

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Наталія ГРЕГІРЧАК.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » лютий 2024 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » лютий 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

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

освітньо-професійної програми «Промислова біотехнологія»

на тему: Техніко-економічний аналіз ефективності біотехнологічного
виробництва органічних кислот

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 1

ТИМОЩУК Олександр Андрійович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) _____ (підпис)

Керівник КАРЛАШ Юрій Васильович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) _____ (підпис)

Консультанти _____ :
(прізвище та ініціали) _____ (підпис)

Рецензент Валентин МОЦАР
(прізвище та ініціали) _____ (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 30 ” жовтня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ТИМОЩУКА Олександра Андрійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Техніко-економічний аналіз ефективності
біотехнологічного виробництва органічних кислот

керівник роботи КАРЛАШ Юрій Васильович, к.т.н., доц.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 06 листопада 2023 року № 913-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 05.02.2024

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: Aspergillus terreus ATCC 10020,
Aspergillus terreus 718/9, Pseudomonas fluorescens, Aspergillus niger ORS-4,
цільовий продукт: ітаконова кислота, глюконова кислота.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури. РОЗДІЛ 2. Характеристики органічних
кислот, які отримуються біотехнологічним шляхом. 3. Матеріальний баланс,
розрахунок технологічного обладнання. РОЗДІЛ 4. Специфікація обладнання.
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування стадій виділення та очищення цільового
продукту. РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 7. Опис товарної
форми цільового продукту.

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема одержання ітаконової
та глюконової кислот - 1 аркуш формату А₃. Апаратурна схема одержання
ітаконової та глюконової кислот - 1 аркуш формату А₃.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	<i>РОЗДІЛ 1. Огляд літератури</i>	<i>01.11.23-13.11.23р.</i>	
2	<i>РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування.</i>	<i>13.11.23-16.11.23р.</i>	
3	<i>РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів.</i>	<i>16.11.23-22.11.23р.</i>	
4	<i>РОЗДІЛ 4. Специфікація обладнання отримання субстанції.</i>	<i>22.11.23-25.11.23р.</i>	
5	<i>РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції.</i>	<i>25.11.23-31.11.23р.</i>	
6	<i>РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва субстанції для лікарського засобу.</i>	<i>31.11.23-04.12.23р.</i>	
7	<i>РОЗДІЛ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу.</i>	<i>04.12.23-11.12.23р.</i>	
8	<i>РОЗДІЛ 8. Специфікація обладнання.</i>	<i>11.12.23-15.12.23р.</i>	
9	<i>РОЗДІЛ 9. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу.</i>	<i>15.12.23-22.12.23р.</i>	
10	<i>РОЗДІЛ 10. Опис лікарського засобу згідно АНД.</i>	<i>22.12.23-30.12.23р.</i>	
11	<i>Оформлення апаратурних та технологічних схем.</i>	<i>31.12.23-09.01.24р.</i>	
12	<i>Оформлення вступу та реферату.</i>	<i>09.01.24-15.01.24р.</i>	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Олександр ТИМОЩУК
(ім'я та прізвище)

Юрій КАРЛАШ
(ім'я та прізвище)

Реферат

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеню магістра присвячена пошуку і аналізу літератури щодо отримання двох органічних кислот ітаконовій та глюконовій. Проведення розрахунку ТЕО залежно від потреб ринку у певній кислоті та зробити вибір технологічного обладнання по найбільш затребуваній кислоті

Розрахована потужність виробництва становить 6200 кг ГДЛ/рік. Технологічний процес складається з відділення біомаси, концентрування та висушування на барабанній сушарці.

Кваліфікаційна робота написана на 81 сторінку друкованого тексту, містить 14 таблиць, 11 рисунків. Складається зі вступу, 7 розділів, списку використаної літератури (66 джерел) та графічної частини (3 креслення формату А1).

Ключові слова: ітаконова кислота, глюконова кислота, біомаса, культивування

Abstract

The qualification work for obtaining the master's degree is devoted to the search and analysis of the literature on the production of two organic acids, itaconic and gluconic. Carrying out the TEO calculation depending on the market needs for a certain acid and making a choice of technological equipment for the most demanded acid

The estimated production capacity is 6200 kg of GDL/year. The technological process consists of separation of biomass, concentration and drying on a drum dryer.

The qualification work is written on 81 pages of printed text, contains 14 tables, 11 figures. It consists of an introduction, 7 chapters, a list of used literature (66 sources) and a graphic part (3 drawings in A1 format).

Key words: itaconic acid, gluconic acid, biomass, cultivation

ЗМІСТ

Вступ.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Дослідження ітакової кислоти:.....	10
1.2 Дослідження глюконової кислоти	14
РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКИ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ, ЯКІ ОТРИМУЮТЬСЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМ ШЛЯХОМ.....	18
2.1 Ітаконова кислота.....	18
2.2 Глюконова кислота.....	20
2.3. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування при отриманні ітаконової кислоти	24
2.4. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування при отриманні глюконової кислоти	28
2.5 Потреби в ітаконовій і глюконовій кислотах	33
2.5.1. Розрахунок потужності виробництва.....	34
2.5.2. Розрахунок об'єму ферментера.....	35
2.5.3. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	35
2.6. Потреба в глюконовій кислоті	39
2.6.1. Розрахунок потужності виробництва.....	43
2.6.2. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу	44
2.7. Обґрунтування вибору товарної форми випуску цільового продукту мікробного синтезу.....	47
2.7.1 Обґрунтування вибору первинної та вторинної упаковки	48
РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС, РОЗРАХУНОК ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ.....	53
3.1. Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)	53
3.2 Приготування та стерилізація поживних середовищ	54
3.2.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу	54

3.2.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокуляторі.....	55
3.2.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для посівного апарату.....	56
РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	58
5. ОБГРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	59
5.1. Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання	59
5.2. Попередня обробка супернатанту.....	63
5.3. Вибір способу виділення цільового продукту з супернатанту.....	64
5.4. Вибір способу сушіння та сушарки.....	67
РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	71
6.1. Мікробіологічний контроль.....	71
6.2. Показники росту та синтезу	72
6.3. Визначення концентрації джерел вуглецю та азоту.....	73
6.4 Контроль готової продукції.....	74
6.5. Визначення вологості у готовому продукті	75
РОЗДІЛ 7 ОПИС ТОВАРНОЇ ФОРМИ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ. ПРОЕКТ ТЕХНІЧНИХ УМОВ (ТУ).....	77
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	82

Вступ

До складу більшості харчових продуктів входять цілі комплекси хімічних компонентів, серед яких містяться харчові кислоти, барвники, кетони, ароматичні сполуки. Органічні кислоти, беруть участь у процесах обміну речовин в організмі людини та тварин. Вони сприятливо впливають на процес травлення, нормалізують склад кишкової мікрофлори шляхом зниження рН, стимулюють виділення травних соків, також органічні кислоти беруть участь у біосинтезі амінокислот, ліпідів, складних ефірів в окисно-відновних процесах. Для різних органічних кислот притаманні і інші ефекти.[1]

Ітаконова кислота– використовується у промисловості в якості підсилювача смаку, регулятора кислотності, консерванту та антиоксиданту, попереджує утворення в організмі канцерогенних нітрозамінів, сприяє зниженню ризику виникнення і розвитку онкологічної патології. Лимонна кислота сприяє також засвоєнню кальцію, чинить активуючу й інгібувальну дію на деякі ферменти.[1]

Глюконова кислота застосовують у виробництві м'яса і м'ясопродуктів завдяки високим дифузійним властивостями, антимікробній дії, здатності пластифікувати білки, прискорювати дозрівання м'яса, розпушувати колагенові пучки, регулювати рН і смак. Обробка м'яса і м'ясних продуктів водними розчинами молочної кислоти, забезпечує утримання рН на рівні 4,0-5,4, сприяє утворенню на поверхні захисного шару, що перешкоджає розвитку гнильних мікробів.

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ			
Змн.	ЛистЛ	№ докум.№	ПідписПі	ДатаД				
Розроб.		Тимошук О.А.			ВСТУП	Літ.Літ.	Арк.Арк.	АркушівАркуш
Перевір.		Карлаш Ю.В.					5	1
Консультант								
Н. Контр. Н.								
Затверд.		Стабніков В.П						
						Кафедра БТМ ⁷		

У пивобезалкогольній промисловості молочну кислоту використовують під час приготування сирцевого солоду або затору для зниження жорсткості води, створення оптимального рівня рН, поліпшення фізіологічного стану дріжджів, збільшення виходу екстрактивних речовин солоду, а також для регулювання смаку і аромату.

Отже, можна сказати, що промислове виробництво органічних кислот завжди буде актуальним, завдяки їхньому широкому використанні в різних галузях промисловості, та безпечності і користі для живих організмів.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Наукові дослідження у галузі біотехнологій включають в себе роботу над використанням органічних кислот у різних сферах, таких як медицина, харчова промисловість, сільське господарство та інші. Ітакова кислота (або ітаконова кислота) та глюконова кислота є прикладами органічних кислот, які привертають увагу дослідників. Давайте розглянемо деякі аспекти досліджень з цих напрямків [1,2]:

Ітакова кислота:

Зважаючи на попит на екологічно чисті та біорозкладні матеріали, дослідження ітакової кислоти та глюконової кислоти у біотехнологічних контекстах стає дедалі актуальнішим. Давайте розглянемо більше деталей щодо наукових досліджень з використанням цих органічних кислот.

Біопластики:

Генетично модифіковані мікроорганізми: Дослідження включають в себе використання генетично модифікованих штамів бактерій чи грибів для ефективного біологічного синтезу ітакової кислоти. Це може вести до виробництва біопластиків з високою біорозкладною активністю та мінімальним негативним впливом на навколишнє середовище.

Медичні аспекти:

Антимікробні властивості: Дослідження фокусуються на визначенні антимікробних властивостей ітакової кислоти та її потенційного застосування у розробці нових класів антисептиків та протигрибкових препаратів.

Біологічне виробництво:

Оптимізація культивування: Дослідження орієнтовані на оптимізацію параметрів культивування мікроорганізмів для максимального виходу ітакової кислоти, зокрема, температури, рН та джерела вуглецю [36,38].

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ		
Змн.	ЛистЛ	№ докум.№	ПідписПі	ДатаД			
Розроб.		Гимоцук О.А			Літ.Літ.	Арк.Арк.	АркушіВАркуш
Перевір.		Карлаш Ю.В.				5	1
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр. Н.							
Затверд.		Стабніков В.П					
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ							

Глюконова кислота:

Промислові аспекти:

Біоінженерія мікроорганізмів: Дослідження зосереджені на впровадженні біоінженерних стратегій для підвищення продуктивності мікроорганізмів, які виробляють глюконову кислоту, шляхом оптимізації їхніх генетичних шляхів.

Харчова та фармацевтична промисловість:

Нові методи виробництва: Дослідження розвивають нові методи виробництва глюконової кислоти з використанням біотехнологічних підходів, що може покращити ефективність та якість продукту для використання у харчовій та фармацевтичній галузях

Медичні дослідження:

Вивчення взаємодії з клітинами: Дослідження спрямовані на вивчення взаємодії глюконової кислоти з клітинами, зокрема, її вплив на клітинний метаболізм та можливі протизапальні ефекти [37,38].

1.1. Дослідження ітакової кислоти:

Джон Б. Джонсон:

Метаболічна інженерія: Джонсон використовує метаболічну інженерію для створення мікроорганізмів, які в ефективний спосіб конвертують субстрати в ітакову кислоту. Він також вивчає механізми автокаталізу, щоб підвищити виходи у ферментаційних процесах.

Джон Б. Джонсон спеціалізується на генетичній інженерії для оптимізації мікроорганізмів у виробництві ітакової кислоти. Його дослідження охоплюють кілька ключових аспектів:

Модифікація геному мікроорганізмів:

Джонсон використовує передові методи генетичної інженерії для модифікації геному бактерій або грибів з метою покращення їхньої здатності синтезувати ітакову кислоту. Це включає в себе введення чи модифікацію генів, що контролюють синтез цієї кислоти [39,40].

Оптимізація метаболічних маршрутів:

Для підвищення виходів ітакової кислоти, Джонсон досліджує та оптимізує метаболічні шляхи у мікроорганізмах. Це включає в себе вибір оптимальних ферментативних шляхів та взаємодію з міжклітинними процесами.

Моделювання біологічних систем:

Для кращого розуміння впливу генетичних змін на ферментаційні процеси, Джонсон застосовує математичне моделювання біологічних систем. Це допомагає передбачити та оптимізувати реакції мікроорганізмів на різні умови культивування [41-42].

Інженерія для високоврожайних штамів:

Дослідження Джонсона також орієнтовані на створення генетично модифікованих штамів мікроорганізмів, які не лише виробляють ітакову кислоту ефективно, але й демонструють стійкість до зовнішніх впливів та високу продуктивність.

Ці аспекти дослідження Джона Б. Джонсона мають значущі наслідки для індустрії біотехнологій та створення біопластиків, що базуються на ітаковій кислоті. Його робота допомагає вирішувати технологічні виклики та сприяє розвитку стійких та ефективних виробничих процесів [43-44].

Емма Х. Міллер:

Застосування в медицині: Міллер досліджує можливість використання ітакової кислоти в якості компонента для створення нових антимікробних препаратів, оскільки деякі дослідження показують її потенцій в боротьбі зі стійкими до антибіотиків бактеріями.

Емма Х. Міллер зосереджується на вивченні антимікробних властивостей ітакової кислоти та її можливого застосування в медицині. Деталізація її досліджень включає:

Біологічна активність ітакової кислоти:

Міллер вивчає вплив ітакової кислоти на різні мікроорганізми, такі як бактерії та грибки. Вона досліджує механізми, за якими ця кислота може

впливати на клітинні мембрани та метаболічні процеси, що призводять до їхньої смерті [45-47].

Розробка нових антисептичних засобів:

На основі результатів її досліджень, Міллер активно співпрацює з командою фармацевтів та біотехнологів для створення нових антисептичних та протигрибкових засобів. Ці засоби можуть знайти застосування в медичних процедурах, виробництві лікарських засобів та гігієнічних продуктах.

Дослідження механізмів резистентності:

Міллер вивчає можливість розвитку резистентності мікроорганізмів до ітакової кислоти та розробляє стратегії для попередження або подолання цього явища.

Ефективність у лікуванні інфекцій:

Її дослідження також оцінюють ефективність ітакової кислоти у лікуванні інфекцій у тваринних моделях, дослідженнях на клітинах та, можливо, клінічних випробуваннях [48].

Лаура Кларк:

Екологічний слід: Кларк досліджує шляхи зменшення впливу виробництва ітакової кислоти на довкілля, включаючи аналіз процесів відновлення ґрунтів та водойм, де розкладаються біопластики.

Лаура Кларк фокусується на екологічних аспектах виробництва ітакової кислоти та її впливу на довкілля, зокрема, на біорозкладання біопластиків. Деталізація її досліджень включає:

Вивчення впливу виробництва на довкілля:

Кларк визначає екологічні наслідки виробництва ітакової кислоти, зокрема, викиди CO₂, енерговитрати та використання води. Вона вивчає ефективність та сталість виробничих процесів [47].

Дослідження шляхів біорозкладання:

Кларк вивчає природні процеси біорозкладання біопластиків, які містять ітакову кислоту. Це включає аналіз впливу мікроорганізмів та факторів навколишнього середовища на розкладання матеріалів.

Розробка екологічно стійких біопластиків: На основі результатів своїх досліджень, Кларк спрямовує зусилля на розробку нових формул біопластиків, які мають вищу біорозкладаність та менший вплив на довкілля [49].

Економічна ефективність екологічних підходів:

Кларк досліджує також економічні аспекти використання біопластиків на основі ітакової кислоти. Вона оцінює, наскільки екологічні технології можуть бути економічно вигідними.

Її робота має важливе значення для розвитку екологічно стійких технологій та матеріалів, спрямованих на зменшення впливу пластикового забруднення на навколишнє середовище [50].

