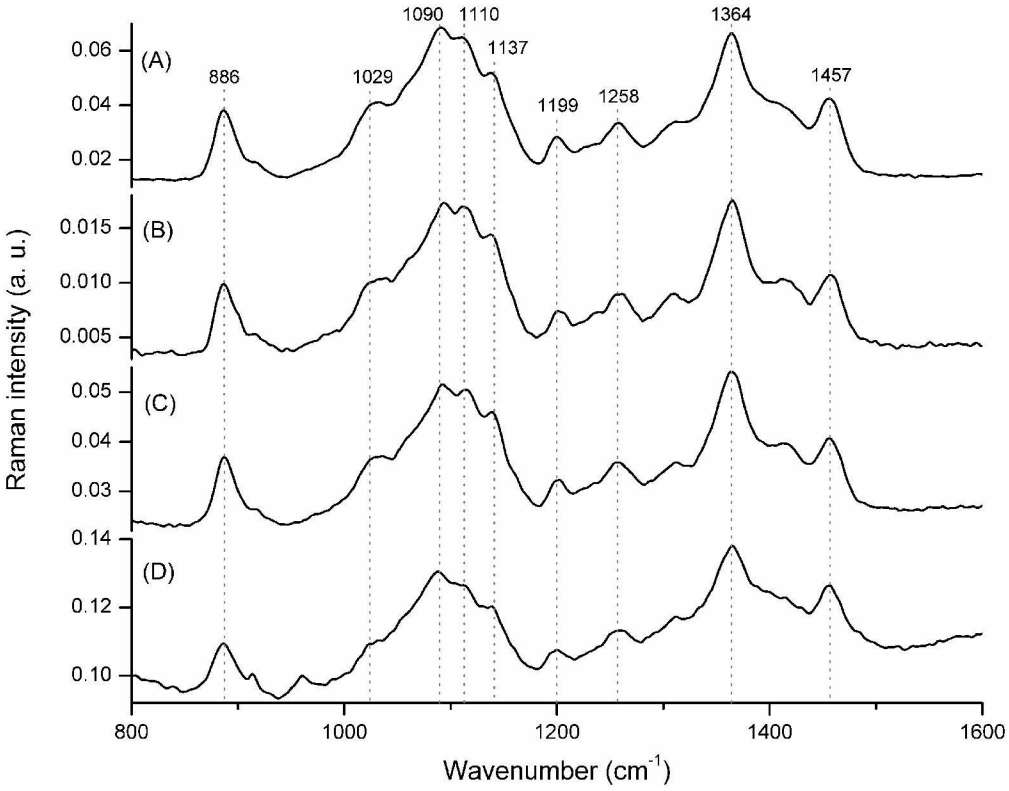

Fig 1. FT-Raman spectra of: (A) commercial curdlan, (B) pre-gelled commercial curdlan, (C) curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gellation method), (D) curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (precipitation method). The dotted lines show the characteristic peaks of the samples.

doi:10.1371/journal.pone.0171469.g001

data, it is verified a structural similarity between all samples, which means that the curdlan produced by the microorganism has a similar structure to commercial curdlan and it also means that the method employed to recover curdlan from the medium did not modify the structure of the polysaccharide.

Several authors described the chemical bonds present in the structure of curdlan molecule based in FT-IR analysis [3,14,21]. They stated that, from the FT-IR data for curdlan, the bands around 890, 1080 and 1160 cm^{-1} correspond to the β-(1,3)-glucan linkages. Despite the difference in band assignments for FT-IR and FT-Raman spectroscopies, the spectra of carbohydrates in both techniques show a characteristic absorption band of β-anomeric configuration at ~890 cm^{-1} (886 cm^{-1} in this work) [22]. The Raman bands and shoulders at 1090 and 1137 cm^{-1} are typical for β-glucans. Intense highly overlapped Raman bands between 990 and 1200 cm^{-1} are attributed to COC and CC stretching vibrations of polysaccharides. The features between 1200 and 1440 cm^{-1} are mainly assigned to in-plane ring deformation including CH and OH bending modes. Finally, the band at 1457 cm^{-1} is assigned to CH_2 in-plane bending in CH_2OH of the molecule [23].

Morphology of curdlans

Fig 2 shows scanning electron microscopy images of the commercial curdlan (Fig 2A and 2B), the pre-gelled commercial curdlan (Fig 2C and 2D) and the curdlans produced by

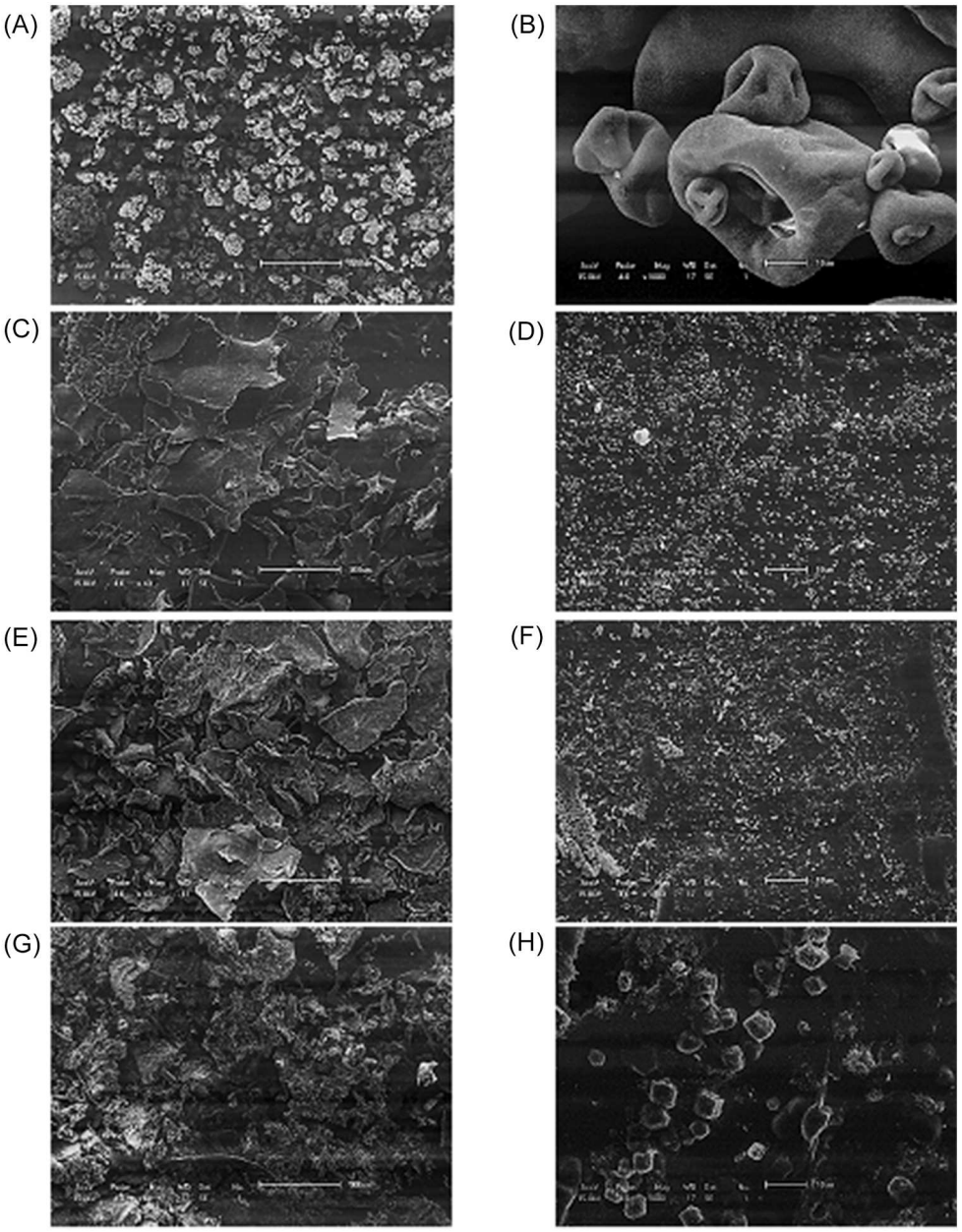

Fig 2. Scanning electron microscopy of: commercial curdlan—(A) 40x and (B) 1000x magnification; pre-gelled commercial curdlan—(C) 40x and (D) 1000x magnification; curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method)—(E) 40x and (F) 1000x magnification; curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (precipitation method)—(G) 40x and (H) 1000x magnification.

doi:10.1371/journal.pone.0171469.g002

Agrobacterium sp. IFO 13140 recovered by pre-gelation and precipitation methods (Fig 2E–2H) with a range of magnifications.

Marchessault and Deslandes [24] define the shape of the granules of commercial curdlan as collapsed or invaginated, which coincides with the commercial curdlan shape illustrated in Fig 2A and 2B. The granules have widely differing sizes, varying from around 10 to 100 μm in diameter. Industrially produced curdlan is dried by spray-drying [14] and the type of drying

has a major influence on the particle bead structure [25]. The expected range of particle size of polymers dried by ordinary spray dryers is 5–150 μm. Furthermore, spherical microspheres or those with pores/concavities, as shown in Fig 2A and 2B, are characteristic of the drying of products by a spray-dryer. The formation of pores or concavities is associated with the rapid evaporation of the liquid particles of this process [26].

The pre-gelled commercial curdlan and both the curdlans produced by the microorganism, when viewed at low magnification (40x), were in flake form and displayed irregularities. These characteristics are expected for lyophilized products, since the working conditions of the lyophilizer exert great pressure on the particles to be dried, meaning that a product dried by lyophilization remains amorphous in comparison with a spray dried product [25]. Furthermore, at a higher magnification (1000x), it can be seen that the particles obtained for the three samples that underwent the lyophilization process (Fig 2D, 2F and 2H), were considerably smaller than the commercial curdlan (obtained by spray-dryer). Therefore, it can be inferred that the lyophilization process can facilitate the dispersion of curdlan molecules in water, especially the pre-gelled commercial curdlan and the one produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method), which have smaller particle sizes (Fig 2D and 2F). The smaller diameter increases the accessibility of water molecules to the inside of the particles, facilitating dispersion.

The structure displayed by the commercial curdlan is maintained by a large amount of hydrogen bonds. But, when added to an alkaline solution, these bonds are broken due to their ionization, and the granule loses its structure. The neutralization of the curdlan suspension causes a reshaping of the hydrogen bonds that depends on the neutralizing agent used. With the addition of HCl (pre-gelation method), the reassociation causes the formation of a firm gel, with small structures of less than 1 μm in diameter (Fig 2D and 2F). With water (precipitation method), reassociation causes the precipitation of the curdlan into small particles with diameters greater than those obtained by neutralization with HCl, ranging from 2–10 μm in diameter (Fig 2H). Therefore, the difference between the sizes of the curdlan particles produced by the microorganism using the two methods is due to the different forms of reassociation of the hydrogen bonds, which are dependent on the recovery method employed, and can also influences the characteristics of water dispersion of the polysaccharide.

Physicochemical characterization of curdlans

As an exopolysaccharide, curdlan is secreted to the extracellular medium in the form of biofilms, and has the advantage of being easy to recover. As a result, the polysaccharide should present a low degree of impurities, and consequently the carbohydrate content represents an indirect measure of the purity of the samples. The levels of carbohydrates and moisture found in the curdlan samples are shown in Table 1.

The highest carbohydrate content was found for the commercial sample. The pre-gelled commercial sample had a carbohydrate content lower than the commercial curdlan due to the salt (NaCl) incorporated in the pre-gelling process. The two samples produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 had different carbohydrate contents, with that produced by precipitation method having greater purity due to the successive washings performed. The impurities in the last samples consist of remnants of the production medium and the salt formed in the recovery step.

The sodium content of curdlans was determined because curdlan is a glucose polymer with a low amount of inorganic salts, mainly sodium chloride [27]. Thus, sodium content is an indirect estimate of the salt content of the material. The sodium concentrations disposed in

Table 1. Carbohydrate, moisture and sodium content (%) of different samples of curdlan. Values indicate mean ± standard-deviation.

Curdlan sample	Carbohydrate	Moisture	Sodium
Commercial	94.5 ± 0.2	4.1 ± 0.4	1.2 ± 0.3
Commercial pre-gelled	82 ± 1	4.0 ± 0.3	4.4 ± 0.8
Microbial* (pre-gelation method)	70.6 ± 0.6	5.4 ± 0.9	0.024 ± 0.001
Microbial* (precipitation method)	85.4 ± 0.7	4.8 ± 0.6	< 0.001

*Produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140.

doi:10.1371/journal.pone.0171469.t001

Table 1 directly influence the dispersion and gelling characteristics of the polysaccharide, which will be further discussed in the next section.

Technological properties

Water dispersibility and gelling capacities. Curdlan can be used as a thickener, stabilizer and texturizer in food industry [8,27]. However, as curdlan is insoluble in water, it is necessary to use an efficient homogenizer to obtain a homogeneous dispersion and apply a further stirring of the dispersion prior to the carrying out of analyses requiring uniformity [21].

The pre-gelled commercial curdlan and the curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) dispersed easily in water when subjected to stirring in a mixer for less than 5 min, and also acted as thickening agents. Both dispersions remained visibly homogeneous for days and, when heated at 95˚C/1 h, formed a firm and homogeneous gel. The commercial curdlan did not easily disperse in water using the mixer. After 24 hours of stirring in a magnetic stirrer, a homogeneous dispersion formed for a brief period, displaying a phase separation after 10 min of rest. After 48 h of stirring, phase separation began to be observed at 30 min; after 72 h, at 1 hour; and after 96 h, phase separation began at 1.5 h. The gelling of commercial curdlan also occurred after heating at 95˚C/1 h, but there was phase separation in the gel formed, which became more pronounced as the stirring period for formation of the dispersion was reduced. Marchessault and Deslandes [24] have previously identified the formation of a non-homogenous gel from curdlan in its native form. Probably, the difficulty of dispersion of commercial curdlan compared with those submitted to pre-gelation process is related to the particle size of the sample (as noted in morphological analysis), which makes difficult the accessibility of water molecules to the inside of the particles.

Another important factor related to the dispersion and gelling of curdlan is the presence of salts. In the gelling of curdlan, the swelling phase of the molecule is essential and may be influenced by salts, as they affect the mobility of the water molecules during hydration [10]. The swelling of curdlan is facilitated with the salts present because it increases intermolecular association and consequently increases the viscosity of curdlan water dispersions. The curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (precipitation method) displayed greater difficulty in forming a homogenous dispersion in water and, in contrast to the other curdlans, did not form a gel when heated. This can be explained by its considerably lower sodium content, due to the countless washings with water used to achieve neutralization. Samples of the other curdlans were also washed in the ultrafiltration device and, following such process, no longer had the same dispersion and gelling capacities. This proves therefore, that as with other biopolymers, for curdlan, the rheological characteristics depend excessively on the methods of recovery employed following production. Due to the characteristics displayed, the technological characteristics of the curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (precipitation method) were not evaluated, and this sample was not applied in yogurt. Additionally, dispersions of commercial curdlan were not evaluated by rheological and gel strength analysis

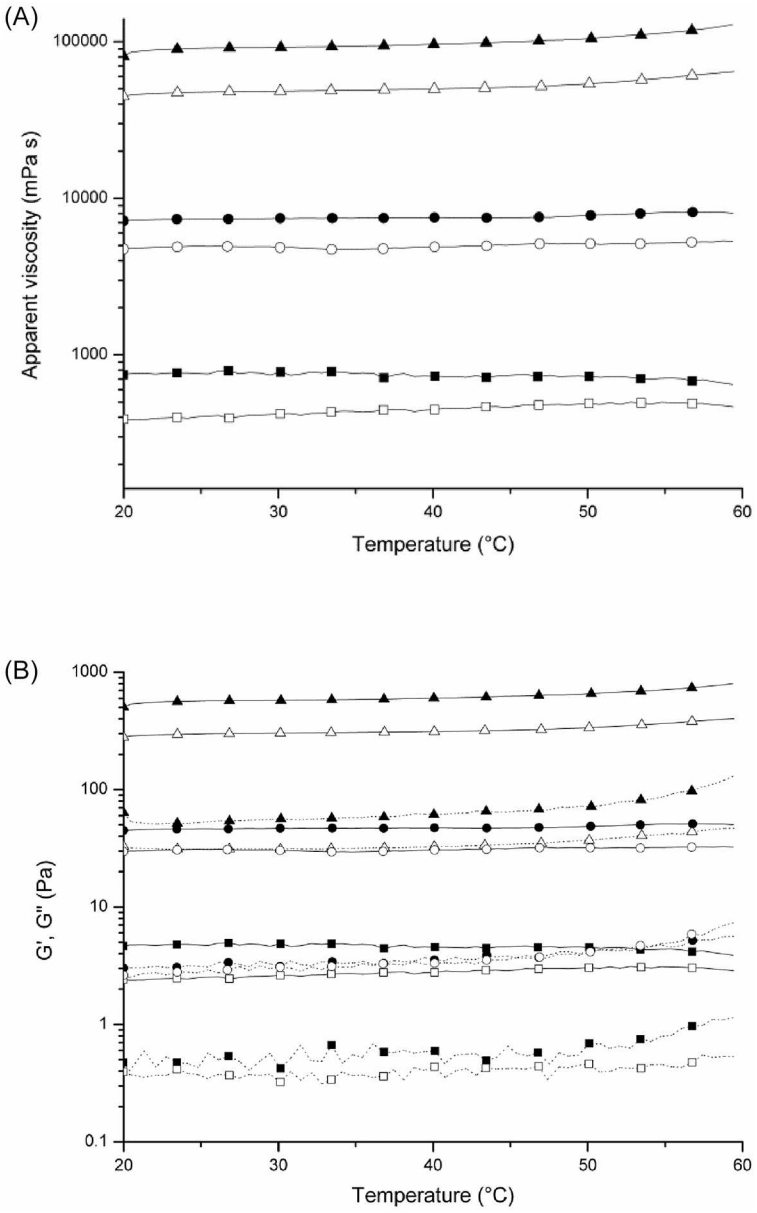

Fig 3. Temperature dependency of: (A) apparent viscosity and (B) G' (continuous line) and G" (dotted line) modulus of the aqueous dispersions of curdlan. Pre-gelled commercial curdlan (empty symbol) and curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 recovered by the pre-gelation method (full symbol) at (■) 20, (●) 40 and (▲) 80 g L^{-1}.

doi:10.1371/journal.pone.0171469.g003

because the commercial curdlan did not act as a thickener with the methodology employed for preparation of the dispersions.

Rheological characteristics and gel strength of curdlans. Thermal scanning rheological measurements were made to evaluate both the apparent viscosity and the gelation behavior of curdlan dispersions. The temperature dependence of apparent viscosity and of G' and G" modulus for aqueous dispersions of pre-gelled commercial curdlan and of the curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) at 20, 40 and 80 g L^{-1} are shown in Fig 3A and 3B.

The curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) exhibited considerably higher viscosity than pre-gelled commercial curdlan (Fig 3A). For example, at 20˚C, the apparent viscosity of curdlan produced by the microorganism was almost 100% higher than pre-gelled commercial curdlan at 20 and 80 g L^{-1}. Equally, G' and G" modulus (Fig 3B) were also higher for the curdlan produced by the microorganism, revealing the highest thickening potential of this curdlan when compared to the pre-gelled commercial one.

Both the apparent viscosity and the G' module of both curdlans exhibited a different behavior as a function of temperature for each concentration employed. At 20 g L^{-1}, both parameters increased with temperature for pre-gelled comercial curdlan, while for curdlan produced by the microorganism they decreased. This behavior is related to the swelling of curdlan because of the breakage of hydrogen bonds during heating. The difference between the curdlanas is because, for pre-gelled commercial curdlan, inter-molecular entanglements between the particles that were swollen formed pseudo-links, which contributed to the little increase in G'. This phenomenon did not occur for curdlan produced by the microorganism. However, for higher concentrations (40 and 80 g L^{-1}), the decrease in the viscosity and in G' no longer occurred with temperature for any sample, because the high concentration favors the inter-molecular entanglements between the particles, which contribute to the increase of both parameters. Additionally, the increase in G' and G" modulus and in apparent viscosity of curdlan dispersions at about 50–55˚C, especially at 80 g L^{-1}, suggests the beginning of the formation of the thermo-irreversible gels due to hydrophobic interactions.

Jin et al. [21] stated that G' decreased until 50˚C for curdlan suspensions at 20 g L^{-1}, which is related to the swelling of curdlan because of the breakage of hydrogen bonds, as observed for curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) in this study. However, Funami et al. [28] stated only increasing in G' parameter for dispersions of curdlans at 20, 40 and 100 g L^{-1} with increasing temperature. The authors attributed this behavior to inter-molecular entanglements between the particles that were swollen forming pseudo-links, being this result similar to the one obtained for pre-gelled comercial curdlan in all concentrations evaluated and for curdlan produced by the microorganism for concentrations from 40 to 80 g L^{-1} in this work.

The strength data of suspensions and gels of the pre-gelled commercial curdlan and the curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) at 20 g L^{-1} are presented in Table 2. According to the strength values of the suspensions and gels, the curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) has a better thickening capacity than the pre-gelled curdlan, as the suspension of the same without heat treatment was approximately 10% stronger. This result agrees with the results of rheological analysis. However, the gelling capacity of the pre-gelled commercial curdlan is considerably higher.

Table 2. Strength (×10^{-3} N) of pre-gelled commercial curdlan and the curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) samples after undergoing different heat treatments. Values indicate mean ± standard-deviation.

Heat treatment of the dispersion in a concentration of 20 g L^{-1}	Strength (× 10^{-3} N)	
	Pre-gelled comercial curdlan	Curdlan from microorganism (pre-gelation method)
Without heat treatment	69 ± 2^{d}	76 ± 2^{c}
Low-set gel (61˚C/1 h)	79 ± 1^{c}	77 ± 2^{c}
High-set gel (95˚C/1 h)	96.8 ± 0.8^{a}	83 ± 1^{b}

$^{a–d}$ Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0171469.t002

The strength of the low-set gel of the pre-gelled commercial curdlan was around 15% greater than that of the suspension without heat treatment, and statistically equal to that of the low-set gel of the curdlan produced by the microorganism. The high-set gel of the pre-gelled commercial curdlan had strength 40% greater than the suspension without heat treatment, and 17% greater than the high-set gel produced by the microorganism.

When an aqueous dispersion of curdlan is heated around 55˚C, the low-set gel formed is maintained by intramolecular hydrogen bonds and the curdlan chains adopt a predominantly single helix conformation. But when heated above 80˚C, the high-set gel formed is maintained by intermolecular hydrophobic interactions and the curdlan chains adopt a predominantly triple helix conformation [14,29], forming an organized and rigid gel configuration. As such, the increase in the strength of the high-set curdlan gel (95˚C/1 h) is due to the greater presence of the triple helix conformation.

The fact that the curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) have formed a considerably weaker gel than the pre-gelled commercial curdlan, as well as the fact that it does not exhibit the same behavior that pre-gelled commercial sample in rheological analysis at low concentrations (increase of G' and apparent viscosity with temperature), are probably due to a difference of molecular weight/degree of polymerization of the polymers. A variety of physical properties of β-(1→3)-glucans, including gel strength (or gel-forming ability) is related to the molecular weight/degree of polymerization of the biopolymer. The higher the degree of polymerization of the polysaccharide, the greater is its gel forming ability with heating [30,31].