Давід Хоффман:

Наноматеріали та біосумісність: Хоффман вивчає можливість використання ітакової кислоти для створення наноматеріалів, які можуть знайти застосування в біосумісних та біорезорбованих імплантах та пристроях.

Дослідження Давіда Хоффмана з ітаковою кислотою:

Біомедичні застосування та біосенсори:

Давід Хоффман зосереджується на біомедичних дослідженнях з використанням ітакової кислоти та розробці нових матеріалів для біосенсорів та медичних пристроїв. Деталізація його досліджень включає:

Дослідження взаємодії з клітинами:

Хоффман глибоко досліджує механізми взаємодії ітакової кислоти з клітинами, зокрема, вивчає вплив на клітинний цикл, апоптоз та інші клітинні процеси. Це дозволяє йому розуміти потенційні медичні застосування цієї кислоти у лікуванні та діагностиці [50].

Розробка матеріалів для біосенсорів:

Хоффман вивчає властивості ітакової кислоти та її взаємодію з біомолекулами. На основі цих даних він розробляє нові матеріали для біосенсорів, які можуть виявляти різні біомаркери у крові чи інших біологічних рідинах.

Використання в імплантованих пристроях:

Його дослідження може включати створення біорезорбованих матеріалів на основі ітакової кислоти, які можна використовувати для імплантованих медичних пристроїв. Це сприяє уникненню необхідності другого втручання для видалення пристроїв після закінчення їхнього терміну служби.

Медичні полімерні матеріали:

Хоффман досліджує властивості полімерів на основі ітакової кислоти для можливого використання у створенні медичних матеріалів, таких як шви під час хірургічних втручань або матеріали для виробництва медичних пристроїв [51].

Дослідження спрямовані на отримання ітакової кислоти

У рядку досліджень з *Aspergillus terreus* виявлено інтересні підходи до оптимізації виробництва ітаконічної кислоти:

"Optimization of itaconic acid production by *Aspergillus terreus* NRRL 1960 using experimental and artificial neural network (ANN) approaches" (2020) [52]:

Мета: Оптимізація виробництва ітаконічної кислоти штамом *Aspergillus terreus* NRRL 1960.

Методи: Використання експериментальних та штучних нейронних мереж для підвищення виробництва.

Висновки: Досягнуто оптимізації процесу виробництва ітаконічної кислоти, що може мати важливість для промислового використання.

"Enhanced itaconic acid production in *Aspergillus terreus* by overexpressing the biosynthetic gene cluster" (2018) [53].

Мета: Збільшення виробництва ітаконічної кислоти шляхом перевищення біосинтетичного генного кластера.

Методи: Генетична інженерія для введення додаткових копій генів.

Висновки: Перевищення генного кластера призвело до значного підвищення виробництва.

"Enhancement of itaconic acid production in *Aspergillus terreus* by overexpressing the *acoA* gene" (2017):

Мета: Збільшення виробництва ітаконічної кислоти через перевищення гена *acoA*.

Методи: Генетична модифікація для збільшення експресії гена *acoA*.

Висновки: Перевищення гена дозволило значно підвищити виробництво ітаконічної кислоти.

"Engineering *Aspergillus terreus* for overproduction of itaconic acid" (2016):

Мета: Інженерна модифікація *Aspergillus terreus* для збільшення виробництва ітаконічної кислоти.

Методи: Використання генетичної інженерії для введення змін в геном.

Висновки: Інженерна модифікація геному призвела до значного підвищення виробництва ітаконічної кислоти [53].

Ці дослідження використовують різні стратегії, включаючи генетичну інженерію та оптимізацію ферментаційних умов, для досягнення високих виходів ітаконічної кислоти. Отримані результати мають потенційне значення для промислового виробництва цієї біологічно активної речовини [50].

Таблиця 1.1

Узагальнююча таблиця

Рік	Назва дослідження	Мета	Методи	Висновки
2020	Optimization of itaconic acid production by <i>Aspergillus terreus</i> NRRL 1960 using experimental and artificial neural network (ANN) approaches	Оптимізація виробництва ітаконічної кислоти	Експериментальні та ANN-підходи	Досягнуто оптимізації процесу виробництва ітаконічної кислоти.
2018	Enhanced itaconic acid production in <i>Aspergillus terreus</i> by overexpressing the biosynthetic gene cluster	Збільшення виробництва ітаконічної кислоти	Генетична інженерія	Перевищення генного кластера призвело до значного підвищення виробництва.
2017	Enhancement of itaconic acid production in	Збільшення виробництва	Генетична	Перевищення гена <i>acoA</i> дозволило

	Aspergillus terreus by overexpressing the acoA gene	ітаконічної кислоти	модифікація	значно підвищити виробництво.
2016	Engineering Aspergillus terreus for overproduction of itaconic acid	Інженерна модифікація для збільшення виробництва	Генетична інженерія	Інженерна модифікація геному призвела до значного підвищення виробництва.

1.2 Дослідження глюконової кислоти

Ельвіра Сміт:

Оптимізація умов культивування: Сміт розробляє нові стратегії для оптимізації умов культивування мікроорганізмів для виробництва глюконової кислоти, включаючи використання нових джерел вуглеводів та оптимальних температур.

Ельвіра Сміт фокусується на вивченні оптимальних умов культивування мікроорганізмів для виробництва глюконової кислоти. Це включає в себе вибір найефективніших штамів, оптимізацію харчування та регулювання умов середовища культивування [54].

Використання нових джерел вуглеводів:

Сміт досліджує можливості використання різних джерел вуглеводів у культивуванні мікроорганізмів, щоб покращити виходи глюконової кислоти та робити процес виробництва більш стійким та сталевим.

Оцінка ефективності ферментаційних процесів.

Вона вивчає різні ферментаційні шляхи та процеси для виробництва глюконової кислоти, а також розробляє методи оцінки їхньої ефективності, щоб вибрати оптимальний підхід.

Джеймс Харріс:

Лікарські застосування: Харріс досліджує механізми взаємодії глюконової кислоти зі здоровими клітинами та клітинами, що аномально

ростуть, що може вести до розробки нових лікарських препаратів для лікування захворювань.

Джеймс Харріс спеціалізується на вивченні лікарських властивостей глюконової кислоти. Він досліджує механізми взаємодії глюконової кислоти з клітинами та тканинами, що може викликати цільові лікувальні ефекти [55].

Інгібітори росту клітин:

Харріс вивчає можливість використання глюконової кислоти як інгібітора росту певних клітин, зокрема, клітин, які можуть бути аномально активними при різних хворобах, таких як рак.

Біологічна взаємодія з організмом:

Він також вивчає вплив глюконової кислоти на різні фізіологічні процеси в організмі, такі як імунні відповіді, з метою визначення можливих застосувань у лікуванні різних захворювань [56].

Рейчел Уайт:

Біозахист продуктів: Уайт вивчає ефективність глюконової кислоти як альтернативного консерванта та стабілізатора у харчових продуктах, зокрема, як засіб для підвищення тривалості та безпеки продуктів.

Рейчел Уайт розвиває дослідження з використання глюконової кислоти як біозахистника у харчовій промисловості. Її робота включає вивчення антимікробних властивостей для підвищення тривалості зберігання харчових продуктів.

Стабілізатори та антиоксиданти [57-58]:

Уайт досліджує можливості глюконової кислоти як стабілізатора та антиоксиданта у харчових продуктах для підтримання їхньої якості та безпеки.

Ефективність консервантів:

Дозволяє порівнювати ефективність глюконової кислоти з іншими харчовими консервантами та досліджує її можливі застосування в якості безпечної альтернативи [59-60].

РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКИ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ, ЯКІ ОТРИМУЮТЬСЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМ ШЛЯХОМ

2.1 Ітаконова кислота

Ітаконова кислота (метиленбутандіова кислота, метиленбурштинова кислота, 3-карбоксі-3-бутенова кислота, пропілендикарбонова кислота) є двохосновною ненасиченою органічною кислотою із загальною формулою $C_5H_6O_4$ (рис. 2.1). Застосовується як кополімер для карбоксилатних каучуків. В органічному синтезі використовується в реакціях гетероциклізації для одержання піролідонів, бутиролактона, метилбутандіола, детергентів, гербіцидів, стирен-бутадієнових полімерів, нітрільних латексів, розчинників. Має широкий спектр застосування в промисловому виробництві смол, також використовується в якості будівельного блоку для акрилових пластмас [31,32].

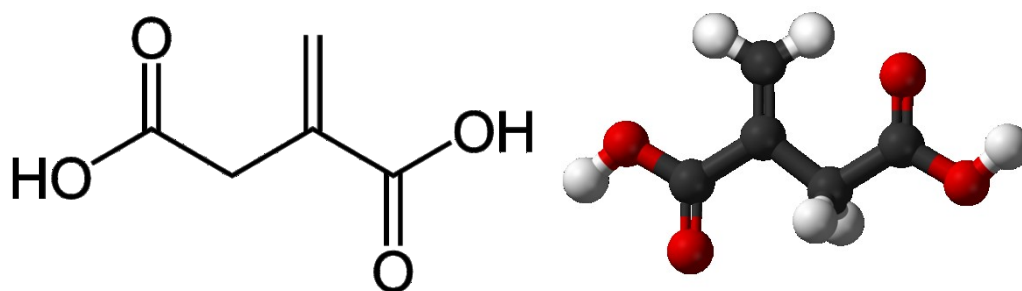


Рис. 2.1. Графічне зображення молекули ітаконової кислоти

Ітаконова кислота є продуктом метаболізму вуглеводів грибами роду *Aspergillus*, а саме *Aspergillus itaconicus*, що виділені в 1929 році японським дослідником Кіношита, та *Aspergillus terreus*, знайденим пізніше англійським вченим Келемом (1939) [1].

Ітаконова кислота є кристалічною речовиною білого кольору без запаху. Молекулярна маса - 130,1.

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ											
Змн.	ЛистЛ	№ докум.№	ПідписПі	ДатаД	ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ											
Розроб.	Тимоцук О.А.										Літ.Літ.	Арк.Арк.	АркушівАркуш			
Перевір.	Карлаш Ю.В.										5	1				
Консультант											Кафедра БТМ					
Н. Контр. Н.																
Затверд.	Стабніков В.П															

$T_{\text{плав}} 167\text{—}168^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{кип}} 268^{\circ}\text{C}$.

Константи дисоціації:

$K_b = 1,40 \cdot 10^{-4}$, $K_a = 3,56 \cdot 10^{-6}$.

Розчинність у воді — 8,3 г/л (20 °C), 29,3 (50 °C), 72,6 (70 °C). Кислота розчиняється в етанолі, метанолі, ТГФ, діоксані, погано розчинна в диетиловому ефірі та бензолі

Ітаконова кислота використовується або як кислота, або у вигляді ефірів для поліпшення властивостей вінілових полімерів. Значна частка ітаконової кислоти використовується у вигляді складних ефірів, одержання яких ґрунтується на реакції зі спиртами самої кислоти або її ангідриду в присутності кислотного каталізатора з виходами до 80%.

З 1960-х років виробництво ітаконової кислоти досягається шляхом ферментації з *Aspergillus terreus*, яка як і раніше домінує у виробництві, тому що до сих пір виведені штами цього виду можуть досягати рівнів до 80-86 г / л. З 1990-х років ітаконова кислота привертає великий інтерес. Витрати на виробництво ітаконової кислоти знижуються в останні роки (4 \$ за кг у 2001 році), вона як і раніше є цінним продуктом з орієнтовною ціною \$ 2 за кг. В даний час в усьому світі виробнича потужність ітаконової кислоти, як очікується, складе близько 50 тисяч тонн на рік, коли попит складе близько 30 тисяч тонн [3,4].

Головними споживачами є хімічні компанії — виробники полімерів. Є можливість зростання попиту на кислоту у зв'язку із заборонаю транспортування акрилонітрилу в Європі.

Полімеризовані метилові, етилові або вінілові ефіри використовуються у якості пластиків, адгезивів і покриттів.

Сополімери ітаконової кислоти дають гумоподібні смоли високої міцності й еластичності, а також водонепроникні покриття з високими електроізоляційними властивостями. Сополімери бутадієн-стиролу з добавкою 1–5% ітаконової кислоти показують підвищену адгезію і використовуються при виробництві килимових і паперових покриттів.

Сополімери поліакрилонітрилу, які мають низький вміст ітаконової кислоти, поліпшують сприйнятливість до фарбування, що важливо при використанні їх у текстильній промисловості.

Ітаконова кислота може також використовуватися як зміцнюючий агент в органосилоксанових полімерах, які застосовуються у виробництві контактних лінз.

Сполуки на основі моноєфірів ітаконової кислоти мають дуже високу твердість, стійкі щодо стискання і довговічні, тому вони є гарним матеріалом у стоматології.

Деякі моно- і дієфіри ітаконової кислоти мають істотні антизапальні або болезаспокійливі властивості. Ряд моноєфірів впливають на ріст рослин.

Важливою є реакція ітаконової кислоти з амінами, яка приводить до утворення N-заміщених піролідонів, що можуть використовуватися як загущувачі в мастилах і мийних засобах, фармацевтичних препаратах і гербіцидах [5].

2.2 Глюконова кислота

Глюконова кислота – органічна кислота, що утворюється при окисненні глюкози, складу $C_6H_{12}O_7$.



Рис 2.2. Структурна формула глюконової кислоти

Залишок цієї кислоти в фосфорильованій формі є одним з проміжних продуктів вуглеводного обміну в живих клітинах [6].

В результаті отримання глюконової кислоти синтетичним шляхом утворюються білі або безбарвні кристали, що не мають запаху і смаку. Вони добре розчиняються у воді, утворюючи світло-жовтий в'язкий розчин.

Завдяки низькій токсичності та здатності утворювати комплекси з іонами металів вона широко застосовується в харчовій, фармацевтичній, текстильній, шкіряній та інших галузях промисловості [6].

Глюконова кислота використовується в якості харчової добавки. Її також позначають E574, добавка дозволена до застосування в Україні та інших країнах світу. Основне призначення глюконової кислоти - регуляція кислотності і розпушення. Крім того, вона є підкислювачем, комплексоутворювачем, підсилює дію антиоксидантів [6,7].

В якості підкислювача використання цієї речовини нераціонально. Справа в тому, що за смаковими властивостями глюконова кислота слабкіше лимонної в 5 разів, і для надання продуктам кислого смаку її застосовують у виняткових випадках.

Харчова добавка E574 легко засвоюється з травного тракту і добре переноситься організмом. Вона здатна активізувати обмін речовин і підвищувати працездатність організму. Дуже рідко глюконова кислота здатна надавати дратівливу або подразнюючу дію на кишечник [8].

Крім харчової промисловості, глюконову кислоту використовують в деяких інших галузях. З її допомогою синтезують м'які засоби, а у фармацевтичній промисловості вона служить наповнювачем таблеток.

Глюконова кислота також здатна зв'язувати іони заліза у широкому діапазоні рН і тому є компонентом препаратів, що застосовуються для боротьби з іржею (глюконова кислота є агентом, який перешкоджає відкладенню заліза). Кальцієві та залізні солі глюконової кислоти використовуються як пероральні та внутрішньовенні препарати у медицині, чиста глюконова кислота – як мийний засіб у молочній промисловості.

Загальна ринкова вартість глюконової кислоти становить понад 3 млн доларів, її світове виробництво – понад 600 тис. т на рік. Основними виробниками глюконової кислоти та її солей є компанії Bristol – Myers Squibb (США), Roquette Freres (Франція), Pfizer (Ірландія) [8].

Глюконова кислота - це білі або прозорі, злегка жовтуваті кристали, що плавляться. Розчин не містить характерного запаху.

Добре розчиняється у воді, утворюючи в'язку рідину жовтуватого кольору. Середньо розчинна в спиртах; розчиняється в інших органічних розчинниках утворюючи солі – глюконати.