Nakanishi et al. [32] studied the formation of a complex of curdlan with aniline blue dye and noted a relation between the rate of interaction of the polymer with the dye and the concentration, degree of polymerization, and gel-forming ability of the polymer. The variation in absorbance at 590 nm is proportional to the concentration of curdlan and to its gel-forming ability (and consequently to its degree of polymerization). S1 Appendix contains the methodology used by the authors described to evaluate curdlan interaction with aniline blue dye and the results of the relationship between absorbance variation and concentration of the pre-gelled commercial curdlan and curdlan produced by the microorganism. By comparing the results of this study to those obtained by Nakanishi et al. [32] and using the relation obtained by these authors between absorbance variation and degree of polymerization, it is concluded that the degree of polymerization of the pre-gelled commercial curdlan is about 45% higher than of the curdlan produced by the microorganism, which explains the lowest gel strength and the decrease in apparent viscosity and G' in low concentration dispersions of the polymer.

Water Holding Capacity (WHC), Oil Holding Capacity (OHC) and Water Solubility Index (WSI). Determining the technological properties of polysaccharides is of great importance when predicting their possible industrial applications. The values for the properties of water solubility index (WSI) water holding capacity (WHC) and oil holding capacity (OHC) of the curdlan samples are described in Table 3.

Table 3. Water Holding Capacity (WHC), Oil Holding Capacity (OHC) and Water Solubility Index (WSI) (g g^{-1}) of the commercial, pre-gelled commercial curdlans and those produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method). Values indicate mean ± standard-deviation.

Curdlan sample	WHC	OHC	WSI
Commercial	4.6 ± 0.4[a]	0.62 ± 0.08[c]	0.006 ± 0.002[a]
Commercial pre-gelled	2.20 ± 0.08[c]	4.4 ± 0.2[b]	0.00923 ± 7E-5[a]
Microbial (pre-gelation method)	3.6 ± 0.3[b]	8.7 ± 0.1[a]	0.0068 ± 0.003[a]

[a–c] Means in the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0171469.t003

The three curdlans had very low and statistically equal WSIs, which was expected as curdlan is insoluble in water. Despite this, however, the curdlans presented some water absorption, with the commercial curdlan achieving the highest value, followed by the curdlan produced by the microorganism and the pre-gelled commercial curdlan. Seguchi and Kusunose [33] found water absorption rates for curdlan between 5.244 g g^{-1} and 7.724 g g^{-1}.

Compared to other polysaccharides employed in food industry as gums, curdlan has low water holding capacity; the guar and xanthan gums have a WHC of 25.77 g g^{-1} and 27.33 g g^{-1}, respectively [34]. However, both are soluble in water. The low solubility and water holding capacity of curdlans is explained by the existence of a large amount of intra/intermolecular hydrogen bonds within the polymer. This also explains the fact that commercial curdlan has a higher water absorption index than the other types as the recovery by the pre-gelation process employed in the latter two types favors the formation of large quantities of hydrogen bonds in the polymer. Thus, the polysaccharide interacts more strongly with itself than with water [21,34].

The three evaluated curdlans also differed with respect to oil holding capacity. With the exception of the commercial curdlan, they presented greater OHC values than WHC, indicating that the samples have a higher lipolytic than hydrophilic capacity. Oil absorption values greater than three make curdlan a potentially useful ingredient in structural interactions in foods, especially in aroma retention, improved palatability and maintenance of the stability of the product during storage [11]. This result justifies the use of curdlan as a fat replacer or mimicker of fat in the food industry [9,35].

Application of curdlan in yogurt

The main characteristics that define the quality of yogurts are its texture and propensity for serum separation (syneresis). Typically, polysaccharides such as xanthan, guar, gellan, pectin, carrageenan are used to give the product a firmer texture, increase its stability and hence make it more acceptable to the consumer [3,20]. Table 4 displays the parameters of texture and syneresis after 28 days of storage of yogurt samples with and without curdlan, submitted or not to heat treatment with the aim of gelling the curdlan in the milk prior to the fermentation process.

Table 4. Texture parameters and syneresis of yogurts with and without curdlan and submitted or not to heat treatment. Values indicate mean ± standard-deviation.

Sample	Firmness (× 10^{-3} N)	Cohesiveness	Adhesiveness (N × mm)	Springiness (mm)	Gumminess (N)	Chewiness (N)	Syneresis (%)
A1	77 ± 2^{c}	0.77 ± 0.02^{a}	0.02 ± 0.01^{c}	1.13 ± 0.01^{ab}	5.9 ± 0.3^{c}	6.7 ± 0.4^{bcd}	49.3 ± 0.8^{a}
A2	84 ± 8^{c}	0.71 ± 0.07^{ab}	0.04 ± 0.03^{c}	1.00 ± 0.04^{bc}	5.9 ± 0.1^{c}	5.9 ± 0.3^{cde}	48.7 ± 0.4^{a}
B1	83 ± 8^{c}	0.66 ± 0.02^{bc}	0.08 ± 0.03^{c}	0.94 ± 0.04^{c}	5.5 ± 0.7^{c}	5.1 ± 0.7^{e}	45.6 ± 0.9^{b}
B2	129 ± 7^{b}	0.47 ± 0.04^{d}	0.4 ± 0.1^{b}	0.97 ± 0.05^{bc}	6.1 ± 0.2^{bc}	5.9 ± 0.4^{cde}	38.2 ± 0.3^{c}
C1	94 ± 9^{c}	0.65 ± 0.02^{bc}	0.16 ± 0.04^{c}	1.2 ± 0.1^{a}	6.0 ± 0.6^{bc}	7.1 ± 0.3^{bc}	26.4 ± 0.8^{d}
C2	125.1 ± 0.6^{b}	0.58 ± 0.02^{c}	0.58 ± 0.02^{ab}	1.01 ± 0.01^{bc}	7.2 ± 0.2^{b}	7.3 ± 0.2^{b}	29.2 ± 0.7^{d}
D1	128 ± 6^{b}	0.46 ± 0.02^{d}	0.68 ± 0.04^{a}	0.96 ± 0.03^{c}	5.8 ± 0.3^{c}	5.6 ± 0.5^{de}	28.8 ± 0.2^{d}
D2	160 ± 7^{a}	0.59 ± 0.01^{c}	0.5 ± 0.1^{ab}	0.99 ± 0.06^{bc}	9.5 ± 0.6^{a}	9.3 ± 0.3^{a}	35.8 ± 0.9^{c}

$^{a-e}$ Means within the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Yogurts: A1) without curdlan or heat treatment; A2) without curdlan and with heat treatment; B1) with commercial curdlan and without heat treatment; B2) with commercial curdlan and heat treatment; C1) with pre-gelled commercial curdlan and without heat treatment; C2) with pre-gelled commercial curdlan and heat treatment; D1) with curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) without heat treatment; D2) with curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) with heat treatment.

doi:10.1371/journal.pone.0171469.t004

It can be seen that the use of curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) produced significant alterations in the parameters of firmness, cohesiveness and adhesiveness of the yogurt, even without being subjected to heat treatment. This is due to the thickening potential of the material. Heat treatment caused major changes in these parameters, both for the yogurts with commercial curdlan and pre-gelled commercial curdlan, although the highest values for firmness, stickiness, gumminess and chewiness were obtained for the yogurt with curdlan produced by the microorganism. Heat treatment promotes the formation of a firm gel due to the intermolecular hydrophobic interactions that structure the system, making the yogurt more consistent, resulting in greater difficulty to separate in the mouth and making it denser during chewing, which therefore takes longer.

It was notable that the pre-gelled commercial curdlan formed a stronger gel in water, but had less effect on the texture parameters than that produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) when applied to the yogurt, which was not expected. Thus, it is likely that the latter has a greater ability to interact with water and the other components of milk, especially proteins, more efficiently stiffening the protein network formed after the fermentation process. As described before, the curdlan produced by the microorganism has the capacity to absorb 64% more water and 98% more oil than the pre-gelled commercial curdlan, with these parameters being important for products such as yogurts prepared with whole milk (3% fat).

The use of commercial curdlan without heat treatment did not produce many changes in the texture parameters or in the syneresis of the yogurts. This is because it was not effectively homogenized in the milk as it dispersed with greater difficulty, interfering little in the formation of the protein network during fermentation.

It was found that syneresis was reduced for the yogurt samples with curdlan, particularly the pre-gelled commercial variety and the curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method). The latter displayed higher syneresis after the first 28 days of storage because its gel is less stable than the pre-gelled commercial curdlan. As such, the pre-gelled commercial curdlan demonstrated a greater ability to preserve the structure of the yogurt, avoiding rearrangements in the casein network due to the time of storage and avoiding whey expulsion. Martinez et al. [3] produced yogurts with added curdlan and achieved a significant reduction in the syneresis of the products compared to the control (without curdlan). The authors found that the high stability obtained by the yogurt with curdlan is attributed to interactions between the curdlan molecules, either between one another or with the proteins, which cause the formation of a more compact and continuous three-dimensional protein network, which effectively entraps the protein molecules and water in its structure.

Importantly, there was no difference between any of the texture parameters and the syneresis of yogurts without curdlan submitted or not to heat treatment. This was expected as the aim of treatment was to gel the curdlan and, therefore, the A2 sample was not submitted to rheological analysis. Fig 4 shows the flow curves (Fig 4A and 4B) and the viscosity curves (Fig 4C and 4D) for the yogurts produced with curdlan with and without heat treatment of the milk prior to fermentation.

All the yogurts behaved as non-Newtonian pseudo-plastic fluids, as their viscosity decreased due to the shear rate applied. It can be seen that the samples subjected to heat treatment of the milk had higher viscosity values across the entire shear rate analyzed due to the gelling of the curdlan. However, the decrease in viscosity versus the shear rate in the return data was much more significant for these samples. All the samples also exhibited thixotropic characteristics, due to the difference of tension and viscosity between the ascending and descending shear rate curves. The hysteresis observed is due to the breakdown of the gel

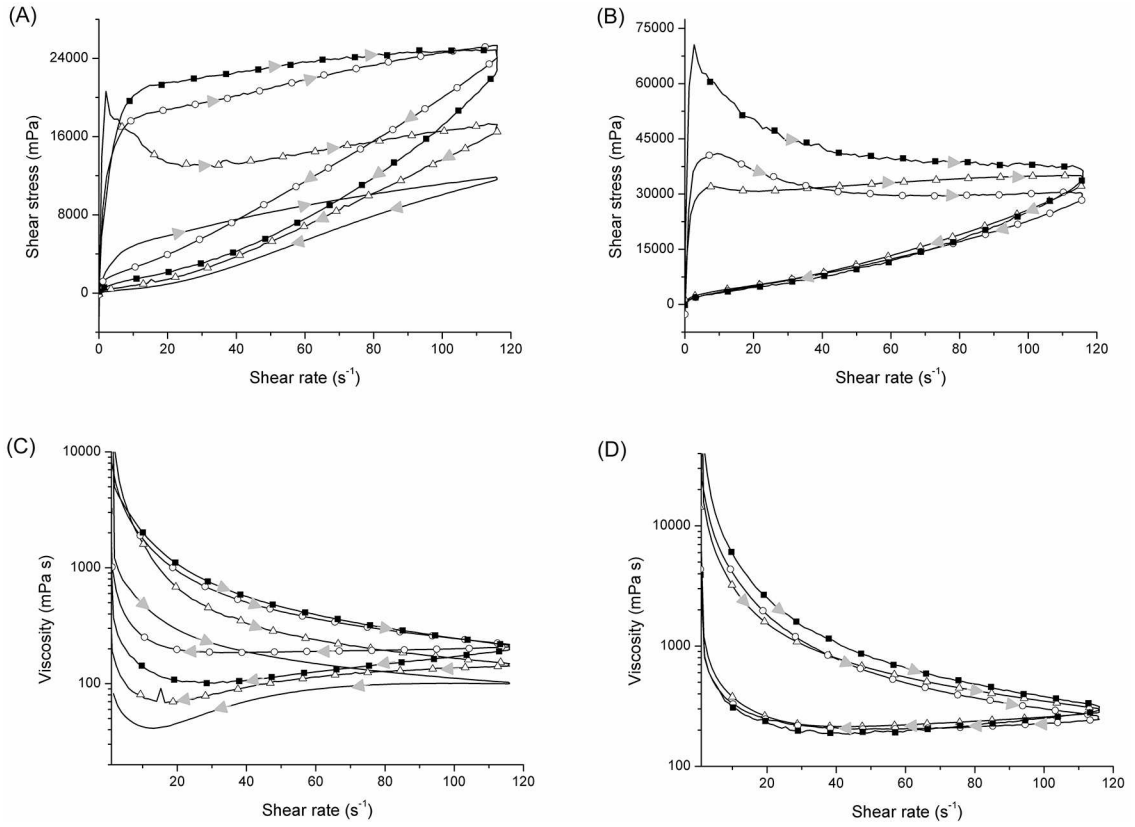

Fig 4. Flow curves of yogurt samples without heat treatment (A) with heat treatment (B); viscosity curves of yogurt samples without heat treatment (C) and with heat treatment (D). Yogurt without curdlan (–), with commercial curdlan (Δ), with pre-gelled commercial curdlan (○) and with curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) (■). The direction of the gray arrows indicates the ascendant and descendant curves.

doi:10.1371/journal.pone.0171469.g004

structure formed by coagulation of the protein during fermentation, in the presence and absence of curdlan. Hysteresis is measured as the area between the ascending and descending curves, where the greater the area (when positive), the greater the thixotropic effect. Hysteresis, together with the other rheological parameters, are described in Table 5.