Глюконова кислота кристалізується при температурі 30 °С, кислота закипає при температурі вищій +50°С, температура плавлення – 125 – 130 °С, щільність 50% -го розчину 1,235. Вона змішується з водою при кімнатній температурі в будь-яких співвідношеннях.

Інші фізичні характеристики:

- критичний тиск 2 МПа;
- критична температура 131 °С;
- питома теплоємність 1580 Дж/(кг·К);
- кислотність 3,86 [6,7].

Допустиме добове споживання речовини — до 50 мг на кілограм маси тіла. Глюконова кислота здатна підвищувати працездатність м'язів, активізувати обмін речовин, надавати інші позитивні дії на організм. У рідкісних випадках речовина викликає проносну дію або подразнюючу на кишечник.

Глюконова кислота виступає в сфері виробництва продуктів в ролі розпушувача, регулятора кислотності, підкислювача, підсилювача дії антиоксидантів [8].

Речовину зареєстровано як харчова добавка під номером E574. Глюконова кислота часто застосовується в порошках, желе, фруктових соках. Крім того, речовина використовується для усунення проблем, викликаних осадженням фосфату кальцію та інших кальцієвих солей.

Є й інші сфери, в яких глюконова кислота знайшла своє застосування. Наприклад, вона використовується в миючих засобах, у фармацевтичній промисловості в якості наповнювача для таблеток.

Кількість глюконової кислоти, максимально можливе для безпечного її застосування, точно не встановлено. Ряд дослідників повідомляє, що не слід вживати понад 50 мг / кг цієї речовини на добу.

Глюконо-дельта-лактон - циклічний 1,5-внутрішньомолекулярний ефір D-глюконової кислоти. У водному середовищі він гідролізується до рівноважної суміші глюконової кислоти (55-66%) і дельта- та гама-лактонів.

Глюконо-дельта-лактон отримують шляхом прямої кристалізації з водного розчину глюконової кислоти. Глюконова кислота для цього може вироблятися будь-яким з трьох різних способів

1. шляхом окислення D-глюкози з бромною водою;
2. шляхом окислення D-глюкози мікроорганізмами, не патогенними і нетоксикогенними для людини
3. шляхом окислення D-глюкози ферментами, отриманими з цих мікроорганізмів.

Найпоширенішим шляхом отримання глюконової кислоти є мікробний синтез за допомогою різних штамів *Aspergillus niger*. Були виділені гени глюкозооксидази та каталази *A. niger*. Виробництво глюконової кислоти може бути вдосконалено за допомогою використання клонованих генів. Також в промисловості часто використовують окислення глюкозооксидазою D-глюкози [7,9]

Глюконо-дельта-лактон допускається до застосування в харчових продуктах як натуральний функціональний агент, закислюючий агент, а також для контролю рН. Крім того, зазначається, що використовують як коагулянт для тофу. Глюконо-дельта-лактон може бути використаний як хімічний агент для заквашування, і використовувався для так званого «миттєвого» хліба.

Виготовлення м'ясних продуктів, таких як сирокочена ковбаса, ковбаси варені з вищого сорту та їх варіації, є досить складним процесом. Процес дозрівання, формування ковбас сильно залежить від рН середовища, в якому він проходить. При використанні ГДЛ в складі копченої ковбаси,

процес витримки прискорюється проходить рівномірніше, в результаті чого формується приємний яскраво-червоний колір м'ясного продукту. Таким чином, ГДЛ дозволяє зменшити додавання нітриту до 30% і залишковий рівень нітриту до 75%, що робить продукт безпечнішим для людини. Контрольоване підкислення з використанням ГДЛ знижує ризик розвитку небажаних мікроорганізмів [10].

ГДЛ також використовується в розчинах для консервування креветок як м'який кислотний агент і як підсилювач консервантів сорбату та бензоату. Це дозволяє зменшити рівень додавання солі на 60-80% [11].

Традиційний спосіб випічки хлібобулочних виробів полягає шляхом ферментації дріжджів. Однією з альтернатив є нейтралізація бікарбонату натрію кислотою. ГДЛ належить до групи повільних підкислювачів, оскільки його дія базується на основі прогресуючого гідролізу ГДЛ до глюконової кислоти при додаванні води. Глюконова кислота потім реагує з бікарбонатом натрію для вивільнення двоокису вуглецю. Особливо цікавою особливістю є повільність гідролізу ГДЛ при кімнатній температурі та його прискорення при підвищенні температури. ГДЛ також дозволяє регулювати рН у випеченому продукті, тим самим подовжуючи його термін зберігання.

Крім описаних застосувань, ГДЛ також використовується як:

- м'який підкислювач у готових макаронних та рисових продуктах
- інгібітор зміни кольору в консервованих фруктах та овочах
- сировина для приготування кальцію, магнію, цинку, заліза та інших глюконатів, а також хлоргексидинглюконату.

2.3. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування при отриманні ітаконової кислоти

Ітаконова кислота є токсичним для мікроорганізмів продуктом. При концентрації її в середовищі близько 55 г/л спостерігається пригнічення росту продуцента і синтезу продукту. Уникнути токсичної дії при накопиченні кислоти можна нейтралізацією її за допомогою NH_4OH .

Для одержання високого виходу ітаконової кислоти необхідним є лімітування середовища за фосфат-іонами. Процес синтезу ітаконової кислоти аналогічний процесу одержання лимонної кислоти. Найкращими субстратами для культивування є глюкоза і сахароза, однак у промисловості використовують, в основному, мелясу, попередньо оброблену іонами або фероціанідом, а також гідролізований крохмаль. Процес проводять в умовах обмеження росту гриба мінеральними компонентами середовища (залізом і фосфором) при низькому рН середовища і достатньому забезпеченні киснем. Оптимальна температура культивування складає 35 °С. Найчастіше використовується глибинний метод.

У якості посівного матеріалу при поверхневому і глибинному методах ферментації у промисловості використовують сухі конідії гриба, відокремлені від міцелію і змішані з активним вугіллям або стерильним ґрунтом [10].

Продуцентами кислоти у промисловості є спеціально селекціоновані штами

Aspergillus terreus, які, на відміну від *Aspergillus itaconicus*, не розкладають ітаконову кислоту (табл 2.1).

Таблиця 2.1

Особливості одержання ітаконової кислоти за допомогою штамів *Aspergillus terreus* ATCC 10020, *Aspergillus terreus* 718/9 на різних середовищах

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація цільового продукту, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Література
<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 10020	Глюкоза – 100; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 3; KH ₂ PO ₄ – 0,1; MgSO ₄ • 7H ₂ O – 0,5; CaSO ₄ • 2H ₂ O – 0,4; ZnSO ₄ • 7H ₂ O – 0,0005;	96	55	t = 35 °С, рН 2-2,7 При глибинному культивуванні - аерація 1/8 об'ємів повітря на 1 хв на один об'єм середовища	11

	FeCl ₃ – 0,003; CuSO ₄ -0,005				
<i>Aspergillus terreus</i> 718/9	Глюкоза-95; MgSO ₄ - 1,75; NH ₄ Cl –2,5; Кукурудзяний екстракт -2,5; Солодовий екстракт - 1,5.	264	35	pH 2,2, t = 34-40 ° C При t = 45-50 ° C вносять азотну кислоту і додають стимулятор росту 0,01-0,1 г/л, приготований із листя бавовни.	12

Культивування мікроорганізмів проводиться на різних середовищах, з різним значенням рН та температури. Концентрація цільового продукту була найбільшою при культивуванні *Aspergillus terreus* ATCC 10020, і склала 55г/л. Ця концентрація була досягнута за 96 годин.

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування продуцентів ітаконової кислоти

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
	Середовище 1			
<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 10020	Глюкоза -100;	120,0	12	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄ - 3;	60	0,18	4
	KH ₂ PO ₄ - 0,1;	375	0,04	4
	MgSO ₄ • 7H ₂ O - 0,5;	55	0,03	4
	CaSO ₄ • 2H ₂ O - 0,4;	73	0,03	2
	ZnSO ₄ • 7H ₂ O - 0,0005;	95	0,000005	3
	FeCl ₃ - 0,003;	175	0,00005	4
	CuSO ₄ -0,005;	190	0,0004	4
Вартість 1 л середовища –12.29 грн				

		Середовище 2		
<i>Aspergillus terreus</i> 718/9	Глюкоза-95;	120	11,4	1
	MgSO ₄ - 2,5;	55	0,14	4
	NH ₄ Cl –2,5;	85	0,22	4
	Кукурудзяний екстракт -2,5;	180	0,45	4
	Солодовий екстракт – 1,5	193	0,29	4
Вартість 1 л середовища – 12.5 грн				

Примітка.*Ціни наведено станом на липень 2023 р.:

1. https://aromatdereva.com.ua/ua/products/ghyukozapishevaya?gad=1&gclid=Cj0KCQjw3JanBhCPARIsAJpXTx7sC6gBXldFuv_5aLRsk35K9cR-jW7rjYCfv8KXII_zHUu4cflsggaAgeREALw_wcB;

2. <https://klebrig.com.ua/ua/g110029389-kaltsij-sulfat-gips;>

3. [https://shop.hlr.ua/ua/cink-sulfat-rastvor-c-zns04-01-moll-1-l-236560.html;](https://shop.hlr.ua/ua/cink-sulfat-rastvor-c-zns04-01-moll-1-l-236560.html)

4. <https://himtehres.com/catalog/chemical-reagents>

З наведених даних у табл. 2.2 робимо висновок, що літр середовища для культивування *Aspergillus terreus* ATCC 10020 коштує найдешевше (12,29 грн) у порівнянні із *Aspergillus terreus* 718/9, літр середовища для культивування якого коштує (12,5 грн) .

Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент, розраховуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл.2.3).

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г цільового продукту

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація цільового продукту, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Концентрація цільового продукту синтезованого за годину, г/год
<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 10020	12,29	55	0,022	96	0,57

<i>Aspergillus terreus</i> 718/9	12,5	35	0,36	264	0,13
-------------------------------------	------	----	------	-----	------

Отже, на основі отриманих даних, можна зробити висновок, що доцільніше для синтезу ітаконової кислоти використовувати штам *Aspergillus terreus*

ATCC 10020. Він є економічно найвигіднішим, порівняно зі штамом *Aspergillus terreus* 718/9. Концентрація цільового продукту, синтезованого за годину є достатньо високою 0,57 г/год, середовище для культивування дешевше та простіше, а також має невеликий час культивування. Тому цей мікроорганізм обираємо як основний продуцент ітаконової кислоти.

2.4. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування при отриманні глюконової кислоти

Глюконова кислота – органічна кислота, що утворюється при окисленні глюкози. Залишок цієї кислоти в фосфорильованій формі є одним з проміжних продуктів вуглеводного обміну в живих клітинах.

Для виробництва глюконової кислоти використовують бактерії роду *Pseudomonas*, *Gluconobacter*, *Acetobacter* та гриби роду *Aspergillus*, *Penicillium* [13].

Виробничі штами мікроорганізмів повинні відповідати певним вимогам: здатність до росту на дешевих поживних середовищах, висока швидкість росту і утворення цільового продукту, мінімальне утворення побічних продуктів, стабільність продуцента відносно виробничих властивостей, нешкідливість продуцента і цільового продукту для людини і навколишнього середовища. У зв'язку з цим всі мікроорганізми, використовувані в промисловості проходять тривалі випробування на

нешкідливість для людей, тварин і навколишнього середовища. Важливою властивістю продуцента є стійкість до інфекції, що важливо для підтримки стерильності, і фагостійкість .

Біосинтез глюконової кислоти біотехнологічним методом у ферментативному окисленні грибами штамом *Aspergillus niger* ORS-4, за інтенсивної аерації і перемішуванні глюкози на поживному середовищі. Температура середовища 30° С і рН 6. Біосинтез проводиться постійним підживленням середовища, додаванням глюкози .

Концентрація глюконової кислоти по відношенню до вихідної концентрації глюкози становить 78,04 г/л .

При заміні марганцю на цинк, введення меляси або цукрового середовища, посиленні аерації, рН нижче 3 та ж культура здатна продукувати лимонну кислоту .

Представники роду *Aspergillus* є промислово важливими грибами для виробництва оцтової кислоти, аскорбінової кислоти, L-сорбози з D-сорбіту; D-глюконової кислоти, дигідроксиацетону з гліцерину тощо.

Багато видів *Aspergillus* відповідає за псування харчових продуктів (плодів, овочів, зерна, хліба та ін.), шкіри, паперу. Гриби виявляються у вигляді цвілевого нальоту. Природним резервуаром їх є ґрунти південних широт.

Для одержання глюконової кислоти використовують також бактерії роду *Pseudomonas*, які широко поширені в природі.

Їх можна зустріти в повітрі, ґрунті, морських і прісних водоймах, стічних водах і мулі, нафти і газових родовищах. Бактерії *Pseudomonas* були виявлені на харчових продуктах, тілах тварин, рослинах, а також у гнійних ранах і екскрементах хворих ссавців [14].

Клітини бактерій являють собою дрібні поодинокі грамнегативні палички. Спороутворень і виростів не мають, рухливі, мають полярно розташовані джгутики. Кількість джгутиків у різних видів коливається.

Клітини в культурах часто об'єднуються в невеликі грудочки або зерна, оточені товстою слизовою оболонкою [14].

Таблиця 24

Порівняльна характеристика продуцентів глюконової кислоти

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація цільового продукту, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Література
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Глюкоза - 20,0; Дріжджовий екстракт - 1,5; KH ₂ PO ₄ - 1,0; MgSO ₄ *7H ₂ O - 0,1; KCl - 0,1; FeSO ₄ *7H ₂ O - 0,002; NaNO ₃ - 0,6	72	11,7	25	15
<i>Aspergillus niger</i> ORS-4	Глюкоза - 120; (NH ₄) ₂ HP0 ₄ - 1.0; KH ₂ P0 ₄ - 0.5; MgSO ₄ .7H ₂ 0 - 0.15	180	78,04	30	16

Таблиця 1.5

Вартість компонентів поживного середовища для культивування

Біологічний агент	Компонент поживного середовища, г/л	Склад поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Глюкоза	120	120	14,4	2
	Дріжджовий екстракт	1,5	1800	2,7	1
	KH ₂ PO ₄	1,0	375	0,375	3
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,1	55	0,0055	3
	KCl	0,1	75	0,0075	3
	FeSO ₄ *7H ₂ O	0,002	80	0,0002	3
	NaNO ₃	0,6	145	0,09	3
Вартість 1 л середовища – 17,58 грн					
<i>Aspergillus niger</i> ORS-4	Глюкоза	120	120	14,4	2
	(NH ₄) ₂ HP0 ₄	1.0	90	0,09	3
	KH ₂ P0 ₄	0.5	375	0.188	3
	MgSO ₄ .7H ₂ 0	0.15	55	0,08	3
Вартість 1 л середовища –14,76 грн.					

Примітка.*Ціни наведено станом на липень 2023 р.

1.<https://kreon-d.com.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>;

2.https://aromatdereva.com.ua/ua/products/ghyukozapischevaya?gad=1&gclid=Cj0KCQjw3JanBhCPARIsAJpXTx7sC6gBXldFuv_5aLRsk35K9cR-jW7rjYCFiv8KXll_zHUu4cflsggaAgeREALw_wcB;

3. <https://himtehres.com/catalog/chemical-reagents>

Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент розраховували умовну вартість 1 г цільового продукту – глюконової кислоти. (табл. 2.6).

Таблиця 2.6

Умовна вартість 1 г цільового продукту

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн/л	Концентрація, глюконової кислоти г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної глюконової кислоти за годину, г / год
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	17,58	11,7	1,5	72	0,16
<i>Aspergillus niger</i> ORS-4	14,76	78,04	0,19	180	0,43

З наведених даних (Табл. 1.4 , 1.5 та 1.6) можна зробити висновок, що найбільш продуктивним та найбільш ефективним використанням як продуцента глюконової кислоти є штам *Aspergillus niger* ORS-4. Умовна вартість цільового продукту становить 0,19 грн/г . Кількість утвореної глюконової кислоти за годину складає – 0,43 г/год. Відомо, що штам мікроорганізму *Aspergillus niger* ORS-4 можна експлуатувати з високою ефективністю протягом 8-10 діб.

Недоліками використання *Pseudomonas fluorescens* для виробництва є те, що середовище містить у своєму складі 7 компонентів, що вважається дефіцитним; використання дорогих препаратів, що виявляється на собівартості, оскільки вихід продукту достатньо невисокий – 11,7

Біосинтез глюконової кислоти *Aspergillus niger* - високоефективний процес, що здійснюється біотрансформацією глюкози. Висока специфічність реакції, призводить до зниження домішок побічних продуктів. Зазначена велика стійкість грибів до кислих середовищ дозволяє спростити виробництво глюконової кислоти.

Таким чином доцільно продуцентом глюконової кислоти обрати штам *Aspergillus niger* ORS-4.

2.5 Потреби в ітаконовій і глюконовій кислотах

Ітаконова кислота є двохосновною ненасиченою органічною кислотою із загальною формулою $C_5H_6O_4$. Застосовується як кополімер для карбоксилатних каучуків. Має широкий спектр застосування в промисловому виробництві смол, також використовується в якості будівельного блоку для акрилових пластмас.

Полімери метилових, етилових або вінілових ефірів ітаконової кислоти використовуються в якості пластмас, клеїв і покриттів, еластомерів. Сополімери ітаконової кислоти необхідні для виробництва гумової смоли з високою міцністю і гнучкістю, а також для гідроізоляційних покриттів з високою електричною ізоляцією. В даний час виробництво складає близько 80 000 тон. Однак, оцінки ринку вже вийшли далеко за рамки і прогнозують обсяги продажів 450,000 тон на рік до 2025 року [17].

Ітаконова кислота може також використовуватися як зміцнюючий агент в органосилоксанових полімерах, які застосовуються у виробництві контактних лінз. Попит на контактні лінзи невідомо зростає, серед молоді в Україні короткозорих – 40–45 %, порівняно з країнами Південно-Східної Азії, де їх кількість сягає 80 %. В Україні контактні лінзи виробляє фірма «Аквалан» [18].

Деякі реакції ітаконовою кислоти з амінами призводять до утворення н-заміщених піролідонів, які можуть бути використані в якості загущувачів в мастилі і в миючих засобах, шампунях, фармацевтичних препаратах і гербіцидах.

Полімери ітаконової кислоти, її алілових ефірів, а також заміщених і незаміщених амінів за властивостями аналогічні поліакриламіді і поліметилакрилату, внаслідок чого, можуть замінити їх в деяких областях, так як вони менш токсичні і можуть бути отримані досить простими способами. На сьогоднішній день застосування поліакриламіді досить велике, його світове виробництво приблизно до 2,5 млн т у рік.

Таким чином, біополімери на основі ітаконової кислоти та її ефіри можуть вже в найближчий час серйозно витіснити поліакриламід в деяких областях застосування. Уже зараз ітаконова кислота знайшла широке застосування в якості сополімера в виробництві синтетичних волокон (покращення окрашування), модифікаторів і пластифікаторів, регулюючих структурно - механічні та пластичні властивості полімерів, при виробництві синтетичних присадок, засоби проти накипу (в тому числі для промислового застосування). Головна перевага використання ітаконової кислоти та її ефірів заключається у високій екологічності.

В Україні потреба в ітаконовій кислоті складає 6 тон в рік. Обґрунтуємо це таким чином: так як в світі виробництво перевищує 40 тис. тон, візьмемо, що потреби України задовольняють близько 0,015 – 0,02 %, тому що по-перше, ми взяли малий сектор потреб середньостатистичної людини на рік, по-друге, дане виробництво тільки набуває популярності, у зв'язку із заборонаю транспортування акрилонітрилу в Європі. Потреба виникла в зв'язку з виробництвом органічного та акрилового скла, клея-розчинника, який застосовують в будівництві. В сантехніці (акрилові ванни), в торговельному обладнанні. У виробництві нітрилакрилового волокна «Нітрон». Головними споживачами є хімічні компанії - виробники полімерів. Є можливість зростання попиту на кислоту у зв'язку із заборонаю транспортування акрилонітрилу в Європі.

Виробництво ітаконової кислоти економічно вигідно здійснювати упродовж 130 днів, так як за цей час можна виробити необхідну кількість ітаконової кислоти.

2.5.1. Розрахунок потужності виробництва

Так як, виготовлення матеріалів з органічного та акрилового скла відбувається протягом року і має високий попит, то згідно вищевказаним даним $G_{нт} = 6$ тон, де $G_{нт}$ – річна потужність підприємства.

2.5.2. Розрахунок об'єму ферментера

Час роботи ферментера $T_{\text{цф}} = 103$ год (тривалість культивування – 96 год; тривалість підготовчих робіт – миття та огляд ферментера (2 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів та стерилізація (2 год), охолодження ферментера (1 год), завантаження середовища (1 год), засів культурою (0,5 год))

Приймаємо кількість робочих днів ($T_{\text{рд}} = 130$), тоді кількість продукту на добу ($V_{\text{нтд}}$) становитиме:

$$G_{\text{д}} = \frac{G_{\text{нт}}}{T_{\text{д}}} = \frac{6000}{130} = 46 \text{ кг/добу}$$

Кількість продукту за добу з врахуванням втрат:

$$G_{\text{пд}} = \frac{G_{\text{д}}}{1 - E_{\text{св}}} = \frac{46}{1 - 0,2} = 57,5 \text{ кг/добу}$$

Кількість продукту за цикл:

$$G_{\text{ц}} = \frac{G_{\text{д}} \times T_{\text{цф}}}{24} = \frac{57,5 \times 103}{24} = 247 \text{ кг/цикл}$$

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

$$V_{\text{кр}} = \frac{K_1 \times G_{\text{ц}} \times \text{CP}_{\text{гп}}}{P_{\text{кр}}} = \frac{1,2 \times 247 \times 0,9}{55} = 4,85 \text{ м}^3$$

Кількість циклів за рік:

$$K_{\text{ц}} = \frac{G_{\text{нт}}}{G_{\text{ц}}} = \frac{6000}{247} = 24,3 \text{ циклів}$$

Приймаємо 24 цикли.

2.5.3. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 4,85 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

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

$$V_{\text{ф}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{4,85}{1 - 0,1} = 5,4 \text{ м}^3$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 5,4 \text{ м}^3$.

Вибравши коефіцієнт заповнення ($K_{зап} = 0,6$), розрахуємо можливий геометричний об'єм ферментера (V_{ϕ}), що становить:

$$V_{гф} = \frac{V_{\phi}}{K_{зф}} = \frac{5,4}{0,6} = 9 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 10 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зф} = \frac{V_{\phi}}{V_{гф}} = \frac{5,4}{10} = 0,54$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5 – 0,65), отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{псф} = \frac{V_{\phi}}{1 + X_{\phi}} = \frac{5,4}{1 + 0,1} = 4,9 \text{ м}^3$$

де X_{ϕ} – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пмф} = V_{\phi} - V_{псф} = 5,4 - 4,9 = 0,5 \text{ м}^3$$

Для одержання 0,5 м³ посівного матеріалу в посівному апараті необхідно врахувати втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 %. Тоді кількість поживного середовища і посівного матеріалу перед культивуванням у посівному апараті становитиме:

$$V_{па1} = \frac{V_{пмф}}{1 - E_{па}} = \frac{0,50}{1 - 0,1} = 0,55 \text{ м}^3$$

де $E_{па}$ – втрати інокуляту під час культивування.

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

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пспа1}} = \frac{V_{\text{па}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{0,55}{1 + 0,1} = 0,5 \text{ м}^3$$

де $X_{\text{па}}$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{\text{пмпа}} = V_{\text{па1}} - V_{\text{пспа1}} = 0,55 - 0,5 = 0,05 \text{ м}^3 = 50 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб2}} = 0,67 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті геометричним об'ємом:

$$V_{\text{гпа1}} = \frac{V_{\text{па}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{0,55}{0,54} = 1,07 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 1 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{0,55}{1} = 0,55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5-0,65), отже геометричний об'єм посівного апарату вибрано вірно.

Для одержання 50 л посівного матеріалу врахуємо втрати в результаті краплинності через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 %.

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі перед культивуванням у посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{ін}} = \frac{V_{\text{пмін2}}}{1 - E_{\text{іе}}} = \frac{50 \text{ л}}{1 - 0,1} = 55,5 \text{ л}$$

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

$$V_{\text{псін}} = \frac{V_{\text{ін}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{55,5}{1 + 0,1} = 50,45 \text{ л}$$

де $X_{\text{ін}}$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пмін}} = V_{\text{ін}} - V_{\text{псін}} = 55,5 - 50,45 = 5,05 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{робз}} = 55,5$ л можна одержати під час культивування бактерій в інокуляторі геометричним об'ємом:

$$V_{\text{гін}} = \frac{V_{\text{ін}}}{K_{\text{зін}}} = \frac{55,5}{0,6} = 92,5 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 100$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зін}} = \frac{V_{\text{ін}}}{V_{\text{гін}}} = \frac{55,5}{100} = 0,55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5-0,7), отже геометричний об'єм інокулятора вибрано вірно.

Для одержання 6,06 л посівного матеріалу врахуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 %.

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі перед культивуванням у посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{плф}} = \frac{V_{\text{пмін}}}{1 - E_{\text{плф}}} = \frac{5,05 \text{ л}}{1 - 0,1} = 5,6 \text{ л}$$

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

$$V_{\text{пслф}} = \frac{V_{\text{плф}}}{1 + X_{\text{плф}}} = \frac{5,6}{1 + 0,1} = 5,09 \text{ л}$$

де $X_{\text{ін}}$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пмлф}} = V_{\text{плф}} - V_{\text{пслф}} = 5,6 - 5,09 = 0,51 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{робз}} = 5,6$ л можна одержати під час культивування бактерій в інокуляторі геометричним об'ємом:

$$V_{\text{гпа1}} = \frac{V_{\text{плф}}}{K_{\text{зплф}}} = \frac{5,6}{0,6} = 9,3 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 10$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{5,6}{10} = 0,56$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5-0,65), отже геометричний об'єм інокулятора вибрано вірно.

Кількість посівного матеріалу для засіву інокулятора $V_{\text{пмз}} = 0,51$ л можна одержати шляхом культивування мікроорганізмів у колбах на качалці. Для цього використовують качалочці колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,15$.

Тоді кількість колб для посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{гколб}}}{V_{\text{нколб}} \times K_{\text{зколб}}} = \frac{0,51}{0,75 \times 0,15} = 5 \text{ шт}$$

Приймаємо 5+1 – 6 колб.

Отже, процес одержання інокуляту для забезпечення біосинтезу біомаси мікроорганізмів у ферментері об'ємом 10 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,54 проходитиме в 5 етапів.

2.6. Потреба в глюконовій кислоті

Органічні кислоти широко використовують в харчовій і фармацевтичній промисловості, в техніці і як хімічна сировина. Більше 50 органічних кислот можуть бути отримані на основі мікробіологічного синтезу. Прийнято вважати, що органічні кислоти, отримані в результаті мікробіологічного синтезу, кращі для використання людиною, в порівнянні з синтетичними кислотами.

Глюконова кислота - це білий або безбарвний порошок без смаку і запаху. Вона добре розчиняється у воді, утворюючи в'язку рідину жовтуватого кольору. Ця кислота утворює солі-глюконати. Найбільш відомі наступні солі глюконової кислоти:

- глюконат кальцію;
- глюконат цинку;
- хінін глюконат;
- глюконат заліза.

Завдяки своїм властивостям глюконова кислота виступає в сфері виробництва продуктів в ролі розпушувача, регулятора кислотності, комплексоутворювача, подкислювача, підсилювача дії антиоксидантів. Речовина зареєстрована як харчова добавка під номером E574 [19, 20].

Глюконова кислота часто застосовується в порошках, желе, фруктових соках. Крім того, речовина використовується для усунення проблем, викликаних осадження фосфату кальцію та інших кальцієвих солей.

Є й інші сфери, в яких глюконова кислота знайшла своє застосування. Наприклад, вона використовується в миючих засобах, у фармацевтичній промисловості як наповнювач для таблеток.

Глюконат натрію і глюконова кислота використовуються в якості комплексоутворюючих агентів для дво- або тривалентних катіонів металів (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) в промислових лужних миючих розчинах. У цьому застосуванні вони особливо ефективні, навіть у порівнянні з такими агентами, як NTA і EDTA. Глюконова кислота і глюконат натрію зазвичай використовуються в рідких рецептурах в поєднанні з іншими інгредієнтами, такими як поверхнево-активні речовини, гідроксид натрію, силікат натрію і фосфати. Такі рецептури можуть бути більш ефективні, завдяки синергізму, що виникає при поєднанні властивостей двох або трьох компонентів: тринатрій фосфат, який використовується як детергент, не володіє комплексоутворюючими властивостями і в жорсткій воді може викликати осадження кальцію у вигляді нерозчинної фосфатної солі. Доданий в розчин глюконат натрію реагує з іонами кальцію з утворенням розчинної хелатного з'єднання. Поверхнево-активні речовини, як правило, більш ефективні в м'якій або демінералізованій воді. Так як проводити демінералізацію води дуже дорого, економічно вигідним рішенням є додавання в рецептуру глюконату натрію. Силікати доповнюють дію гідроксиду натрію, надаючи підвищену лужність і запобігаючи корозії. Глюконат натрію надає синергізм цим властивостям. Завдяки поєднанню комплексоутворюючих, диспергуючих і анти-корозійних властивостей, високій розчинності і підвищеній стабільності в

лужному середовищі, глюконат натрію є найкращим комплексоутворюючим агентом для створення лужних рецептур

Проте в більшості країн Європи глюконова кислота як харчова добавка заборонена, частіше використовується похідне глюконової кислоти – глюконо-дельта-лактон [21].

Глюконо-дельта-лактон (ГДЛ, E575) - це внутрішній ефір глюконової кислоти. У молочній суміші, як і в воді, ГДЛ повільно гідролізується, вивільняючи глюконову кислоту. У процесі даної реакції відбувається падіння кислотності (рН середовища реакції в керованому режимі). Завдяки цій властивості застосування харчової добавки E575 робить можливим: осадження білка; підкислення продукту після утворення оптимальної консистенції; стабілізацію консистенції напівсухих сирокочених ковбас; отримання пекарського порошку з повільним газоутворенням. Крім того, харчова добавка E575 застосовується для прискорення процесу дозрівання продукції, стабілізації кольору

Традиційні технології виробництва сирокочених та сиров'ялених ковбас мають досить довгий цикл виробництва – 24–45 діб, тому для скорочення даного терміну виготовлення широко використовуються схеми інтенсивного виробництва. Останні дозволяють серійно випускати ковбаси з меншим циклом виробництва (завдяки скороченню термінів дозрівання і ферментації сировини, а також тривалості сушки).

Шляхом внесення стартових культур і ферментних систем (модуляторів біохімічних процесів) можливі модифікації як традиційної схеми (прискорення процесу дозрівання дозрівання сировини), так і інтенсивних, при безпосередньому дозріванні фаршевих мас в батоні. Даний спосіб із застосуванням біохімічних методів впливу на м'ясну сировину дозволяє, зберігши високі органолептичні властивості ковбас на 5-8 діб скоротити цикл їх виробництва [22].