Table 5. Rheological parameters of yogurt samples with and without curdlan and submitted or not to heat treatment. Hysteresis, consistency index (K), flow behavior index (n) and yield stress (τ_0). Values indicate mean ± standard-deviation.

Sample	*K (mPa s^n)*	*n*	*τ_0 (Pa)*	*Hysteresis (Pa s^{-1})*
A	98 ± 3^{d}	0.997 ± 0.006^{a}	2 ± 1^{e}	362 ± 43^{e}
B1	223 ± 26^{d}	0.938 ± 0.001^{b}	12 ± 1^{d}	1088 ± 75^{d}
B2	1685 ± 18^{a}	0.662 ± 0.004^{e}	30 ± 4^{c}	2241 ± 39^{b}
C1	922 ± 35^{b}	0.73 ± 0.04^{d}	12 ± 1^{d}	1134 ± 92^{d}
C2	—*	—*	36 ± 2^{b}	2200 ± 49^{b}
D1	467 ± 56^{c}	0.87 ± 0.02^{c}	10.9 ± 0.5^{d}	1623 ± 36^{c}
D2	—*	—*	75 ± 3^{a}	3461 ± 10^{a}

[a–e] Means within the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

*It was not possible to calculate the parameters by the Oswald de Waele model.

doi:10.1371/journal.pone.0171469.t005

In Fig 4B, the heat-treated samples of yogurt with pre-gelled commercial curdlan and curdlan produced by the microorganism displayed a peak in shear strain at the beginning of the growth of the deformation rate. This peak is related to the lack of homogeneity of the product, because during the gelling process of curdlan small lumps are formed, which are not necessarily noticeable to the palate, but which alter rheology. With the presence of these lumps, the tension needed for a small deformation is high, and as a result, it was not possible to calculate the K and n parameters for samples C2 and D2 by the Oswald de Waele model.

From the data of Table 5 it is clear that the higher viscosity samples in Fig 4C and 4D, which are those subjected to heat treatment, had more evident thixotropic characteristics (higher hysteresis), as they underwent a major reduction in apparent viscosity with time, in a rate constant with shearing. This is due to the breakdown of the organized yogurt structure when submitted to a determined strain. After remained stationary, the samples returned to their original state more quickly, but with lower viscosity during the return, being this recovery dependent on time. Therefore, the gel formed with heat treatment presented low stability, in particular the gel of the curdlan produced by the microorganism, corroborating with the syneresis data of the yogurt.

Curiously, it was observed that of the samples without heat treatment, that which had the greater viscosity in the increasing shear rate curve did not present higher K and n values, or in other words, the sample with pre-gelled commercial curdlan was greater than the curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) in the consistency index and flow behavior. This was due to the sharp drop in viscosity in the decreasing curve of the latter, revealing again the lower stability of the gel formed.

The results of the yield strength parameter (τ_0) were consistent with the firmness of the yogurt, as the yogurt with curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 with thermic treatment withstood the greatest tension before suffering deformation, followed by the yogurts with pre-gelled commercial curdlan and commercial curdlan with heat treatment. It is important to note that yield stress refers to the maximum stress that the material can bear before yielding (in the elastic deformation regime) and that the greatest τ_0 values are those of the firmer samples. These samples displayed a minimum stress for deformation that was more difficult to break due to the increased organization and stiffening of the protein network formed, originating from the intermolecular hydrophobic interactions of the curdlan with heating.

Conclusions

The characteristics of dispersion, gelation and the rheological properties of curdlan depended greatly on the recovery methods employed after its production, as the curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) and the commercial pre-gelled curdlan dispersed better in water, acted as thickeners and formed more homogeneous gels. The use of the pre-gelation method exerts a major influence on the size of the particles obtained and in the presence of NaCl, which contributes significantly to the dispersion and gelation characteristics described. However, the recovery method employed did not influence the structure of the polysaccharide. Even the pre-gelled commercial curdlans and those produced by the microorganism through the pre-gelation method had significantly different technological properties. The curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) showed a greater thickening and water and oil holding capacity than the pre-gelled commercial curdlan, while the latter demonstrated a considerably greater gelling capacity, that is related to degree of polymerization of the polysaccharide. As a consequence, although both types of curdlan increased firmness, viscosity and reduced the syneresis of yogurts, the curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 (pre-gelation method) caused a greater increase in

the parameters, but also showed a less stable gel formation than the pre-gelled commercial curdlan. The commercial curdlan did not influence the firmness and syneresis of yogurts tested. Nevertheless, the curdlans recovered by the pre-gelation method provided rigid gels with a stable structure, allowing improvements in the texture of a range of products, and therefore, has great potential for application in the food industry.

Supporting information

S1 Appendix. Curdlan interaction with aniline blue dye.
(DOC)

Acknowledgments

The authors are thankful to the Brazilian Agencies CAPES, CNPq and Fundação Araucária for their financial support of this work.

Author Contributions

Conceptualization: CSM GM.

Data curation: CSM TTS VCF LNK SBSF.

Formal analysis: CSM VCF MLB.

Funding acquisition: GM MLB.

Investigation: CSM GM.

Methodology: CSM MLB GM.

Project administration: GM.

Resources: MLB GM.

Supervision: CSM GM.

Validation: CSM GM.

Visualization: CSM GM.

Writing – original draft: CSM GM.

Writing – review & editing: MLB GM.

References

1. Zhang R, Edgar K. Properties, chemistry and applications of the bioactive polysaccharide curdlan. Biomacromolecules. 2014; 15: 1079–1096. doi: 10.1021/bm500038g PMID: 24552241
2. Donot F, Fontana A, Baccou JC, Schorr-Galindo S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohydr Polym. 2012; 87: 951–962.
3. Martinez CO, Ruiz SP, Fenelon VC, Morais GR, Baesso ML, Matioli G. Characterization of curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 cells immobilized in loofa sponge matrix, and application of this biopolymer in the development of functional yogurt. J Sci Food Agric. 2016; 96: 2410–2417. doi: 10.1002/jsfa.7357 PMID: 26219432
4. Triveni R, Shamala TR, Rastogi NK. Optimised production and utilization of exopolysaccharide from *Agrobacterium radiobacter*. Process Biochem. 2001; 36: 787–795.
5. Lee I, Seo WT, Kim GJ, Kim MK, Park CS, Park YH. Production of curdlan using sucrose or sugar cane molasses by two-step fed-bactch cultivation of *Agrobacterium* species. J Ind Microbiol Biotechnol. 1997; 18: 255–259.

6. Wu C, Yuan C, Chen S, Liu D, Ye X, Hu Y. The effect of curdlan on the rheological properties of restructured ribbonfish (*Trichiurus* spp.) meat gel. Food Chem. 2015; 179: 222–231. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.125 PMID: 25722158
7. Li J, Zhu L, Lu G, Zhan X, Lin C, Zheng Z. Curdlan β-1,3-glucooligosaccharides induce the defense responses against *Phytophthora infestans* infection of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. McCain G1) leaf cells. PLoS ONE. 2014; 9: e97197. doi: 10.1371/journal.pone.0097197 PMID: 24816730
8. Wang M, Chen C, Sun G, Wang W, Fang H. Effects of curdlan on the color, syneresis, cooking qualities and textural properties of potato starch noodles. Starke. 2010; 62: 429–434.
9. Chen C, Wang R, Sun G, Fang H, Ma D, Yi S. Effects of high pressure level and holding time on properties of duck muscle gels containing 1% curdlan. Innov Food Sci Emerg Technol. 2010; 11: 538–542.
10. Funami T, Nishinari K. Gelling characteristics of curdlan aqueous dispersions in the presence of salts. Food Hydrocoll. 2007; 21: 59–65.
11. Chel-Guerrero L, Pérez-Flores V, Betancur-Ancona D, Dávila-Ortiz G. Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. J Agric Food Chem. 2002; 50: 584–591. PMID: 11804533
12. Martinez CO, Ruiz SP, Nogueira MT, Bona E, Portilho M, Matioli G. Effective immobilization of *Agrobacterium* sp. IFO 13140 cells in loofa sponge for curdlan biosynthesis. Molecules. 2015; 20: 7957–7973. doi: 10.3390/molecules20057957 PMID: 25946555
13. Shin H, Liu L, Kim M, Park Y, Chen R. Metabolic engineering of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 for curdlan production. J Ind Microbiol Biotechnol. 2016; 43: 1323–1331.
14. Gagnon M, Lafleur M. From curdlan powder to the triple helix gel structure: an attenuated total reflection-infrared study of the gelation process. Appl Spectrosc. 2007; 61: 374–378. doi: 10.1366/000370207780466136 PMID: 17456255
15. Fenelon VC, Aguiar MFA, Miyoshi JH, Martinez CO, Matioli G. Ultrafiltration system for cyclodextrin production in repetitive batches by CGTase from *Bacillus firmus* strain 37. Bioprocess Biosyst Eng. 2015; 38: 1291–1301. doi: 10.1007/s00449-015-1369-8 PMID: 25656697
16. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Reber PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. 1956; 28: 350–356.
17. AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International (method 926.12). 1996.
18. AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International (method 985.35). 1995.
19. Hirashima M, Takaya T, Nishinari K. DSC and rheological studies on aqueous dispersions of curdlan. Thermochim Acta. 1997; 306: 109–114.
20. Keogh MK, O'Kennedy BT. Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids. J Food Sci. 1998; 63: 108–112.
21. Jin Y, Zhang H, Yin Y, Nishinari K. Comparison of curdlan and its carboxymethylated derivative by means of Rheology, DSC, and AFM. Carbohydr Res. 2006; 341: 90–99. doi: 10.1016/j.carres.2005.11.003 PMID: 16310757
22. Mikkelsen MS, Jespersen BM, Moller BL, Laerke HN, Larsen FH, Engelsen SB. Comparative spectroscopic and rheological studies on crude and purified soluble barley and oat β-glucan preparations. Food Res Int. 2010; 43: 2417–2424.
23. Novák M, Synytsya A, Gedeon O, Slepička P, Procházka V, Synytsya A, et al. Yeast β(1–3),(1–6)-D-glucan films: preparation and characterization of some structural and physical properties. Carbohydr Polym. 2012; 87: 2496–2504.
24. Marchessault RH, Deslandes Y. Finestructure of (1→3)-β-D-glucans: curdlan and paramylon. Carbohydr Res. 1979; 75: 231–242.
25. Che Man YB, Irwandi J, Abdullah WJW. Effect of different types of maltodextrin and drying methods on physico-chemical and sensory properties of encapsulated durian flavour. J Sci Food Agric. 1999; 79: 1075–1080.
26. Favaro-Trindade CS, Santana AS, Monterrey-Quintero ES, Trindade MA, Netto FM. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. Food Hydrocoll. 2010; 24: 336–340.
27. Spicer EJF, Goldenthal EI, Ikeda T. A toxicological assessment of curdlan. Food Chem Toxicol. 1999; 37: 455–479. PMID: 10418959
28. Funami T, Funami M, Yada H, Nakao Y. A rheological study on the effects of heating rate and dispersing method on the gelling characteristics of curdlan aqueous dispersions. Food Hydrocoll. 2000; 14: 509–518.
29. Zhang H, Nishinari K, Williams MAK, Foster TJ, Norton IT. A molecular description of the gelation mechanism of curdlan. Int J Biol Macromol. 2002; 30: 7–16. PMID: 11893389

30. Wu J, Zhan X, Liu H, Zheng Z. Enhanced production of curdlan by *Alcaligenes faecalis* by selective feeding with ammonia water during the cell growth phase of fermentation. Chin J Biotechnol. 2008; 24: 1035–1039.