Застосування біохімічних методів вимагає накладення оптимальних кліматичних умов (дозрівання в кліматкамерах, підвищеної санітарії

виробництва, низького обміненія м'ясної сировини, спецій і смакових покращувачів), внесення в систему належної кількості вуглеводів і відповідності типу застосовуваних штамів виду сировини, тобто відповідного технологічного досвіду виробників і високої санітарії на їх виробництві

Через ускладнення технології при застосуванні біохімічних методів прискорення дозрівання широке поширення набув метод прискорення дозрівання сирокочених і сиров'ялених ковбас з використанням ГДЛ шляхом внесення комбінованих функціональних систем на основі ГДЛ з накладенням смакових характеристик і комплексу добавок стабілізаторів рН, який також дозволяє істотно прискорити процес дозрівання і доведення рН системи в область значень характерних для даних видів ковбас

У разі застосування ГДЛ не відбувається прискорення процесу ферментації. Прискорення процесу дозрівання здійснюється шляхом накладення ступеневого гідролізу ГДЛ на фаршеву систему, що веде до більш швидкого зниження рН [23-24].

В 2018 році було вироблено 248 тис. тон ковбасних виробів. На ринку лідирують варені ковбаси, сосиски і сардельки (64,3%). Друге місце займають напівкопчені ковбаси (17,9%). На третьому влаштувалися сиров'ялені та сирокочені ковбаси, включаючи «салямі» (8,6 %). Далі йдуть незгадані в списку види (3,9%). За ними слідує печінкові (або ліверні) ковбаси (3,1%). На шостому місці – копчено-запечені ковбаси (1,6%). Передостаннє місце займають холодець і сальтисон (0,4%). Замикають список ковбасні вироби з конини (0,2%) (рис. 1.2.) [25].



Рис. 3.2. Структура ринку ковбасних виробів України

Тобто в 2018 році було вироблено сиров'ялених та сирокопчених ковбас:

$$248 \text{ тис. тон.} \times 8,6 \% = 21,33 \text{ тис. тон.}$$

Згідно з ДСТУ 4427:2005 (Ковбаси сирокопчені та сиров'ялені) максимально допустима кількість ГДЛ – 5 г/кг. За технологією виробництва даних видів ковбас використовується 2-4 г/кг ГДЛ на кг сировини, тобто в середньому – 3 г/кг [20]. Проте не всі виробники обирають такий метод інтенсифікації виробництва ковбас, тому слід врахувати преміум-сегмент, виробників та невеликих виробників, які не використовують даний метод – 35-40 %. Отже, з додаванням ГДЛ виробляють наступну кількість ковбас:

$$21,33 \text{ тис.тон} \times (100 \% - 35 \%) = 13,8 \text{ тис. тон}$$

Для виробництва 13,8 тис. тон сирокопчених та сиров'ялених ковбас необхідно:

$$13800000 \text{ кг} \times 3 \text{ г/кг} = 41400000 \text{ г} = 41\,400 \text{ кг ГДЛ.}$$

В доступній літературі не вдалося знайти відомості щодо виробництва ГДЛ в Україні. На вітчизняному ринку ця речовина представлена як 100 % імпортована з Китаю або Германії, причому ГДЛ виробництва Китаю в більшості випадків представлений у вигляді технічного, який не відповідає вимогам харчової галузі. ГДЛ виробництва Німеччини продається в більш очищеній формі та відповідно дорожчий. Тому можливо здійснювати виробництво даної речовини біотехнологічним шляхом у вигляді 15 % імпортозаміщення, тобто необхідно виробити :

$$G_{нт} = 41\,400 \text{ кг} \times 15\% = 6210 \text{ кг ГДЛ} = 6200 \text{ кг ГДЛ.}$$

2.6.1. Розрахунок потужності виробництва

1. Кількість продукту на добу:

$$G_{нтд} = G_{нт} / T_{рд} = 6200 / 330 = 18,8 \text{ кг/доба}$$

2. Кількість продукту на добу з урахуванням втрат за виробничий цикл ($E_{св}$):

$$G_{пл} = G_{нтд} / (1 - E_{св}) = 18,8 / (1 - 0,4) = 31,3 \text{ кг/доба}$$

3. Кількість глюконової кислоти за цикл:

$$G_{цк} = G_{пл} \times T_{цф} / 24 = 31,3 \times 188 / 24 = 245 \text{ кг/доба}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,0 год, перевірка на герметичність – 1 год, підігрів та стерилізація апарату – 2 год, охолодження ферментера – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 1,5 год та ферментація – 180 год), K_1 – коефіцієнт запасу часу, що враховує можливість нестерильних операцій, $CP_{гп}$ – кількість сухої речовини в готовому продукті.

4. Об'єм культуральної рідини, що зливається за одну ферментацію:

$$V_{кр} = K_1 \times G_{цк} \times CP_{гп} / P_k = 1,1 \times 245 \times 0,98 / 78,04 = 3,38 = 3,4 \text{ м}^3$$

K_1 – коефіцієнт запасу часу, що враховує можливість нестерильних операцій,

$CP_{гп}$ – кількість сухої речовини в готовому продукті;

P_k – концентрація цільового продукту (при культивуванні *Aspergillus niger* з 1 л культуральної рідини отримують 78,04 глюконової кислоти).

5. Кількість циклів на рік:

$$N_{цк} = G_{нт} / G_{цк} = 6200 / 245 = 25,3 = 25 \text{ цикла.}$$

2.6.2. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу

За виробничий цикл отримують $V_{крц} = 3,4 \text{ м}^3$ культуральної рідини. Під час біосинтезу в результаті краплевиносу через колектор випрацюваного повітря втрачається від 10 % до 15 % культуральної рідини.

Таким чином, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом буде становити:

$$V_{роб1} = \frac{V_{крц}}{(1 - Eф)} = \frac{3,4}{(1 - 0,1)} = 3,8 \text{ м}^3,$$

де $Eф = 10 \%$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Отже, виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб1} = 3,8 \text{ м}^3$.

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

$$V_{ф1} = \frac{V_{роб1}}{K_{зап}} = \frac{3,8}{0,6} = 6,3 \text{ м}^3$$

За додатком 4 (метод. Основи проектування біотехнологічних виробництв) знаходимо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф1} = 6,3 \text{ м}^3$. Оскільки ферментер $V_{сф1} = 6,3 \text{ м}^3$ є стандартним, то робити уточнений розрахунок і підбір не потрібно.

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданого значення $K_{зап} = 0,6$.

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері становитиме:

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб1}}{1 + X_{ф}} = \frac{3,8}{1 + 0,1} = 3,45 \text{ м}^3,$$

$X_{ф}=0,1$ –кількість посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб1} - V_{пс1} = 3,8 - 3,45 = 0,35 \text{ м}^3 = 350 \text{ л}$$

Щоб одержати 350 л посівного матеріалу в посівному апараті треба врахувати втрати в результаті краплевиносу через колектор випрацюваного повітря, які становлять від 10 % до 15 % культуральної рідини.

Тоді кількість поживного середовища та інокуляту в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб2} = \frac{V_{пм1}}{(1 - E_{па})} = \frac{350}{(1 - 0,1)} = 389 \text{ л}$$

Доза посівного матеріалу ($X_{па}$) становить 10 % відсотків від об'єму поживного середовища.

Звідси кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс2} = \frac{V_{роб2}}{1 + X_{па}} = \frac{389}{1 + 0,1} = 353 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{пм2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 389 - 353 = 36 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{роб2} = 389$ л можна одержати при культивуванні культури у посівному апараті геометричним об'ємом :

$$V_{Г2} = \frac{V_{роб2}}{K_{зап}} = \frac{389}{0,6} = 648 \text{ л}$$

Найближчий за об'ємом стандартний ферментер – $V_{сф2} = 0,63 \text{ м}^3$ (див. додаток 4). Уточнюємо обраний коефіцієнт заповнення $K_{зап}=0,6$:

$$K_{зап2} = \frac{V_{роб2}}{V_{сф2}} = \frac{389}{630} = 0,62.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданого значення $K_{зап}=0,65$.

Для одержання інокуляту об'ємом 36 л враховуємо втрати культуральної рідини в результаті краплевиносу через колектор випрацюваного повітря, які становлять від 10 % до 15 %.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб3} = \frac{V_{пм2}}{(1 - E_{ін})} = \frac{36}{(1 - 0,1)} = 40 \text{ л}$$

Доза посівного матеріалу ($X_{ін}$) для інокулятора становить 10 % відсотків від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі становить:

$$V_{пс3} = \frac{V_{роб3}}{1 + X_{ін}} = \frac{40}{1 + 0,1} = 36,36 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить :

$$V_{пм3} = V_{роб3} - V_{пс3} = 40 - 36,36 = 3,64 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу $V_{роб3} = 40$ л можна одержати при культивуванні культури у посівному апараті геометричним об'ємом :

$$V_{Г3} = \frac{V_{роб3}}{K_{зап}} = \frac{40}{0,6} = 66,7 \text{ л}$$

За додатком 4 знаходимо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф3} = 60$ л та уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап3} = \frac{V_{роб3}}{V_{сф3}} = \frac{40}{60} = 0,67.$$

Посівний матеріал об'ємом 0,36 л для засіву малого інокулятора можна одержати культивуванням біологічного агента в колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом 750 мл з $K_{запк} = 0,15$. Звідси кількість колб становить:

$$N_{колб} = \frac{V_{пм4}}{V_{колб} \cdot K_{запк}} = \frac{0,36}{0,75 \cdot 0,15} = 3 \text{ колб}$$

Зважаючи на інформацію що зазначена в розділах I-III, в подальшому буде проводитися проектування виробництва саме глюконової кислоти

2.7. Обґрунтування вибору товарної форми випуску цільового продукту мікробного синтезу

Глюконо-дельта-лактон - лактон глюконової кислоти, Е 575 - добре розчинний продукт, який застосовують у м'ясній, молочній, рибній та інших галузях харчової промисловості.

Глюконо-дельта-лактон (ГДЛ) - білий, практично без запаху кристалічний порошок зі злегка солодкувато-кислуватим смаком, добре розчинний у воді.

Застосування:

Глюконо-дельта-лактон застосовується

- як загусник у приготуванні соєвого сиру, робить його більш білим та ніжним;

- широко використовується в м'ясній промисловості, додається в ковбаси, сосиски, рулети для надання їм потрібного забарвлення, скорочення часу термообробки, прискорює дозрівання та кольороутворення ковбас та натуральних напівфабрикатів, бере участь у освіті смаку;

- у м'ясній промисловості також є підсилювачем кольору, що скорочує застосування токсичних речовин, нітритів;

У м'ясних продуктах при додаванні ГДЛ він гідролізується в глюконову кислоту під впливом вологи, поступово знижується рН м'ясної системи. Процес (тривалість) зниження рН м'ясної системи становить 40-60 хвилин в залежності від складу м'ясної системи, концентрації ГДЛ та температури середовища. ГДЛ може бути використаний як прискорювач дозрівання м'яса під час виробництва натуральних напівфабрикатів. При цьому ГДЛ у кількості 0,1-0,3% маси готового продукту вводиться в розсіл для шприцювання або масування. Виробництво м'ясних продуктів (сирокопчені, варено-копчені, варені ковбаси, сосиски та сардельки) є одним із найскладніших процесів. Незначне відхилення

від вихідного сировинного матеріалу або умов виробництва може зашкодити кінцевих характеристиках готового продукту. Процеси дозрівання, копчення переважно залежить від рН середовища. Під впливом низького значення рН середовища ці процеси протікають значно швидше.

У варених виробках (сосиски, сардельки, ковбаси) ГДЛ використовується на рівні 0,1-0,2% до м'ясної основи для прискорення процесу закріплення кольору та зниження втрат при копченні. Максимально до 0,3% - інакше копчений продукт може набути кислуватий смак. Винятки можуть становити окремі види варених і варено-копчених саямі та напівкопчених ковбас, де необхідний кисліший смак.

Відповідно до представленої інформації у проекті технічних умов (ТУ) і відповідно до технології біотехнологічного отримання глюконо-дельта-лактон (лактон глюконової кислоти) пропонується отримувати білий кристалічний порошок без використання будь яких наповнювачів.

2.7.1 Обґрунтування вибору первинної та вторинної упаковки

Пакування – процес підготовки продукції до транспортування або зберігання із застосуванням пакування.

Пакування – комплекс засобів, які призначені для захисту препарату від впливу навколишнього середовища, ушкодження, втрат і полегшують процес обігу.

Видів упаковок існує безліч, матеріалами для пакування можуть бути: папір, целофан, поліетиленові пакети, двохосноорієнтована плівка з поліпропілену (ВОРР), полівінілхлорид (ПВХ), поліетилен високого тиску (ПВТ), поліетилен низького тиску (ПНТ), поліпропілен(ПП).

Розглянемо основні переваги та недоліки даних пакувальних матеріалів:

1 Двохосноорієнтована плівка з поліпропілену (ВОРР) практично не тягнеться, чутлива до проколів (плівка відразу ж рветься), гірше зварюється.

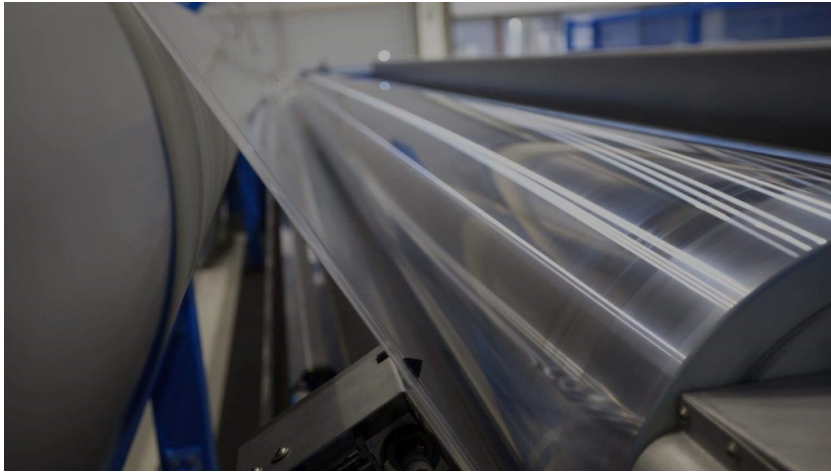


Рис.2.1 Двохосноорієнтована плівка з поліпропілену

2 Пакування поліетиленом низького тиску (ПНТ) чи високого тиску (ПВТ): ці матеріали з низькою прозорістю, мутні, ПВТ та ПНТ не має необхідних, для тривалого зберігання кристалів, бар'єрних властивостей.



Рис.2.2. Основа для пакування поліетиленом низького тиску

3 Найбільш розповсюдженими пакувальними матеріалами є полівінілхлорид (ПВХ) та поліпропілен (ПП). Але контакт плівки з продуктом, що має вживатися в їжу тваринами повинен контролюватися. Залежно від температури продукт в цій упаковці не можна піддавати стерилізації та утилізації, а при горінні виробів з ПВХ утворюється велика кількість шкідливих речовин, в упаковці з паперу цих недоліків немає.



Рис.2.3. Полівінілхлорид

4 Паперові пакувальні матеріали позбавлені всіх вищезазначених недоліків.



Рис.1.4. Зразок паперових мішків промислового використання

Існує ряд особливостей і переваг:

- Широка сфера застосування, велика кількість варіантів використання.
- Екологічність та гігієнічність. Можливість легкої утилізації або вторинної переробки.

- Невелика ціна.
- Висока міцність.
- Збереження властивостей і якості упакованого товару.
- Компактність і як наслідок зручність при транспортуванні.
- З точки зору споживача, вид упаковки приємний на дотик.⁸
- Упаковка витримує на тягарці до 50 кілограм.
- Простота процесу пакування.

Тому, для упаковки ГДЛ будуть застосовуватися паперові багатошарові мішки ємністю 10 кг.

Продукт у мішки фасуватиметься по 10 кг на фасовочній машині дискретної дії. Зашивка мішків нитками відбувається у машині запечатування паперових мішків [32, 61,62].

РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС, РОЗРАХУНОК ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ

- Згідно з технічним завданням обсяг виробництва глюконової кислоти становить 6200 кілограмів на рік. Замовник вимагає виготовлення цієї кількості продукту протягом 330 робочих днів. Згідно з наявними даними, максимальний синтез глюконової кислоти *A.niger* (78,04 г/л) спостерігається за умов росту продуцента на поживному середовищі з таким складом, г/л:
 - глюкоза – 120;
 - $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1,0;
 - KH_2PO_4 – 0,5;
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.15.