31. Saitô H, Yokoi M, Yoshioka Y. Effect of hydration on conformational change or stabilization of (1→3)-β-D-glucans of various chain lengths in the solid state as studied by high-resolution solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. Macromolecules. 1989; 22: 3892–3898.

32. Nakanishi I, Kimura K, Kusui S, Yamazaki E. Complex formation of gel-forming bacterial (1→3)-β-D-glucans (curdlan-type polisaccharides) with dyes in aqueous solution. Carbohydr Res. 1974; 32: 47–52.

33. Seguchi M, Kusunose C. Lipophilization of curdlan granules by heat-treatment or chlorination. Food Hydrocoll. 2001; 15: 177–183.

34. Sciarini LS, Maldonado F, Ribotta PD, Pérez GT, León AE. Chemical composition and functional properties of *Gleditsia triacanthos* gum. Food Hydrocoll. 2009; 23: 306–313.

35. Chan TWD, Tang KY. Analysis of a bioactive β-(1→3) polyssacharide (curdlan) using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2003; 17: 887–896. doi: 10.1002/rcm.991 PMID: 12717760

CHINESE JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY
Volume 24, Issue 6, June 2008
Online English edition of the Chinese language journal

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect

Cite this article as: Chin J Biotech, 2008, 24(6), 1035í 1039.

RESEARCH PAPER

Enhanced Production of Curdlan by *Alcaligenes faecalis* by Selective Feeding with Ammonia Water during the Cell Growth Phase of Fermentation

Jianrong Wu, Xiaobei Zhan, Hui Liu, and Zhiyong Zheng

Key laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: A strategy of increasing nitrogen source to improve biomass production was adopted for curdlan production by *Alcaligenes faecalis* . In the batch fermentation of curdlan, a relatively higher NH_4Cl level of 3.6 g/L, with continuous glucose feeding, increased the cell density, and curdlan production was improved after 48 h of cultivation.. In addition, the feeding of ammonia water at an initial phase replaced NaOH solution to control pH at 7.0 and then NaOH solution was resumed to control pH at 5.6 for curdlan production after ammonium was consumed. As a result, biomass production and curdlan yield were both enhanced remarkably. However, excessive ammonium and high cell density also led to the decline of curdlan production and gel strength of the resulting product.

Keywords: curdlan; *Alcaligenes faecalis*; batch fermentation; ammonium

Introduction

Curdlan is a bacterial ù-(1,3) glucan, produced mostly by the *Agrobacterium* species or *Alcaligenes faecalis*, under nitrogen-limiting conditions[1]. There have been many reports about the biological activity of the bacterial glucan. Jagodzinski *et al*[2] reported that curdlan sulfate having a ù-(1,3)-glucan backbone showed high anti-AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) virus activity with low side effects. Mikio *et al*[3] disclosed that a curdlan derivative, modified by reaction with glycidol, developed excellent antiviral activity with extremely low toxicity. Evans *et al* [4] reported that both the low toxicity of curdlan and its marked anti-invasion activity on merozoites made it a potential auxiliary treatment for severe malaria. Thus, curdlan and its derivatives had a growing potential in the pharmaceutical industry. In addition to health benefits, curdlan also possessed heat-gelling and water-binding properties of interest to the food industry[5]. A firm gel could be formed after heating and cooling of the aqueous solution of curdlan. A low-set gel could be formed by heating curdlan at about 60°C; whereas, high-set gel could be formed by heating the curdlan solution at above 80°C.

A number of works have been performed by several groups to improve curdlan production. In 1982, Lawford *et al*[6] described a two-stage continuous process for curdlan production: the effluent from the first nitrogen-limited chemostat was introduced into a second larger constant volume fermenter with glucose feeding. In 1997, Lee *et al*[7] used sucrose or sugar cane molasses for curdlan production by the two-step, fed-batch cultivation of *Agrobacterium* sp., in which biomass was first produced, followed by curdlan production, which was stimulated by nitrogen limitation. Several groups studied the influence of uracil addition, agitation, residual phosphate, and pH control on the curdlan biosynthesis[8–11]. In 1999, Kim reported that higher intracellular levels of UMP under nitrogen-limited conditions could enhance the metabolic flux into curdlan

Received: January 15, 2008; Accepted: March 12, 2008
Supported by: the Natural Science Foundation of China (No. 20676055), National High Technology Research and Development Program of China (No. 2006AA02Z207).
Corresponding author: Xiaobei Zhan. Tel: +86-510-85918299; E-mail: xbzhan@jiangnan.edu.cn

Copyright © 2008, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences and Chinese Society for Microbiology. Published by Elsevier BV. All rights reserved.

synthesis[12]. Following that, West [13] found that the addition of uracil or cytosine to the culture of *Agrobacterium* sp. after 48 h of culture resulted in an elevation of curdlan production by 1.7 or 1.5 fold. Of late, Kim *et al*[14] developed a mutant strain of *Agrobacterium* sp., which produced a maximum of 76 g/L curdlan in a 300L stirred tank fermenter. Zheng *et al*[15] analyzed the metabolic structure of *Alcaligenes faecalis* and found that energy efficiency rather than the substrate supply was the major constraint for curdlan synthesis.

In the authors' previous work[16], they found that when the initial nitrogen source NH_4Cl increased from 1.1 g/L to 3.6 g/L, the curdlan production in *Alcaligenes faecalis* improved by 52%, and the final biomass tripled. Curdlan was insoluble in water and bound to the cell after excretion. Consequently it was very important to obtain high cell density, to achieve a higher curdlan production level. Cell growth required sufficient nitrogen sources, but biosynthesis of curdlan favored a nutrient-limited condition. A number of works had been performed to improve curdlan production by two-stage fermentation. **In this work, a new strategy of ammonia water-feeding was adopted to achieve high cell density with pH controlled at 7.0, and then the cultivation was switched to glucose-feeding with pH controlled at 5.6, with NaOH.**

1 Materials and methods

1.1 Bacteria and growth conditions

Alcaligenes faecalis WX-C12 was used as previously described by Wang *et al*[17]. The seed culture medium contained glucose (20 g/L), yeast extract (10 g/L), KH_2PO_4 (1.74 g/L), and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.49 g/L). The fermentation medium consisted of glucose (50 g/L), yeast extract (2.0 g/L), NH_4Cl (1.6 g/L), KH_2PO_4 (2.0 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5 g/L), and trace element solution (1 mL, *V*/*V*). The composition of the trace elements solution was $FeCl_3$ (1.0 g/L), $MnCl_2$ (1.0 g/L), $CaCl_2$ (1.0 g/L), and NaCl (1.0 g/L). Seed cultures were incubated in 250 mL shake flasks at 30°C and 200 rpm, for 24 h. Batch fermentation was conducted in a 15 L (9 L medium) batch fermenter (Biostat C10-3, B. Braun Co., Germany), and a strategy of pH control was adopted with dissolved oxygen (DO) maintained above 15%[17].

1.2 Analytical methods

The biomass and curdlan production were determined by the dry weight method. The sample was centrifuged at 8000 rpm for 30 min at 4°C. The supernatant was collected for measuring the residual glucose and NH_4Cl. The pellet containing cells and curdlan were resuspended in 0.50 M NaOH solution for 1 h, to solubilize the curdlan precipitate. The cells were pelleted by centrifugation at 8000 rpm for 30 min. Then, the curdlan in the supernatant was precipitated by addition of 2.0 M HCl. The cells and curdlan were washed and dried to a constant weight in an oven at 80°C. Residual glucose was measured by the dinitrosalicylic acid method[18]. NH_4Cl was assayed by the indophenol blue method[19].

1.3 Gel strength

Curdlan was extracted after treatment with 0.3 M NaOH, centrifugation, and neutralization with 1.0 M HCl. The slurry curdlan swollen with water was treated with ethanol, compressed, and freeze-dried. A powder sample of 2.0 g curdlan was dissolved in 100 mL water for 4 h. Then the curdlan suspension was mixed in a cooking mixer for 1 min. The solution was poured into a standard container and heated at 90°C in a water-bath. After cooling for 30 min at room temperature, the resulting gel was measured with a texture analyzer (TA-XT21, Stable Micro Systems Ltd, Surrey, England), having a 0.5 cm diameter stainless steel cylinder probe with a flat end.

2 Results and discussion

2.1 Batch curdlan fermentation by *Alcaligenes faecalis*

Curdlan was a typical second metabolite in the culture of *Alcaligenes faecalis*, as shown in Fig. 1. When the NH_4Cl was exhausted, the biomass stopped to increase and maintained a nongrowth state. Curdlan was produced right after NH_4Cl exhaustion and continued to increase until the glucose was consumed. The final biomass and curdlan were 2.5 g/L and 28.8 g/L, respectively. Curdlan production was typically a two-stage fermentation and the cells began to synthesize curdlan after nitrogen exhaustion. Therefore, an increase of ammonia in the cell growth phase might improve cell density and enhance curdlan production.

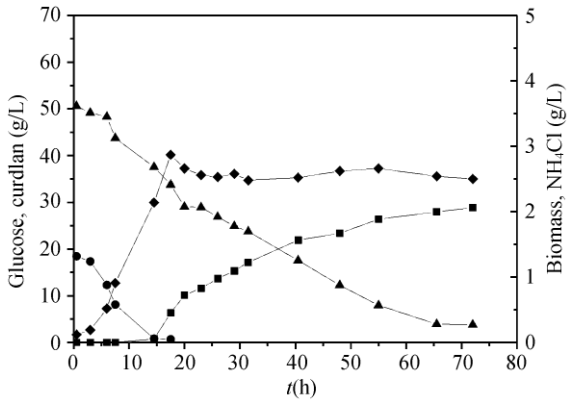

Fig. 1 Batch fermentation profile of curdlan by *Alcaligenes faecalis*

(Initial NH_4Cl 1.1 g/L; caption: Ÿ glucose, ƹbiomass, Ŷ curdlan, ƔNH_4Cl)

2.2 Effect of initial NH_4Cl on curdlan fermentation with glucose-feeding

To increase cell density that might enhance curdlan production, an initial nitrogen source of 1.6 g/L or 3.6 g/L NH_4Cl was tested with glucose-feeding (total 120 g) in the 15 L fermenter when glucose concentration was lower than 10 g/L. As shown in Fig. 2A, when the initial NH_4Cl was 3.6 g/L, the curdlan and biomass reached 39.6 g/L and 5.1 g/L at 120 h, respectively. In the case of 1.6 g/L NH_4Cl, the curdlan and biomass reached 30.9 and 3.0 g/L at 120 h, respectively. The substrate glucose was consumed rapidly and dropped to 9.6 g/L at 24 h in the culture with initial 3.6 g/L NH_4Cl. However, the consumption of glucose in the cultivation with 1.6 g/L NH_4Cl lagged and it dropped to 9.6 g/L at 48 h. **According to these results, a higher nitrogen source of 3.6 g/L NH_4Cl could better support cell growth and lead to more curdlan production at 48 h fermentation.** However, in their previous research[12], the authors found that when the initial NH_4Cl was higher than 3.6 g/L, residual ammonia would inhibit curdlan biosynthesis. Consequently, they adopted a strategy of ammonia feeding, to increase the cell density in the cell growth phase. In addition, although glucose feeding at one time would create a high C/N ratio condition, which might favor polysaccharide production, a sudden change in substrate concentration might also inhibit cell activity. Continuous glucose feeding or changing the rate of glucose feeding would be good choices.

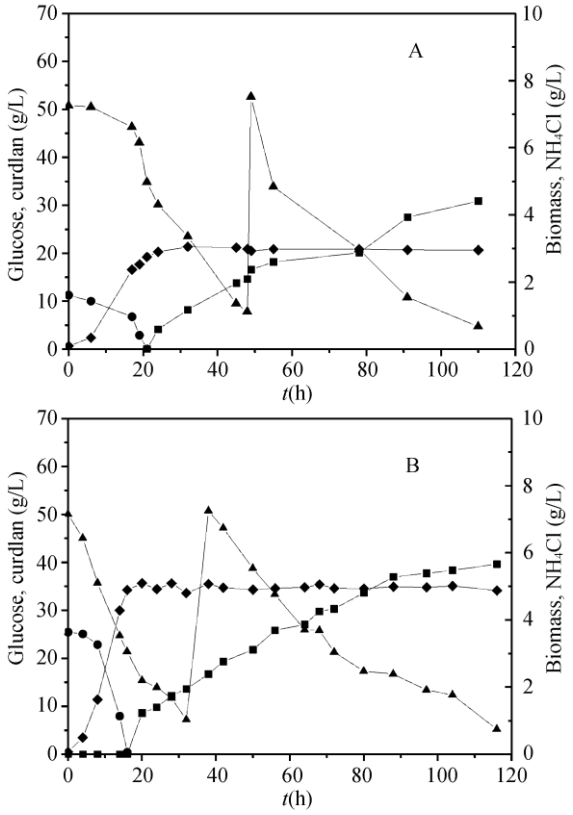

Fig. 2 Fed-batch fermentation profile of curdlan

(A, initial NH_4Cl 1.6g/L; B, initial NH_4Cl 3.6g/L. Caption: Ÿ glucose, ƹbiomass, Ŷ curdlan, Ɣ NH_4Cl)

2.3 Continued fed-batch fermentation of curdlan with pH control by ammonia water feeding

Curdlan is a water-insoluble exopolysaccharide binding to the cell. Consequently, to begin with, it is important to increase the cell density. Batch fermentation of curdlan requires a nitrogen-limited condition for the synthesis of the polysaccharide. However, biomass production needs more nitrogen source. Therefore, the authors adopted ammonia water feeding to replace NaOH solution for pH control at the initial cell growth phase, as ammonia could provide enough nitrogen sources for cell growth. After the cell growth phase, pH control was switched to 2.0 M NaOH solution again.

Considering the balance of C/N balance and cell growth at the first stage with ammonia water feeding, the initial NH_4Cl and glucose was lowered to 0.5 g/L and 30 g/L, respectively. Ammonia water was fed to control pH at 7.0 before 10 h, 14 h, 16 h, and 20 h of culture. Glucose feeding began when the glucose concentration was lower than 20 g/L. The glucose concentration was maintained at 15–20 g/L in the cell growth stage with glucose feeding. Subsequently, the glucose feeding rate was constant at 1.2 g/L/h.

As shown in Fig. 3, the cell density increased with ammonia water feeding and reached a maximum in the later exponential phase and was then maintained at a relatively constant value. The maximum cell density increased with

ammonia water feeding, reaching 7.5 g/L, 11.9 g/L, 15.2 g/L, and 16.4 g/L, for feeding times of 10 h, 14 h, 16 h, and 20 h, respectively. **However, the maximal curdlan production yield of 72 g/L was obtained in the case of ammonia water feeding time of 14 h, where the cultivation lasted 48 hours**. When the ammonia water feeding time was prolonged after 14 h, the cell density increased, but curdlan production and yield decreased (Tab. 1).

According to the authors' hypothesis, a higher cell density would lead to a high production of curdlan. However, when the cell density was more than 15.2 g/L, the curdlan production decreased and the gel strength of the produced curdlan reduced. Although addition of more ammonia water would increase cell density, ammonia would result in nitrogen abundance in the fermentation system, by mass balance. The physiological state of cells was important for cells to synthesize curdlan and the gel strength was related to the molecular weight of the biopolymer. High cell density caused broth viscosity and mass transfer problem that might lead to cell death or lysis, and these might increase the nitrogen source concentration in the medium in the form of proteins, peptides or amino acids. These nitrogen sources might stimulate cell activity and affect curdlan synthesis (such as transporting and chain elongation). The maintenance of cells would consume quite a lot of substrate (glucose), as shown from the profile of residual glucose and dissolved oxygen.

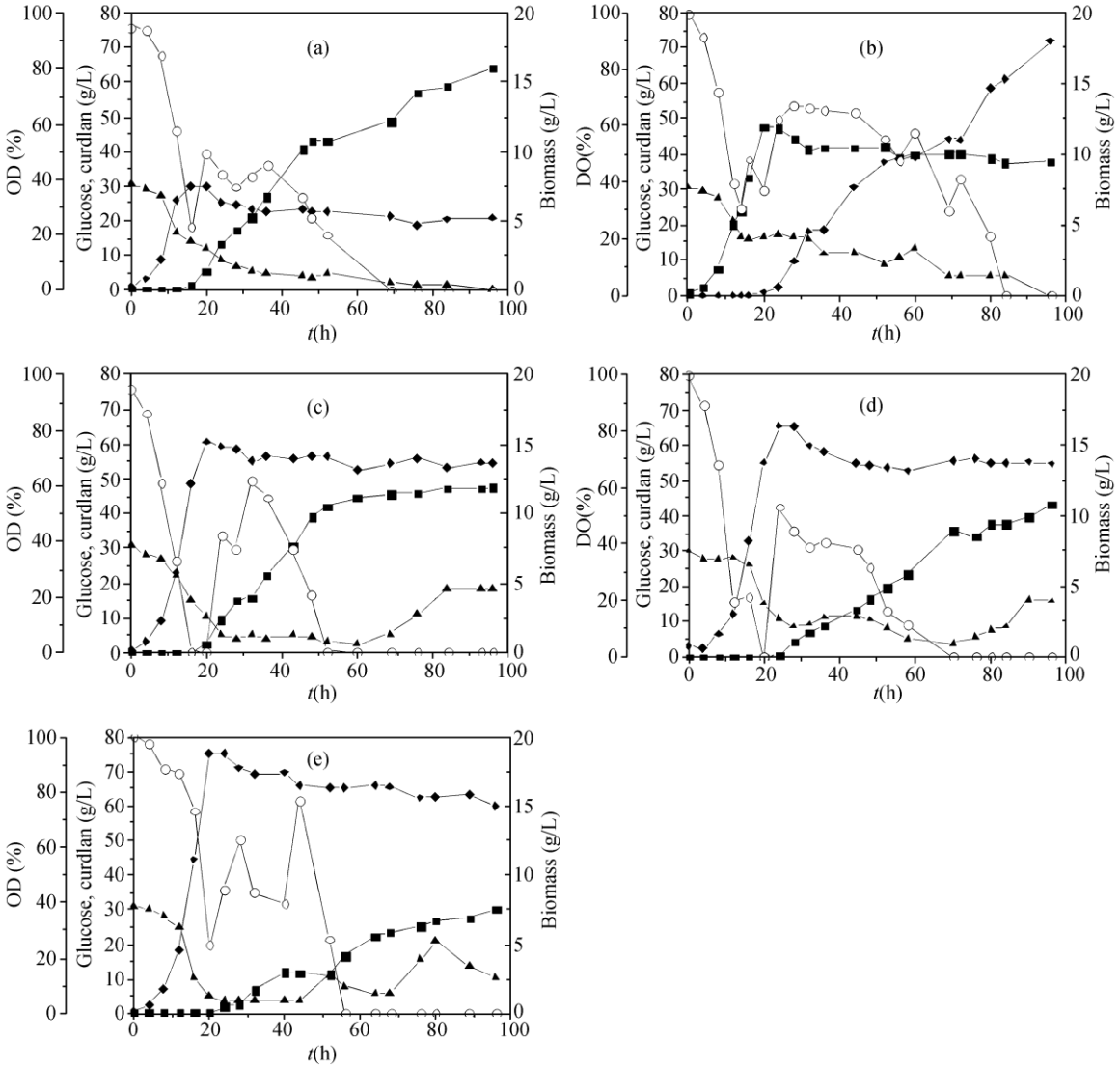

Fig. 3 Continuous fed-batch fermentation of curdlan with pH control by ammonia water feeding at initial cell growth phase

Ammonia water feeding of 10 h (a), 14h (b), 16 h (c), 20 h (d), 24h (e); caption: Ÿ, glucose; ƹ biomass; Ŷ, curdlan; ż, DO

Tab. 1 Kinetic parameters for fed-batch fermentation of curdlan with ammonia water feeding

Batch	Total glucose concentration (g/L)	Ammonia waterfeeding time (h)	Maximal cell density (g/L)	Final curdlan production (g/L)	Gel strength (g/cm^2)	Yield (%)
1	123.3	10	7.5 ± 0.37	64.3 ± 3.0	910 ± 42	52.1
2	118.9	14	11.9 ± 0.62	72.0 ± 3.6	840 ± 40	60.6
3	125.9	16	15.2 ± 0.72	47.6 ± 2.5	560 ± 26	37.8
4	118.9	20	16.4 ± 0.74	43.2 ± 2.1	580 ± 28	36.3
5	125.9	24	18.8 ± 0.81	30.2 ± 2.4	550 ± 32	24.0

[a]Ammonia water: 28%

3 Conclusions

For the fed-batch fermentation of curdlan, a higher initial NH_4Cl of 3.6 g/L increased both the cell density and curdlan production. Continuous glucose feeding further improved the curdlan production yield. Ammonia water feeding to control pH at the initial phase enhanced biomass production as well as curdlan production. The ammonia water feeding time of 14 h produced a maximal 11.9 g/L biomass at the cell growth phase and the final curdlan production nearly doubled as compared to non-ammonia feeding.

REFERENCES

[1] Harada T, Fujimori K, Hirose S, *et al*. Growth and glucan 10C3K production by a mutant of *Alcaligenes faecalis* var. myxogenes in defined medium. Agric Biol chem, 1966, 30: 764769.

[2] Jagodzinski PP, Wiaderkiewicz R, Kurzawski G, *et al*. Mechanism of the inhibitory effect of curdlan sulfate on HIV-1 infection *in vitro*. Virology, 1994, 202: 735745.

[3] Mikio K, Yoshiro O, Hirotomo O, *et al*. Water soluble ù-(1,3)-glucan derivative and antiviral agent containing the derivative. Japan patent, 07228601, 1995.

[4] Evans SG, Morrison D, Kaneko Y, *et al*. The effect of curdlan sulfate on development *in vitro* of *Plasmodium falciparum*. Trans R So Trop Med Hyg, 1998, 92: 8789.

[5] Sutherland IW, Ellwood DC. Microbial exopolysaccharide-industrial polymers of current and future potential. In: Bull AT, Ellwood DC, Ratledge C (eds.). Microbial Technology. London: Society for General Microbiology, 1979.

[6] Lawford HG, Phillips KR, Lawford GR. Two stage continuous process for the production of thermogelable curdlan-type exopolysaccharide. Biotechnol Lett, 1982, 4: 689694.

[7] Lee IY, Seo WT, Kim MK, *et al*. Production of curdlan using sucrose or sugar cane molasses by two-step fed-batch cultivation of *Agrobacterium* species. J Ind Microbiol Biotechnol, 1997, 18: 255259.

[8] Lee JH, Lee IY, Kim MK, *et al*. Optimal pH control of batch process for production of curdlan by *Agrobacterium* species. J Ind Microbiol Biotechnol, 1999, 23: 143148.