Посівний матеріал вирощують на аналогічному поживному середовищі.

3.1. Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)

1) Кількість продукту на добу,

$$G_{\text{нд}} = G_{\text{нт}}/T_{\text{рд}} = 6200/330=18,8 \text{ кг/доба}$$

2) Кількість продукту на добу з урахуванням втрат за виробничий цикл

$$(E_{\text{св}}): G_{\text{нд}} = G_{\text{нтд}}/(1 - E_{\text{св}}) = 18,8/(1-0,4)=31,3 \text{ кг/доба}$$

3) Кількість продукту за цикл,

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{нд}} T_{\text{цф}}/24 = 31,3 \times 188/24=245 \text{ кг/доба}$$

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

$$V_{\text{кр}} = K1G_{\text{цк}}C_{\text{р}}/P_{\text{кр}} = 1,1 \times 245 \times 0,99/78,04=3,4 \text{ м}^3$$

5) Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{\text{цк}} = G_{\text{нд}}/G_{\text{цк}}=6200/245 = 25,3 \text{ Приймаємо } 25 \text{ цикли.}$$

НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ				
Змн.	ЛистЛ	№ докум.№	ПідписПі	ДатаД
<i>Розроб.</i>		<i>Гимоцук О.А.</i>		
<i>Перевір.</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>		
<i>Консультант</i>				
<i>Н. Контр. Н.</i>				
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П</i>		
МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС, РОЗРАХУНОК ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ				
		Літ.Літ.	Арк.Арк.	АркушіАркуш
		5	1	
Кафедра БТМ				

Враховуючи те, що кількість посівного матеріалу становить 10 % від загального об'єму поживного середовища, розрахуємо кількість стадій підготовки посівного матеріалу для культивування *A.niger*, а також робочий об'єм ферментера, інокуляторів та посівного (коефіцієнт заповнення 0,6).

3.2 Приготування та стерилізація поживних середовищ

3.2.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

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

$$V_{\phi} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\phi}) = 3,4 / (1 - 0,1) = 3,8 \text{ м}^3.$$

Кількість поживного середовища в ферментері складе:

$$V_{\text{пс}} = V_{\phi} / (1 + X_{\phi}) = 3,8 / (1 + 0,1) = 3,45 \text{ м}^3.$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву ферментера: $V_{\text{пм}\phi} = V_{\phi} - V_{\text{пс}} = 3,8 - 3,45 = 0,35 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{\text{з}\phi} = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{\text{г}\phi} = V_{\phi} / K_{\text{з}\phi} = 3,8 / 0,6 = 6,3 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий стандартний об'єм ферментера $6,3 \text{ м}^3$.

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}}$ складуть:

$$G_{\phi} = 3450 \times 122 = 420900 \text{ г (приблизно 420,9 кг)}$$

$$\text{Глюкоза} - G1 = G_{\text{заг}} (C1/C\Sigma) = 420,9 (120/122) = 412,4 \text{ кг}$$

$$(\text{NH}_4)_2\text{HP0}_4 - G2 = G_{\text{заг}} (C2/C\Sigma) = 420,9 (1,0/122) = 3,45 \text{ кг}$$

$$\text{KH}_2\text{P0}_4 - G3 = G_{\text{заг}} (C3/C\Sigma) = 420,9 (0,5/122) = 1,7 \text{ кг}$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G4 = G_{\text{заг}} (C4/C\Sigma) = 420,9 (0,15/122) = 0,5 \text{ кг}$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу. Кількість води визначають за наступною формулою $V_{\text{в}} = V_{\text{пс}} - G_{\text{заг}} - (V_{\text{пс}} K_{\text{кон}})$, де $K_{\text{кон}}$ - частка конденсату у загальній кількості

води, що йде на приготування середовища, а $V_{пс}K_{кон}$ – загальна кількість утвореного конденсату.

Таблиця 3.1.

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для ферментера

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л (мл/л)	Кількість для приготування 3450 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції
Глюкоза	120	412,4	А	3415
Вода		2700		
Конденсат А		270		
(NH ₄) ₂ HP0 ₄	1,0	3,45	Б	25,5
KH ₂ P0 ₄	0,5	1,7		
Вода		20		
Конденсат Б		2	В	9,5
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,15	0,5		
Вода		9		
Конденсат В		0,9		
Разом:				3450

**Примітка:* Стерилізацію композиції А проводять у ферментері, оскільки вона має жорсткіший режим стерилізації, композицію Б і В стерилізують окремо у збірниках. Конденсат порохований від загального об'єму середовища.

3.2.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокуляторі

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

$$V_{ф} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 3,50/(1-0,1) = 389 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в ферментері складе:

$$V_{пс} = V_{ф}/(1+X_{ф}) = 389/(1+0,1) = 353 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву ферментера: $V_{пмф} = V_{ф} - V_{пс} = 389 - 353 = 36 \text{ л.}$

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}}$ складуть:

Таблиця 3.2.

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для інокулятора

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л (мл/л)	Кількість для приготування 353 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції
Глюкоза	120	42,4	А	330
Вода		300		
Конденсат А		30		
(NH ₄) ₂ HP0 ₄	1,0	0,353	Б	20
KN ₂ P0 ₄	0,5	0,18		
Вода		18		
Конденсат Б		2	В	13
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,15	0,05		
Вода		18,2		
Конденсат В		1,8		
Разом:				353

**Примітка:* Стерилізацію композиції А проводять у ферментері, оскільки вона має жорсткіший режим стерилізації, композицію Б і В стерилізують окремо у збірниках. Конденсат порохований від загального об'єму середовища.

3.2.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для посівного апарату

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

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 36 / (1 - 0,1) = 40 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в ферментері складе:

$$V_{\text{пс}} = V_{\text{ф}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 36 / (1 + 0,1) = 36,36 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву ферментера: $V_{\text{пмф}} = V_{\text{ф}} - V_{\text{пс}} = 36,36 - 36 = 0,36 \text{ л.}$

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}}$ складуть:

Таблиця 3.3.

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для інокулятора

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л (мл/л)	Кількість для приготування 40 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції
Глюкоза	120	4,8	А	35
Вода		28		
Конденсат А		2,2		
(NH ₄) ₂ HP0 ₄	1,0	0,4	Б	3
KN ₂ P0 ₄	0,5	0,2		
Вода		3,5		
Конденсат Б		0,5	В	2
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,15	0,06		
Вода		2		
Разом:				40

**Примітка: Стерилізацію композиції А проводять у ферментері, оскільки вона має жорсткіший режим стерилізації, композицію Б і В стерилізують окремо у збірниках. Конденсат порахований від загального об'єму середовища.*

РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведена у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
Н-38, Н-40, Н-42	Насоси відцентрові	3	Насос відцентровий герметичний з нержавіючої сталі ЦГ Насос 25/50К-5,5-5. Продуктивність від 50 л - 100 м ³ /год, Потужність 0,5-5,5 кВт, напір 50 м Фірми «Grundfos».
З-37	Збірник культуральної рідини	1	Об'єм 6000 л, швидкість обертів мішалки 60 об/хв; н/сталь ТМ Промвіт, ООО (0,7 × 0,3 м)
ФП-39	Фільтр-прес	1	Продуктивність, м ³ /год – 1,55; Потужність, кВт – 0,6;габарити, мм – 1000*270*800; вага, кг – 35; країна виробник - Італія
ВА-41, ВА-43, ВА-45	Вакуум-випарний апарат двоконтурний	2	Трьохкорпусна вакуум-випарна установка, поверхня нагріву 800 м ² , висота труб 8м, продуктивність 50-100 кг випареної вологи за годину.
БС-46	Барабанна сушарка	1	Продуктивність, т/добу – 30-40; Витрата агента сушіння, м ³ /год – 4500-5000; Потужність привода ротора, кВт – 5,5; габарити, мм – 3550*1260*2055; вага, кг – 1650; країна виробник - Україна

Примітка: пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел: <http://attis.prom.ua/>, <http://www.agro-mash.ru/index.htm>, <https://prom.ua/>, <https://www.flottweg.com/>, <https://www.eppendorf.com> (ємнічне обладнання), <http://ua.grundfos.com>, https://prom-nasos.com.ua/ua/filtration/filter-presses/colombo-36-ramniy-f-ltr-pres/?gclid=Cj0KCQiA3uGqBhDdARIsAFeJ5rIgHiVfjeopQ7X9LkcZnoA4kIFMsDhaf_JFoW4h7Y3t3gGjI-aBGQcaAomKEALw_wcB (фільтр-прес), <https://simo.com.ua/ua/obladnannya/barabannaya-sushilka-bs>

НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ				
Змн.	ЛистЛ	№ докум.№	ПідписПі	ДатаД
Розроб.		Гимоцуж О.А.		
Перевір.		Карлаш Ю.В.		
Консультант				
Н. Контр. Н.				
Затверд.		Стабніков В.П		
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ			Літ.Літ.	Арк.Арк.
				5
			АркушівАркуш	1
Кафедра БТМ				

5. ОБГРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Оскільки цільовим продуктом виробництва є глюконо-дельта-лактон, а в результаті біосинтезу ми отримуємо глюконову кислоту, необхідно розробити технологію отримання ГДЛ з глюконової кислоти. Глюконо-дельта-лактон або E575 є внутрішнім ефіром глюконової кислоти.

Глюконова кислота є позаклітинним метаболітом, тому першим етапом постферментаційних процесів є відділення біомаси продуцента від культуральної рідини. Після цього культуральну рідину подають на упарювання під вакуумом та кристалізацію ГДЛ [26].

5.1. Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання

В залежності від властивостей біомаси та рідини, можуть бути використані різні методи для відділення бактеріальних клітин:

- Коагуляція - це процес, що включає додавання до суспензії реагентів, які сприяють збільшенню розмірів клітинних агрегатів і їх осадженню, після чого вони відокремлюються від рідини шляхом відстоювання. Однак цей метод має недоліки у вигляді низької ефективності та використання реагентів, що можуть бути небезпечними для довкілля.

- Відстоювання - це процес розділення під впливом гравітаційних сил, що зазвичай використовується при очищенні стічних вод, але є менше ефективним для відділення біомаси з культуральної рідини.

- Фільтрація - це метод, при якому суспензія пропускається через фільтруючий матеріал, де частинки твердої фази, такі як біомаса, залишаються на поверхні фільтра. Цей метод застосовується у виробництві антибіотиків, особливо тоді, коли мікроорганізм-продуцент має міцеліальну структуру [28].

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ					
Змн.	ЛистЛ	№ докум.№	ПідписПі	ДатаД	СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ					
Розроб.	Гимоцук О.А							Літ.Літ.	Арк.Арк.	АркушівАркуш
Перевір.	Карлаш Ю.В.								5	1
Консультант								Кафедра БТМ		
Н. Контр. Н.										
Затверд.	Стабніков В.П									

- *Флотація* – захоплення біомаси мікроорганізмів бульбашками піни і виділення її з пінної фракції. Недоліком є часте засмічення отворів пористого матеріалу, який використовується у флотаторах (апаратах для флотації) складність підбору матеріалу з однаковими отворами, що забезпечує утворення дрібних і рівних за розміром бульбашок.

- *Сепарація, центрифугування* – поділ під дією відцентрових сил. Метод має такі переваги перед фільтруванням та іншими методами:

- Немає потреби в застосуванні фільтрувальних елементів;
- Матеріал обробляється з найменшими втратами активної речовини;
- Процес легше піддається автоматизації, агрегати займають відносно мало місця, легше мити устаткування [29].

Найбільш ефективним методом для відділення бактерій від культуральної рідини є метод центрифугування. Тому для нашого виробництва ми обираємо центрифугу фірми «Flottweg», Німеччина. Цей тип центрифуги застосовують для обробки м'якого, текучого осаду, особливо у випадках, коли тверда фаза дуже важко осаджується. Одночасно він переробляє, як декантер, велику кількість твердих речовин в подається середовищі і дозволяє отримати суху тверду речовину на виході [30].

Типові сфери застосування:

- відділення біомаси з культуральної рідини в процесах мікробного синтезу;
- перероблення рослинних протеїнів, наприклад, з сої;
- витягання пива з пивної дробини тощо.

Будова центрифуги забезпечує гігієнічний дизайн, завдяки чому обладнання підходить для застосування в біотехнології; можливість регуляції диску розділення фаз для розділення продуктів з неоднорідним складом; можливість забезпечення газонепроникності шляхом запобігання проникнення навколишнього повітря в область розділення за допомогою використання інертного газу [30].

Фільтр-прес Автоматизований камерний модифікований (ФПАКМ)

Фільтр-преси типу ФПАКМ призначені для розділення тонко дисперсних суспензій при температурі до 80°C. Цей фільтр дозволяє проводити за заданого програмного забезпечення в автоматичності режимі технологічні та допоміжні операції (фільтрування, промивання, пресування, підйом і спускання фільтрувальних плит. Фільтр-прес ФПАКМ має ряд переваг перед іншими фільтрами. Він володіє розгорнутим фільтруванням по всій верхній, займає невелику виробничу площу, дає змогу отримати осад вологістю 60-70% при порівняно малій втраті електроенергії (0,8-1 кВт фільтрувальної поверхні), що збільшує об'єм виробництва за допомогою установки в 6-8 разів у порівнянні з іншими фільтр-пресами [35].

Автоматичний камерний фільтр-прес ФПАКМ складається з горизонтальних фільтрувальних плит, розташованих одна над іншою між опорними і натискними плитами. При опусканні плит між ними утворюється щілина в 45 мм, а розташовані зверху і знизу опорна і натискна плити, які мають бічні патрубки, утворюють колектори подачі суспензії і відведення фільтрату. У щілинах між плитами протягнута нескінчена стрічка фільтрувальної тканини марки Ф товщина 1,5-2 мм. Кожна фільтрувальна плита має зверху решітку, на якій міститься тканинна стрічка з осадам, що утворився, а під решіткою - піддон для прийняття фільтрату. Під піддонами закріплена еластичний гумова діафрагма, за допомогою якої під лещатами здійснюють віджимання осаду.

Фільтр-прес працює наступний чином. Культуральна рідина подається по бічним цівкам колектора одночасно до всіх плит. Де відбувається фільтрування. Фільтрат поступає в збірник, а осад залишається на поверхні фільтрувальної тканини. Відділення культуральної рідини від біомаси відбувається достатньо добре, і фільтрат виходить при фільтрації і відпресовуванню осаду при тиску 0.4 МПа. При збільшенні тиску до 0,8 МПа і витримуванні протягом 5-6 хв. залишкова вологість осаду досягає 65-70%. Рідина для промивання осаду

подається на фільтр-прес спеціальним насосом, яка потім самопливом спускається в резервуар промивного фільтра.

Стрічка, на якій в робочих камерах утворюється осад, починає працювати лише після припинення подачі суспензії та розкриття фільтра, коли між плитами утворюється щілина до 45 мм для виходу стрічки з осадом. При русі стрічки осад виходить з міжплиточного простору і вивантажується з двох сторін. Фільтрувальна тканина промивається холодною водою за допомогою форсунок під тиском 0,3 МПа і очищується скребками чи щітками. Під час руху стрічки між плитами чергується положення, що забезпечує її повне очищення.

Після очищення стрічки фільтрувальні плити затискаються и цикл повторюється [35].

Питома продуктивність фільтр-преса ФПАКМ при концентрації твердої фази в суспензії 4-7 г/л складає близько 100, тиск - 1,2 МПа.

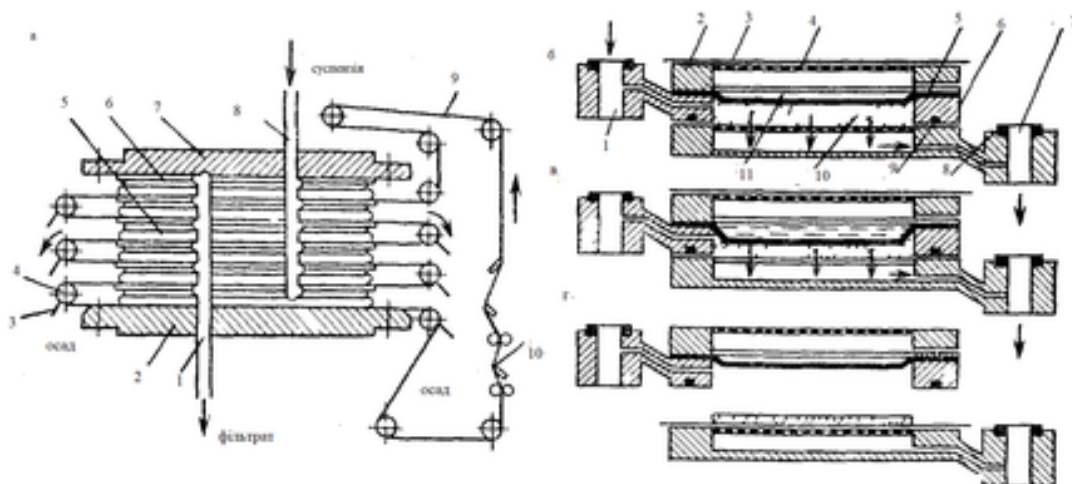


Рис.5.1. Вертикальний фільтр-прес типу ФПАКМ: а) загальний вигляд: 1, 8 – колектори; 2 – натискна рама; 3, 10 – ножі; 4 – направляючі ролики; 5 – упорна рама; 6 – фільтрувальні плити; 7 – опорна плита; 9 – фільтрувальна стрічка; б, в, г) окремі етапи роботи фільтра: 1,7 – колектор; 2 – фільтрувальна плита; 2 – фільтрувальна тканина; 4 – перфорований лист; 5 – гумова діафрагма ; 6 – рама; 8 – кільцева прокладка; 9 – гумовий шнур; 10, 11 – простір між гумовою діафрагмою і фільтрувальною тканиною

Оскільки при отриманні глюконової кислоти передбачається використання у якості продуцента *Aspergillus niger* ORS-4, то доцільним буде використання саме фільтр-пресу типу ФПАКМ; у випадку використання у якості біологічного агента саме *Pseudomonas fluorescens*, то використовувати краще центрифугування.

5.2. Попередня обробка супернатанту

Перетворення глюконової кислоти на ГДЛ та виділення цільового продукту відбувається у висококонцентрованих розчинах глюконату. Для цього розчин подають на упарювання під вакуумом. Це проводять для того, щоб підвищити концентрацію глюконової кислоти в розчині та полегшити подальше виділення ГДЛ. Розчин глюконату упарюють до кінцевої концентрації 35-50 % [31,32].

Вакуум-випарний апарат — апарат, в якому проводять процеси концентрування рідких розчинів нелетких речовин шляхом часткового видалення розчинника при кипінні рідини в умовах вакууму. При випарюванні під вакуумом можна проводити процес при більш низьких температурах, що запобігає руйнуванню речовин, схильних до розкладання при дії високих температур. У фармацевтичній промисловості цей метод застосовують для концентрування розчинів, що киплять при високій температурі, з метою економії енергоносіїв та зменшення часу проведення технологічного процесу; розчинів термолабільних речовин (екстракти, настойки, гормони, ферменти, біогенні стимулятори тощо).

Вакуум-випарні установки класифікують за способом дії – установки неперервної і періодичної дії, за кількістю корпусів розрізняють однокорпусні і багатокорпусні, за конструктивним виконанням нагрівальних поверхонь – установки з трубчастими і пластинчастими калоризаторами; в залежності від нагрівального агента – установки з паровим, аміачним і фреоновим обігрівом; від умов кипіння продукту – циркуляційні і плівкові.

На промислових підприємствах використовують два типи ВВА.: вертикальні та горизонтальні. Апарати, що використовуються, можуть мати

різні видозміни в конструктивному плані. Найтипівішим ВВА є вертикальний з підвісною випарною камерою (рис. 8.1) [33].

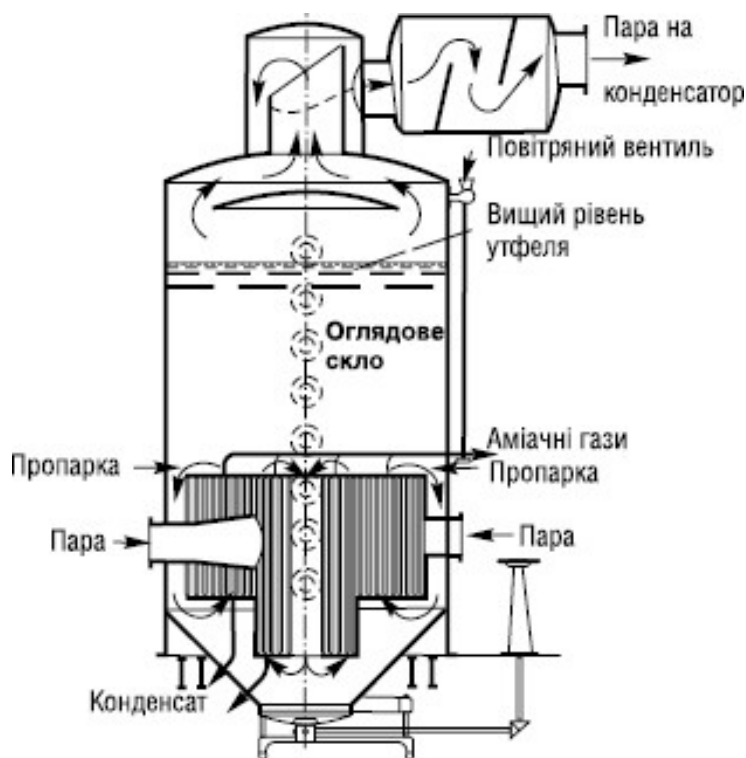


Рис.5.2. Схема будови вакуум-випарної установки

5.3. Вибір способу виділення цільового продукту з супернатанту

Виділення цільового продукту з розчину здійснюється різними методами, загальними для позаклітинних і внутрішньоклітинних продуктів:

Екстракція - перехід цільового продукту з водної форми в воду органічну рідину (екстрагент). Найбільш поширене виділення жироподібних речовин рідкими вуглеводнями (типу бензину), але застосовуються і багато інших видів екстрагентів (хлороформ, ефір, бутилацетат). Екстракція прямо з твердої фази (в тому числі і біомаси мікроорганізмів) називається екстрагуванням. Особливим випадком є холодова екстракція (кріоекстракція), коли передбачається виділення продуктів із заморожених зразків, в цьому випадку використовуються розчинники з низькою температурою кипіння, які при кімнатній температурі переходять в газоподібний стан. Кріоекстракція часто використовується в комбінації з кріоконсервації клітин [34].

Осадження - виділення цільового продукту шляхом додавання до рідини реагенту, що взаємодіє з розчиненим продуктом і переводять його в

тверду фазу. Осадження проводять фізичними (нагрівання, охолодження, розбавлення або концентрування розчину) або хімічними методами. Так, пеніцилін переводять в кристалічний осад у присутності сполук калію або натрію. Білки беруть в облогу додаванням сульфату амонію, органічних розчинників (етанолу, ацетону).

Адсорбція - переклад розчиненого в рідині продукту в тверду фазу шляхом його осадження (сорбції) на спеціальних твердих носіях (сорбенти). Хорошим адсорбентом є деревне вугілля, глини з розвиненою пористою поверхнею. Шляхом адсорбції виділяють антибіотики і вітаміни.

Іонний обмін - той же, що і адсорбція, але в цьому випадку в тверду фазу переходять іони (катіони або аніони), а не цілком молекула цільового продукту [34].

Перегонка, ректифікація - ці методи використовують для виділення розчинених в культуральній рідині легкокипящих продуктів. Приклад - етиловий спирт.

Ультрафільтрація, нанофільтрація і зворотний осмос застосовуються для виділення високомолекулярних сполук (білків, поліпептидів, полинуклеотидов). Зворотний осмос і нанофільтрація дозволяють відокремлювати навіть невеликі за розміром молекули [34].

Класичним способом одержання ГДЛ є осадження його у вигляді кристалів з концентрованого розчину глюконової кислоти. Після випарювання в розчин додають затравку та здійснюють кристалізацію ГДЛ при перемішуванні 20-60 об/хв, охолоджуючи масу по спеціальному режимі:

- 70-65 °С - зі швидкістю 0,5-0,6 л за год;
- 65-55 °С - зі швидкістю 0,8-1 л за год;
- 55-45 °С - зі швидкістю 0,4-0,5 л за год;
- 45-40 °С - зі швидкістю 0,3 л за год;

Отриману масу витримують при 40 °С 2 год. Утворені кристали ГДЛ відділяють від маточного розчину и промивають питною водою на центрифугі при температурі 35±2 °С [29,30].

Промивні води збирають та фільтрують через вугільний фільтр

Вугілля може бути у фільтрах як у гранульованій, так і спресованій формі. Якщо вугільний фільтр використовується як частина якоїсь системи очистки, то такий картридж видаляє ще й крупнодисперсні сполуки та важкі метали. Зараз часто використовують кокосове вугілля, яке до 4 разів краще адсорбує шкідливі домішки, ніж вугілля виготовлене із деревини.

Вугілля повинно відповідати наступним вимогам:

- рН водної витяжки повинен бути в межах 4,5–5,0;
- хлориди, сульфати, солі кальцію і важких металів повинні бути відсутні;
- вміст солей заліза не більше 0,003% [33].

Для освітлення та очищення обрано високоякісне вугілля ОУ-А (ГОСТ 4453-74), як виготовляють з екологічно чистої сировини (деревини берези) під дією водяної пари за температури 800...900 °С з подальшим подрібненням. Воно являє собою дрібнодисперсний порошок чорного кольору, має сильно розвинену загальну пористість, широкий діапазон пор і велику величину питомої поверхні (більше 1200 м²/г). Вугілля ідеально підходить для очищення і освітлення різних рідин і розчинів (особливо від домішок органічного характеру з середньою і високою молекулярною масою).

Вугілля має такі характеристики:

- Активність за метиленовим синім 225 мг/г;
- 95 % частинок мають діаметр менше 100 мкм;
- Вміст сполук заліза в перерахунку на Fe, % - не більше 0,2.

Для довгої експлуатації необхідно дотримуватися певні обмеження:

- Тиск системи не повинен бути вище восьми атмосфер;

Заборонено використовувати активоване вугілля у системах гарячого водопостачання, оскільки при експозиції високим температурам цей тип фільтра швидко втрачає свої корисні властивості. • Не слід встановлювати вугільні фільтри поруч з нагрівачами, оскільки система підігріву, розташована поблизу фільтра, може вплинути на його ефективність. Якщо фільтр

встановлюється поруч з системою підігріву, необхідно дотримувати відстань. • В приміщеннях, де планується встановлення пристрою, рівень вологості не повинен перевищувати 70%. • Для того щоб уникнути потрапляння частинок вугілля у вже очищену воду, рекомендується використовувати додаткові етапи очищення для видалення дрібних механічних забруднень.

5.4. Вибір способу сушіння та сушарки

Сушку кристалів проводять при 50-55°C [29,34].

Для сушіння кристалів може використовуватися вакуумна сушильна шафа.

Вакуумні сушильні шафи, схожі на сублимаційні сушарки, призначені для висушування нетерmostійких продуктів, але процес відбувається за кімнатної або підвищеної температури, що витримується продуктом, наприклад, деякими видами антибіотиків. Ці пристрої призначені для сушіння невеликих обсягів вологого матеріалу. Сушарка має форму циліндричної камери, виготовленої з металу товщиною 10 мм. Діаметр камери зазвичай коливається від 1,4 м до 2 м, але в даний момент випробовується камера діаметром 2,7 м. Внутрішня довжина камери може бути 4,5 м або 6 м. Система завантаження складається з приставної естакади, що є знімним зовнішнім продовженням колій всередині камери.

Слід зазначити, що вакуумна система, яка комплектується сушаркою, має два типи, що різняться за продуктивністю та ціною. Вакуумна система з продуктивністю 5 л/с компактна і встановлюється безпосередньо на сушарці. Вона може обслуговувати кілька камер з діаметром до 1,6 м. Ця система є більш економічною, але потребує обережного використання. Вакуумна система з продуктивністю 20 л/с монтується на окремій станині і менш вимоглива в експлуатації. Вона застосовується на камерах з діаметром 2 м або 2,7 м.

Система нагрівання являє собою обшивку навколо камери, де циркулює тепла вода. Джерело енергії вибирає замовник, після чого сушарка адаптується під зазначений вид палива або під два види палива. Наприклад: електрика і відходи деревини. Електричний котел вмонтований безпосередньо в сушарку, і

циркуляція води здійснюється без додаткового насосу. Потужність, яка потрібна для обігріву камери, залежить від її об'єму і коливається від 4 кВт/год до 12 кВт/год. Рівень температури підтримується автоматично. Вентилятори не застосовуються. Рівномірність прогріву забезпечується конструкцією камери. Система відводу вологи конденсаційна. Охолодження конденсатору здійснюється водою з центрального водогону або охолоджувачем, який можна замовити додатково. Завдяки такій системі відводу вологи значно знижені витрати тепла на сушіння деревини.

Система контролю процесу сушіння ґрунтується на вимірюванні конденсату, який витікає з сушарки та збирається у вологозбірнику. Вологозбірник розташований за межами камери. Кількість конденсату, який повинен вийти із завантаженої деревини, вираховується за методикою, яка наводиться в інструкції з експлуатації. Точність виміру така сама, як і з приладами, але при цьому в штабелі з деревиною немає кабелів, які постійно псуються робітниками в результаті необережного поводження [31,32].

Барабанна сушарка

Барабані сушарки у переважній більшості це атмосферні сушарки, в яких сушильним агентом є повітря або топкові гази у суміші з повітрям. Основний елемент сушарки є барабан, який обертається на підшипникових опорах, опираючись на них бандажами. Барабан обертається за допомогою зубчастого вінця, який зчеплений з зубчастим колесом, котрий вже у свою чергу приводиться в дію за допомогою електродвигуна з редуктором. Діаметр барабана залежить від продуктивності і може варіювати в межах 1200...2800 мм. Барабан встановлюють горизонтально або під невеликим кутом в сторону перемішування матеріалу, що сушиться. З метою покращення контакту матеріалу, що сушиться, з сушильним агентом встановлюється внутрішня насадка (Рис.5.4) [35]. Внутрішню частину барабана викріплено лопатями, які рухаючись разом з обертанням барабана, захоплюють матеріал та розсипають його тонкими паралельними каскадами, які займають всій простір в середині барабана. Гарячі гази між цими каскадами, що падають вниз разом із

матеріалом, безпосередньо контактують з вологими поверхнями його частинок. Частина матеріалу залишається на дні барабана і піддається іншому типу теплообміну, у відмінну від того матеріалу, який розсипається у вигляді каскадів. Кількість каскадів, що утворюються в сушильному барабані, залежить від кількості та форми лопатей. Для ефективної роботи сушильних барабанів важливо враховувати:

- герметичність установки при завантаженні та вивантаженні матеріалу;
- використання належних насадок;
- початкова температура газів, що використовуються як сушильний агент;
- швидкість обтікання газами матеріалу всередині сушарки.

Режим роботи барабанних сушарок значно залежить від розміру та вологості матеріалу, який необхідно висушити. Коефіцієнт заповнення матеріалом перетину сушильних барабанів зазвичай коливається від 0,15 до 0,25. Температура сушильного агента може досягати 1100°C , а швидкість його руху на виході з барабана зазвичай не перевищує 5 м/с, за винятком дрібного матеріалу, де швидкість може бути від 0,5 до 1 м/с, а температура агента при виході з сушарки зазвичай коливається від 70 до 150°C . Тривалість процесу сушіння може становити від 15 до 40 хвилин, і кількість обертів барабана за одну хвилину зазвичай варіюється від 1 до 6, щоб забезпечити відповідний час перебування сушеного матеріалу в барабані. [35].