[9] Kim MK, Lee IY, Lee JH, *et al*. Residual phosphate concentration under nitrogen-limiting conditions regulates curdlan production in *Agrobacterium* species. J Ind Microbiol Biotechnol, 2000, 25: 180183.

[10] Lee JH, Lee IY. Optimization of uracil addition for curdlan (ù-1Í3-glucan) production by *Agrobacterium* sp. Biotechnol Lett, 2001, 23: 11311134.

[11] Lee IY, Kim MK, Lee JH, *et al*. Influence of agitation speed on production of curdlan by *Agrobacterium species*. Bioprocess Eng, 1999, 20: 283287.

[12] Kim MK, Lee IY, Ko JH, *et al*. Higher intracellular levels of uridinemonophosphate under nitrogen-limited conditions enhance metabolic flux of curdlan synthesis in *Agrobacterium species*. Biotechnol Bioeng, 1999, 62: 317323.

[13] West TP. Pyrimidine base supplementation effects curdlan production in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749. J Basic Microbiol, 2006, 46: 153157.

[14] Kim MK, Ryu KE, Choi WA, *et al*. Enhanced production of ù-(1,3)-D-glucan by a mutant strain of *Agrobacterium* species. Biochem Eng J, 2003, 16: 163168.

[15] Zheng ZY, Lee JW, Zhan XB, *et al*. Effect of metabolic structures and energy requirements on curdlan production by *Alcaligenes faecalis*. Biotechnol Bioproc Eng, 2007, 11: 395365.

[16] Sun YS, Wang L, Zhan XB, *et al*. Influence of nitrogen source NH_4Cl concentration on curdlan production in *Alcaligenes faecalis*. Chin J Biotech, 2005, 21: 328332.

[17] Wang L, Zhan XB, Zhu YH, *et al*. Influence of pH control on the production of curdlan by *Alcaligenes faecalis*. Chin J Biotech, 2002, 18: 634637.

[18] Sumner JB, Somers GF. Dinitrosalicylic method for glucose. In: Sumner JB, Somers GF (eds.). Laboratory Experiments in Biological Chemistry. New York: Academic Press, 1949.

[19] Harwood JE, Huysen DJ. Automated analysis of ammonia in water. Water Res, 1970, 4: 695704.

2.1. Розподіл захворювань за класами хвороб

(система Міністерства охорони здоров'я України)

(кількість уперше зареєстрованих випадків захворювань)

Назва класів хвороб відповідно до МКХ - 10	1995	2000	2005	2010	2015	2016	2017
Усі захворювання	**32547288**	**33470789**	**32911979**	**33080387**	**26789502**	**27361413**	**26614512**
у тому числі							
деякі інфекційні та паразитарні хвороби	1504398	1435560	1337473	1195494	939224	926130	940096
новоутворення	327429	382347	408140	417893	366403	368786	366231
хвороби крові, кровотворних органів та окремі порушення із залученням імунного механізму	191306	245859	237600	223251	177714	174719	164981
хвороби ендокринної системи, розладу харчування, порушення обміну речовин[1]	272032	596011	548923	511634	403127	393935	392504
розлади психіки та поведінки	267044	243369	227985	192969	136386	130980	127630
хвороби нервової системи	3037334	748186	753892	749701	652797	647482	636282
хвороби ока та придаткового апарату[2]	...	1540816	1614687	1645091	1398699	1371345	1365415
хвороби вуха та соскоподібного відростка[2]	...	1148489	1196650	1224552	1013140	1006972	1000978
хвороби системи кровообігу	1389586	2337905	2430179	2389663	1844066	1825933	1780595
хвороби органів дихання	15705055	14639445	13894183	14595007	11862012	12581733	12036631
хвороби органів травлення	1331894	1429371	1409575	1340808	1140961	1114567	1087155
хвороби шкіри та підшкірної клітковини	2143871	1996111	1936209	1920768	1566389	1563895	1564434
хвороби кістково-м'язової системи та сполучної тканини	1415832	1571308	1600477	1531941	1245523	1240696	1217879
хвороби сечостатевої системи	1544438	1938596	2184504	2138547	1779318	1760846	1723742
вагітність, пологи та післяпологовий період	515594	588082	661236	612461	430171	415191	381816
окремі стани, що виникають у перинатальному періоді	114637	127145	97744	75876	54986	52767	50193
уроджені аномалії (вади розвитку), деформації і хромосомні порушення	46968	61589	53417	52428	48356	47343	47160
симптоми, ознаки та відхилення від норми, що виявлені під час лабораторних та клінічних досліджень, не класифіковані в інших рубриках	93289	102148	55023	44791	32327	32649	33838
травми, отруєння та деякі інші наслідки дії зовнішніх причин	2646581	2338452	2264082	2217512	1697903	1705444	1696952

Тут і далі:

[1] Згідно з МКХ - 10 гіперплазія щитовидної залози I-II ступенів трактується як дифузний зоб I ступеня, і починаючи з 1999 р. обліковується у класі хвороб ендокринної системи, розладу харчування та порушення обміну речовин.

[2] Згідно з МКХ - 10, починаючи з 1999 р., з класу хвороб нервової системи і органів чуття вилучені і сформовані в окремі класи хвороби ока та його придаткового апарату і хвороби вуха та соскоподібного відростка.

2.2. Рівень захворюваності населення за класами хвороб

(система Міністерства охорони здоров'я України)

(кількість уперше зареєстрованих випадків захворювань на 100 000 населення)

Назва класів хвороб відповідно до МКХ - 10	1995	2000	2005	2010	2015	2016	2017
Усі захворювання	**63474**	**67966**	**70138**	**72401**	**62775**	**64375**	**62895**
у тому числі							
деякі інфекційні та паразитарні хвороби	2934	2915	2850	2617	2201	2179	2222
новоутворення	639	776	870	915	859	868	866
хвороби крові, кровотворних органів та окремі порушення із залученням імунного механізму	373	499	506	489	416	411	390
хвороби ендокринної системи, розладу харчування, порушення обміну речовин	531	1210	1170	1120	945	927	928
розлади психіки та поведінки	521	494	486	422	320	308	302
хвороби нервової системи	5923	1519	1607	1641	1530	1523	1504
хвороби ока та придаткового апарату	...	3129	3441	3601	3278	3227	3227
хвороби вуха та соскоподібного відростка	...	2332	2550	2680	2374	2369	2366
хвороби системи кровообігу	2710	4747	5179	5230	4321	4296	4208
хвороби органів дихання	30628	29727	29609	31943	27796	29602	28445
хвороби органів травлення	2597	2903	3004	2935	2674	2622	2569
хвороби шкіри та підшкірної клітковини	4181	4053	4126	4204	3671	3680	3697
хвороби кістково-м'язової системи та сполучної тканини	2761	3191	3411	3353	2919	2919	2878
хвороби сечостатевої системи	3012	3937	4655	4681	4169	4143	4074
вагітність, пологи та післяпологовий період[1]	4051	4621	5342	5233	4165	4074	3796
окремі стани, що виникають у перинатальному періоді[2]	23532	33188	23094	15137	12608	13129	13271
уроджені аномалії (вади розвитку), деформації і хромосомні порушення	92	125	114	115	113	111	111
симптоми, ознаки та відхилення від норми, що виявлені під час лабораторних та клінічних досліджень, не класифіковані в інших рубриках	182	207	117	98	76	77	80
травми, отруєння та деякі інші наслідки дії зовнішніх причин	5161	4749	4825	4853	3979	4013	4010

[1] На 100 000 жінок віком 15-49 років.

[2] На 100 000 дітей віком до 1 року.

Інфекційна захворюваність населення по Україні
згідно звіту по Ф.№ 1 за серпень і 12 місяців 2018–2019 рр.
(в абс.чис. та інтенсивних показниках на 100 тис. населення)

№, п/п	Найменування захворювань	Зареєстровано				Зростання або зниження в %, р., вип. (+/-)	Зареєстровано				Зростання або зниження в %, р., вип. (+/-)
		серпень 2018 р.		серпень 2019 р.			за 12 місяців 2018 р.		за 8 місяців 2019 р.		
		абс. чис	інт. пок	абс. чис	інт .пок		абс. чис	інт. пок	абс. чис	інт. пок	
1	Холера	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Черевний тиф	2	0,0	-	-	-2вип	4	0,01	1	0,0	-3вип
3	Паратиф А, В,С	-	-	-	-	-	1	0,0	1	0,0	рівень
4	Інші сальмон.інфекції	1230	2,9	1121	2,7	-8,8%	5196	12,3	5195	12,3	рівень
5	Шигельоз (дизентерія)	106	0,25	92	0,22	-13,2%	548	1,29	508	1,20	-7,3%
6	ГЕКи встан. етіології	5885	13,8	4713	11,1	-19,9%	37883	89,32	30066	71,2	-20,6%
7	в т.ч. кампілобактеріоз	16	0,04	13	0,03	-3вип	88	0,21	87	0,21	-1вип
8	єрсинія ентерокок.	12	0,03	17	0,04	-5вип	63	0,15	62	0,14	-1вип
9	рота вірусний ентер.	788	1,85	467	1,11	-40,7%	11551	27,2	8054	19,1	-30,3%
10	ГЕКи невстав. етіології	6137	14,5	4748	11,2	-22,6%	31293	73,8	27336	64,7	-12,6%
11	Сума ГКІ	12128	28,6	9553	22,6	-20,9%	86 865	164,4	57910	137,1	-16,6%
12	Туляремія	-	-	-	-	-	2	0,0	-	-	-2вип
13	Бруцельоз	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Лептоспіроз	46	0,10	57	0,14	+23,9%	124	0,29	148	0,35	+19,3%
15	Лістеріоз	-	-	-	-	-	2	0,0	-	-	-
16	Правець	5	0,01	2	0,0	-3вип	12	0,03	9	0,02	-3вип
17	Дифтерія	4	0,01	1	0,0	-3вип	7	0,02	2	0,0	-5вип
18	Кашлюк	180	0,42	280	0,66	+55,5%	1772	4,18	1449	3,43	-18,2%
19	Менінгококова інф-я	17	0,04	15	0,04	-2вип	174	0,41	202	0,48	+16,1%
20	Сифіліс	156	0,36	154	0,37	-1,2%	1579	3,7	1480	3,5	-6,3%
21	Гонококова інфекція	283	0,66	189	0,45	-33,2%	2629	6,20	2032	4,8	-22,7%
22	Хвороба Лайма	1250	2,94	800	1,89	-36,0%	3653	8,6	3083	7,3	-15,6%
23	Орнітоз	-	-	-	-	-	1	0,0	-	-	-1вип
24	Поліомієліт гостр.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Сказ	-	-	-	-	-	-	-	1	0,0	+1вип
26	Клішевий вір. енцефаліт	4	0,01	1	0,0	-3вип	5	0,01	1	0,0	-4вип
27	Вірусний менінгіт	66	0,15	103	0,24	+56,0%	174	0,41	271	0,64	+55,7%
28	Вірусні гарячки	-	-	1	0,0	+1вип	6	0,01	15	0,04	+9вип
29	В т.ч.гарячка Зах. Нілу	-	-	-	-	-	3	0,01	1	0,0	-2вип
30	Кір	2520	5,94	737	17,4	-3,4р	29465	69,47	56430	133,7	+1,9р
31	Краснуха	28	0,07	15	0,04	-13вип	186	0,44	115	0,27	-38,1%
32	Вірусний гепатит	884	2,08	1075	2,55	+21,6%	12 258	18,94	7552	17,8	-6%
33	В т.ч.гострий гепатит А	225	0,53	352	0,83	+56,4%	1866	4,40	1588	3,7	-14,9%
34	гострий гепатит В	110	0,25	107	0,24	-2,7%	944	2,23	862	2,0	-8,6%
35	гострий гепатит С	38	0,08	39	0,08	+1вип	314	0,74	323	0,77	+2,8%
36	хронічний вір. гепатит	501	1,18	565	1,34	+12,7%	4795	11,30	4706	11,1	-1,8%
37	в т.ч. хр.гепатит В	111	0,26	109	0,24	-1,8%	1018	2,40	1008	2,38	-1%
38	хр. гепатит С	379	0,89	452	1,07	+19,2%	3741	8,82	3661	8,6	-2,1%
39	Епідемічний паротит	23	0,05	30	0,07	+7вип	209	0,49	260	0,6	+24,4%
40	Інф. мононуклеоз	356	0,83	379	0,90	+6,4%	3633	8,57	3480	8,2	-4,2%
41	Малярія	4	0,01	7	0,02	+3вип	23	0,05	23	0,05	рівень
42	Педикульоз і фтиріоз	643	1,5	556	1,32	-13,5%	8787	20,72	7204	17,0	-18,2%
43	Короста	331	0,78	347	0,82	+4,8%	4032	9,51	3741	8,8	-7,2%
44	Гемофільна інфекція	3	0,01	5	0,01	+2вип	66	0,16	19	0,05	-71,2%
45	ГІВДШ	197355	465,3	186151	440,9	-5,6%	4062055	9576,96	3762532	8912,4	-7,3%
46	Грип	-	-	-	-	-	16933	39,9	15491	36,6	-8,5%

СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1703697 A1

(51)5 C 12 Q 3/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ ПРИ ГКНТ СССР

ВСЕСОЮЗНАЯ ПАТЕНТНО-ТЕХНИЧЕСКАЯ БИБЛИОТЕКА

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

(21) 4779882/13
(22) 09.01.90
(46) 07.01.92. Бюл. № 1
(71) Красноярский государственный университет
(72) Н.Н. Головнев, Е.Г. Лубина, Т.В. Повшедная и А.И. Кривушина
(53) 631.811.7(088.8)
(56) Мидгли Д., Торренс К. Потенциометрический анализ воды. М.: Мир, 1980, с. 363.

Kell D.V. The role of ion-selective electrodes in improving fermentation yields. Process Biochem., 1980, v. 15, № 1, p. 18–23.

2

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ АММОНИЙНОГО АЗОТА

(57) Изобретение относится к бродильным производствам, а именно к способам контроля параметров микробиологического синтеза. Цель изобретения – повышение точности способа. Измерение проводят с помощью ионоселективного электрода с жидкостной мембраной. Аликвоту анализируемого раствора добавляют к стандартному раствору хлорида аммония, содержащему хлорид лития в концентрации, обеспечивающей равенство ионных сил смешиваемых растворов. 2 табл.

Изобретение относится к бродильным производствам, а именно к способам контроля параметров микробиологического синтеза, и может найти применение при регулировании процессов культивирования бактерий, продуцентов антибиотиков, дрожжей, ферментов, аминокислот и т.д.

Известен способ определения содержания аммонийного азота в процессах культивирования микроорганизмов, включающий измерение парциального давления растворенного аммиака с помощью газочувствительного мембранного электрода после введения в пробу анализируемой жидкости щелочи до значения pH ≥ 12 [1].

Наиболее близким по технической сущности к изобретению является способ определения концентрации аммонийного азота в процессах культивирования микроорганизмов путем измерения содержания ионов аммония с помощью аммоний-селективного электрода с жидкостной мембраной [2]. Он прост в использовании и экспрессен.

Недостатком этого способа является мешающее влияние ионов щелочных металлов, особенно калия.

Целью изобретения является повышение точности способа.

Поставленная цель достигается тем, что согласно способу контроля концентрации аммонийного азота с помощью ионоселективного электрода с жидкостной мембраной на основе нейтрального носителя, осуществляют добавку аликвоты анализируемого раствора отфильтрованной культуральной жидкости к стандартному раствору хлорида аммония, содержащему хлорид лития в концентрации, обеспечивающей приблизительное равенство ионной силы смешиваемых растворов.

Введение анализируемого раствора в стандартный существенно расширяет диапазон соотношения концентраций ионов щелочных металлов к ионам аммония, пригодных для количественного определения ионов аммония (табл. 1 и 2). Опытным путем установлено, что самое меньшее влияние среди щелочных металлов на работу элект-

(19) SU (11) 1703697 A1

рохимического датчика оказывают ионы лития, которые и были выбраны в качестве катионной составляющей при создании ионной силы стандартного раствора. Значение ионной силы раствора культуральной жидкости оценивали на основании определения концентрации макрокомпонентов (Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+, Na^+) атомно-абсорбционным методом. Как правило, такое определение следует выполнить всего один раз, так как вариации в составе культуральной жидкости незначительны.

В качестве электрода сравнения использовали насыщенный хлорсеребрянный электрод с двойным солевым мостиком, заполненным 1 М раствором хлорида натрия. Это позволяет при необходимости длительно выдерживать электрод сравнения в анализируемом растворе, исключая мешающее влияние ионов калия (особенно при низких содержаниях ионов аммония).

Стандартные растворы хлорида аммония с добавками хлорида лития готовили из высушенного при 105–110°С хлорида аммония (чда) и моногидрата хлористого лития (чда).

Пример. Определение концентрации аммония (азота) в культуральных жидкостях ферментационного получения пенициллина на комбинате "Красноярскмедпрепараты", имеющих состав моль/л калий $4 \cdot 10^{-2}$; натрий $6{,}8 \cdot 10^{-2}$; кальций $2{,}1 \cdot 10^{-2}$, магний $9{,}1 \times 10^{-3}$ и аммоний $3 \cdot 10^{-3}$–$8 \cdot 10^{-2}$. В стаканчиках емкостью 50 мл помещают 25 мл стандартного раствора $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л хлорида аммония, содержащего 0,2 моль/л хлорида лития для создания подходящей ионной силы, и якорь магнитной мешалки. Ставят стакан на магнитную мешалку и опускают туда электрод сравнения (насыщенный хлорсеребрянный электрод с двойным солевым мостиком, заполненным 1 М раствором хлорида натрия) и индикаторный аммоний – селективный электрод с жидкостной мембраной ЭМ–NH^+_4 – 01. После перемешивания в течение 1–2 мин записывают установившееся значение ЭДС (E_1). Затем вводят аликвоту 2,0 мл отфильтрованной культуральной жидкости продуцента бензилпенициллина и записывают через 2 мин установившееся значение потенциала (E_2).

Расчет концентрации аммонийного азота $C_{NH^+_4}$, моль/л, в культуральной жидкости проводят по уравнению

$$C_{NH^+_4} = C_{ст}\left[10^{(E_2-E_1)/K}\left(\frac{V_{ст}+V_x}{V_x}\right)-\frac{V_{ст}}{V_x}\right],$$

где $C_{ст}$ – концентрация аммонийного азота в стандартном растворе, моль/л;

$V_{ст}$ – объем стандартного раствора, взятого для анализа, мл;

V_x – объем аликвоты культуральной жидкости, мл;

K – крутизна электродной функции, равная для ионоселективных электродов марки ЭМ – NH^+_4 – 01 56 ± 1 мВ/pNH^+_4.

В табл. 1 приведены экспериментальные данные, полученные предлагаемым способам, способом отгонки и способом-прототипом.

Анализ производственных растворов пенициллинового производства показал, что состав культуральной жидкости в процессе ферментации практически не изменялся по содержанию макрокомпонентов, например калия от 3 до 4,5 ммоль/л. Поэтому влияние абсолютной концентрации калия, как единственного мешающего анализу в данных условиях, изучено с использованием искусственных растворов (табл. 2).

При концентрации калия $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л использовали стандартный раствор $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л хлорида аммония, содержащий 0,2 моль/л хлорида лития, а при содержании калия $4 \cdot 10^{-1}$ моль/л концентрация аммония в стандартном растворе составляла $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л и хлорида лития 0,99 моль/л. Ионная сила в исскуственных растворах составляла 0,2 и 1,0 соответственно и поддерживалась хлоридом лития.

Без введения хлористого лития результаты анализов культуральной жидкости и искусственных растворов оказываются неудовлетворительными, если при введении добавки анализируемого раствора к стандартному происходит значительное изменение ионной силы.

Как видно из результатов табл. 1, по сравнению с прототипом, предлагаемый способ пригоден по крайней мере при 10-кратном молярном избытке калия по отношению к аммонию, в то время как первый дает удовлетворительные данные лишь при равных концентрациях ионов калия и аммония. Известно, что при концентрации аммонийного азота ниже $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л метод отгонки дает неудовлетворительные результаты. Это подтверждается результатами табл. 1.

Данные полученные на искусственных растворах (табл. 2) свидетельствуют о применимости методики при различных концентрациях ионов калия.

Формула изобретения

Способ определения концентрации аммонийного азота, включающий смешение исследуемой культуральной жидкости со стандартным раствором хлорида аммония и измерение концентрации ионов аммония с

помощью ионоселективного электрода с жидкостной мембраной, отличающийся тем, что, с целью повышения точности, смешение проводят путем добавления культуральной жидкости к стандартному раствору хлорида аммония, содержащему хлорид лития в концентрации, обеспечивающей равенство ионных сил смешиваемых растворов.

Таблица 1

Молярное соотношение K^+/NH_4^+	Найдено аммония, моль/л способом			Погрешность, отн. %		
	предлагаемым	отгонки	прототипом	Предлагаемый	отгонки	прототип
13,3	$3,20\ 10^{-3}$	$2,02\ 10^{-3}$	$8,7\ 10^{-3}$	13	50	190
10,0	$4,25\ 10^{-3}$	$2,60\ 10^{-3}$	$9,80\ 10^{-3}$	6	35	145
8,0	$5,20\ 10^{-3}$	$3,81\ 10^{-3}$	$1,00\ 10^{-2}$	4	24	100
5,6	$6,87\ 10^{-3}$	$5,57\ 10^{-3}$	$1,31\ 10^{-2}$	4	22	84
4,0	$9,87\ 10^{-3}$	$8,50\ 10^{-3}$	$1,52\ 10^{-2}$	1	15	52
2,0	$2,10\ 10^{-2}$	$2,21\ 10^{-2}$	$2,60\ 10^{-2}$	5	9	13
1,0	$3,83\ 10^{-2}$	$3,91\ 10^{-2}$	$4,27\ 10^{-2}$	4	2	7
0,5	$7,85\ 10^{-2}$	$7,87\ 10^{-2}$	$8,22\ 10^{-2}$	2	2	3

Таблица 2

Номер	Молярная концентрация калия	Молярное соотношение K^+/NH^+_4 в пробе	Взято аммония, моль/л	Найдено аммония, моль/л	Относительная погрешность, отн. %
1	$4\cdot10^{-3}$	13,3	$3,00\ 10^{-4}$	$3,23\ 10^{-4}$	8
2	-	10,0	$4,00\ 10^{-4}$	$4,19\ 10^{-4}$	5
3	-	8,0	$5,00\ 10^{-4}$	$4,93\ 10^{-4}$	1
4	-	5,0	$8,00\ 10^{-4}$	$7,87\ 10^{-4}$	2
5	-	2,0	$2,00\ 10^{-3}$	$2,11\ 10^{-3}$	5
6	-	1,0	$4,00\ 10^{-3}$	$4,17\ 10^{-3}$	4
7	-	0,5	$8,00\ 10^{-3}$	$7,87\ 10^{-3}$	2
8	$4\cdot10^{-1}$	13,3	$3,00\ 10^{-2}$	$3,19\ 10^{-2}$	6
9	-	10,0	$4,00\ 10^{-2}$	$4,22\ 10^{-2}$	6
10	-	8,0	$5,00\ 10^{-2}$	$5,05\ 10^{-2}$	1
11	-	5,0	$8,00\ 10^{-2}$	$7,80\ 10^{-2}$	3
12	-	2,0	$2,00\ 10^{-1}$	$2,09\ 10^{-1}$	5
13	-	1,0	$4,00\ 10^{-1}$	$3,81\ 10^{-1}$	5
14	-	0,5	$8,00\ 10^{-1}$	$8,24\ 10^{-1}$	3

Составитель Н.Головнев
Редактор Л.Волкова Техред М.Моргентал Корректор Т.Палий

Заказ 41 Тираж Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101