При порівнянні з розпилювальною сушаркою, сушарка барабанного типу буде більш доцільною при отриманні глюконової кислоти.

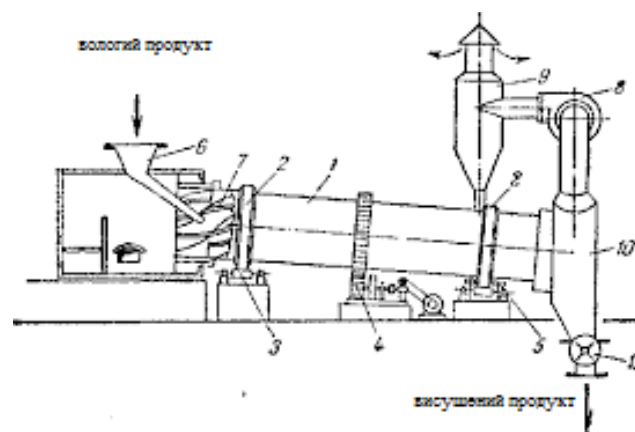


Рис.5.3. Схема будови барабанної сушарки 1 - барабан; 2 - бандажі; 3 - опорні ролики; 4 - передача; 5 - опорнонаполегливі ролики; 6 - живильник; 7 - лопаті; 8 - вентилятор; 9 - циклон; 10 - розвантажувальна камера; 11 - розвантажувальний пристрій.

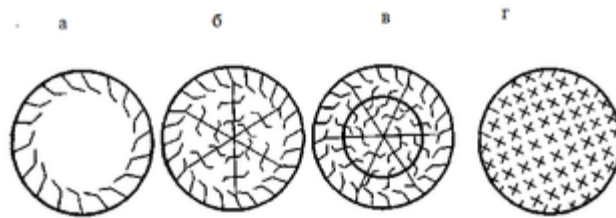


Рис.5.4. Типи внутрішніх насадок: а- периферійна, б – секторна, в – секторна з внутрішнім кільцем, г – хрестоподібна

РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Контроль виробництва включає в себе мікробіологічний контроль, визначення вмісту джерела вуглецю (глюкоза) та азоту (NaNO_3), а також концентрації біомаси та вмісту цільового продукту у біомасі.

6.1. Мікробіологічний контроль

Ціль мікробіологічного контролю – визначення якості посівного матеріалу та відсутності сторонньої мікробіоти після стерилізації. Мікробіологічний контроль здійснюється мікроскопіюванням, а також розсівом на чашки Петрі з агаризованим середовищем. Контроль чистоти культуральної рідини необхідно здійснювати на всіх стадіях одержання посівного матеріалу та біосинтезу.

Проводять розсів культуральної рідини петлею на чашки Петрі з м'ясо – пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій та з суслоним – агаром (СА) або глюкозно – картопляним агаром (ГКА) – для виявлення грибів та дріжджів. На середовищі для виявлення грибів (сусло-агар) повинні утворитися лише колонії продуцента. На середовищі для виявлення грибів повинні утворитися лише колонії *Aspergillus niger* (пухнасті колонії, спочатку білого кольору, а потім, в залежності від виду, вони приймають різну забарвлення, пов'язану з метаболітами гриба і спороношенням. Міцелій гриба дуже сильний, з характерними для вищих грибів перегородками.). Наявність будь-яких інших колоній на середовищі для виявлення грибів та наявність колоній на середовищі свідчить про мікробну контамінацію культуральної рідини.

Для мікроскопіювання використовують препарат «роздавлена крапля». Для приготування препарату «роздавлена крапля» на знежирене предметне скло наносять краплину культуральної рідини і накривають накривним скельце.

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ		
Змн.	ЛистЛ	№ докум.№	ПідписПі	ДатаД	КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА		
Розроб.		Гимоцук О.А.			Літ.Літ.	Арк.Арк.	АркушівАркуш
Перевір.		Карлаш Ю.В.				5	1
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр. Н.							
Затверд.		Стабніков В.П					

Препарат розглядають з об'єктивом 20x та 40x, а також здійснюють мікроскопіювання препарату з імерсійною системою. При мікроскопію ванні повинні бути виявлені лише клітини продуцента.

Відбір проби

Під час відбору проб потрібно спостерігати за умовами стерильності, пробірки повинні легко відкупорюватися, для зменшення ризику забруднення. Відбір здійснюється в пробірку, проводиться піпеткою – 5 мл, кожні 8 годин, яка повинна мати вату на кінці та бути стерильною. Після відбору суспензію центрифугують 20 хвилин, 3000 об/хв. Під час центрифугування відбувається розділення на тверду та рідку фазу, після чого у фугаті відбирається рідина для визначення, глюконової кислоти та концентрації глюкози .

6.2. Показники росту та синтезу

Концентрація біомаси. Міцелій продуцента відокремлюють фільтруванням. Паперовий фільтр розміщують у скляну лійку й фільтрують через нього точно вимірний обсяг культури, від 5 до 10 мл. Осад на фільтрі багаторазово промивають підкисленою дистильованою водою. Фільтр із осадом клітин мікроорганізмів розміщують у сушильну шафу, висушують і зважують. Концентрацію біомаси (г/л) визначають за різницею маси фільтра.

Концентрація глюконової кислоти. Визначення масової частки глюконової кислоти в фільтраті культуральної рідини

Пробу фільтрату культуральної рідини в обсязі 50 мл поміщають в термостійкий стакан місткістю 250 см³ нагрівають до кипіння, додають вуглекислий кальцій, кількість якого розраховують так, щоб на 1 г загальної масової концентрації органічних кислот в пробі знаходилося 0,78 г вуглекислого кальцію. Після осідання піни розчин кип'ятять протягом 10 хв і перевіряють реакцію середовища за індикаторним папером. У разі кислої реакції до розчину додають 0,1 г вуглекислого кальцію, кип'ятять 2-4 хв і перевіряють реакцію середовища за індикаторним папером. Так надходять до досягнення нейтральної реакції. Після цього додають 0,5 мл розчину хлористого амонію і поміщають на 30 хв на киплячу водяну баню. Гарячий

розчин фільтрують через паперовий фільтр і осад промивають дистильованою водою температурою $(90 \pm 10)^\circ \text{C}$ до негативної реакції на присутність хлорид-іонів (до 1 мл промивної води, відібраної в пробірку, додають кілька крапель розчину азотнокислого срібла, відсутність помутніння свідчить про повне видалення хлорид-іонів). Обсяг фільтрату і промивних вод вимірюють мірним циліндром, з огляду на об'єм промивної води, відібраної для визначення хлорид-іонів. Після цього фільтрат і промивні води нагрівають до кипіння, доливають 15 мл киплячого насиченого розчину шавлевокислого амонію по 3.6.8 (для осадження іонів кальцію). Розчин кип'ятять протягом 10 хв, охолоджують до температури від 20°C до 25°C , фільтрують через паперовий фільтр і промивають осад дистильованою водою температурою від 20°C до 25°C до негативної реакції на присутність хлорид-іонів. Осад розчиняють в 30 мл розчину сірчаної кислоти, нагрівають до температури 80°C і титрують розчином перманганату калію до появи рожевого забарвлення, що не зникає протягом 1 хв.

Масову частку глюконової кислоти в перерахунку на моногідрат кислоти в фільтраті культуральної рідини %, обчислюють за формулою:

$$X_{\text{к}} = \frac{0,007V_1}{V_3\rho} \cdot 100, \quad (6.1.)$$

де 0,007 - кількість моногідрату кислоти, що відповідає 1 мл марганцевокислого калію молярної концентрації 0,1 моль / л

V_1 - об'єм марганцевокислого калію молярної концентрації 0,1 моль / л, що був використаний на титрування, мл

V_3 - об'єм фільтрату культуральної рідини взятий на аналіз, мл

ρ - густина фільтрату культуральної рідини.

6.3. Визначення концентрації джерел вуглецю та азоту

Концентрація глюкози

Визначення рівня глюкози проводять за допомогою глюкозооксидазного методу. Спочатку культуральну рідину центрифугують протягом 20 хвилин при

швидкості 3000 обертів на хвилину. Отриманий супернатант розбавляють у 100 разів дистильованою водою. Потім у пробірці змішують 0,3 мл супернатанту з 15 мл трихлороуксусної кислоти, та аналогічну кількість трихлороуксусної кислоти в іншу пробірку (контроль). До обох пробірок додають 2 мл розчину фосфату натрію та 0,1 мл розчину глюкозооксидази, перемішують і залишають при кімнатній температурі протягом 1 години. Після цього проводять аналіз на фотоелектроколориметрії при довжині хвилі 530 нм, а розрахунки здійснюють за допомогою калібрувального графіка.

Концентрацію нітратів визначають у супернатанті, отриманому після центрифугування культуральної рідини протягом 30 хвилин при швидкості 5000 обертів на хвилину. Вимірювання здійснюють за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з використанням колонки Anion IC-PAKTM та УФ-детектора з хвильовою довжиною 220 нм. Умови визначення включають швидкість потоку рухомої фази 1,2 мл/хв та об'єм проби для аналізу 50 мкл.

6.4 Контроль готової продукції

Визначення масової частки основної речовини

Метод оснований на гідролізі глюконо-дельта-лактону до глюконової кислоти в присутності гідроксиду натрію, утворення глюконату натрію та титрування надлишку гідроксиду натрію розчином соляної кислоти при використанні як індикатора фенолфталеїну.

Від 0,75 до 0,65 г аналізованої проби глюконо-дельта-лактону вносять в сухий стаканчик. Результат записується з точністю до третього знаку. Проби кількісно переносять в конічну колбу на 250 мл і розчиняють в 50 мл розчину гідроксиду натрію. Потім витримують протягом 20 хв. добавляють два-три краплі розчину фенолфталеїна та титрують надлишок гідроксиду натрію розчином соляної кислоти.

Масову долю глюконо-дельта-лактону X „%“, розраховують за формулою

$$X = \frac{(50K - V) * 0.01781 * 100}{m}$$

де 50 - величина розчину гідроксиду натрію молярної концентрації з (NaOH) = 0,1 моль / дм³, см³:

K - поправковий коефіцієнт титра розчину гідроксиду натрію: визначають по ГОСТ 25794.1.

V - об'єм розчину соляної кислоти молярної концентрації з (HCl) = 0,1 моль / дм³. см³;

0.01781 - кількість глюконо-дельта-лактона, відповідна 1 см³ розчину гідроксиду натрію молярної концентрації з (NaOH) = 0,1 моль / дм³. г / см³;

100 - коефіцієнт перерахунку в відсотки:

m – маса проби

6.5. Визначення вологості у готовому продукті

Вміст води визначається за допомогою приладу MB45 OHAUS — аналізатор вологості з інфрачервоним типом сушіння. Завдяки використанню сучасної технології нагрівання з вбудованим високоточним вологоаналізатором серії MB45, дають можливість проводити швидкий та точний аналіз вмісту води різних зразках.

Основні особливості: висока точність і відтворюваність результатів; просте управління процесом; великий дисплей з інформацією про масу, температуру і вологості в режимі реального часу; широкий температурний діапазон. Окремо поставляються: температурний калібрувальний набір; калібрувальний вантаж; багаторазові чашки з нержавіючої сталі (3 шт.); одноразові алюмінієві чашки (50 шт.); скловолоконні диски.



Рис.6.1. Прилад MB45 OHAUS для визначення вмісту вологи.

Методика проведення аналізу: 10г порошку поміщають на алюмінієву чашу, яку ставлять в апарат. Вмикають на 5 хвилин. По закінченню часу, на дисплеї буде показано вміст вологи

РОЗДІЛ. 7 ОПИС ТОВАРНОЇ ФОРМИ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ. ПРОЕКТ ТЕХНІЧНИХ УМОВ (ТУ)

Загальні технічні вимоги

1.1 Характеристики

1.1.1 Харчова добавка E575 є внутрішнім ефіром глюконової кислоти.

Формула емпірична C₆H₁₀O₆

1.1.2 Харчовий глюконо-дельта-лактон виробляють відповідно до вимог та до стандарту, і застосовують у харчових продуктах відповідно до вимог або нормативно правовим актами, що діють на території країни.

1.1.3 Харчовий глюконо-дельта-лактон добре розчинний у воді та погано розчинний у етанолі.

1.1.4 За органолептичними показниками харчовий глюконо-дельта-лактон має відповідати вимогам, що зазначені у таблиці 7.1.

Таблиця 7.1

Органолептичні показники

№	Найменування показника	Характеристика
1	Зовнішній вигляд	Кристали або кристалічний порошок
2	Колір	білий
3	Запах	Без запаху або майже без запаху
4	Смак	Слабкий солодкуватий, що переходить у кислий

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ			
Змн.	ЛистЛ	№ докум.№	ПідписПі	ДатаД	ОПИС ТОВАРНОЇ ФОРМИ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ. ПРОЕКТ ТЕХНІЧНИХ УМОВ	Літ.Літ.	Арк.Арк.	АркушівАркуш
Розроб.	Гимоцук О.А.						5	1
Перевір.	Карлаш Ю.В.					Кафедра БТМ		
Консультант								
Н. Контр. Н.								
Затверд.	Стабніков В.П							

1.1.5 За фізико-хімічними показниками харчовий глюконо-дельта-лактон має відповідати вимогам, зазначеним у таблиці 7.2.

Таблиця 7.2

Фізико-хімічні показники

№	Найменування показника	Характеристика (значення) показника
1	Кольорова реакція із хлоридом заліза	Витримує випробування
2	Тест на глюконат	Витримує випробування
3	Масова частка глюконо-дельта-лактону (C ₆ H ₁₀ O ₆) %, не менше	99,0
4	Масова частка редукуючих речовин (у перерахунку на D-глюкозу), %, трохи більше	0,5
5	Масова частка втрат при висушуванні, % не більше	1,0
6	Масова частка сульфатної золи, %, не більше	0,1

1.1.6 Вміст токсичних елементів (свинець) у харчовому глюконо-дельта-лактоні не повинен

перевищувати норм, що встановлені нормативно правовими актами, що діють на території країни.

1.2 Вимоги до сировини

1.2.1 Для виробництва харчового глюконо-дельта-лактону як сировину використовують харчову

глюконову кислоту за нормативним документом, що діє на території країни.

1.2.2 Допускається застосування аналогічної сировини, що забезпечує отримання харчового глюконо-дельта-лактону відповідно до вимог цього документу та дозволеного до застосування

в харчовій промисловості на території країни.

1.3 Упаковка

1.3.1 Упаковка, маркування, транспортування та зберігання препарату
Препарат пакується відповідно до вимог стандартів щодо упаковки, маркування, транспортування та зберігання. Глюконо-дельта-лактон фасується у сухі, чисті поліетиленові мішки або мішки з поліетиленової плівки масою нетто 12 кг, які подальше упаковуються в паперові мішки. При цьому маса нетто може відрізнятись на $\pm 1,5\%$. Шви поліетиленових мішків повинні бути герметичними, включаючи завантажувальний отвір, а паперові мішки зшиваються машинним способом з бавовняними нитками, залишаючи гребінець не більше 3 см по всій ширині мішка. Глюконо-дельта-лактон розфасовується в сухі, чисті поліетиленові мішки відповідно до ДСТУ 17811-78 або мішки з поліетиленової плівки за ДСТУ 10354-82, кожен мішок має масу нетто 12 кг. Потім ці мішки упаковуються в паперові мішки згідно з ДСТУ 2226-88. Допускається відхилення маси нетто на рівні $\pm 1,5\%$. Шви поліетиленових мішків повинні бути зварені, включаючи шов завантажувального отвору. Паперові мішки зшиваються машинним способом бавовняними нитками згідно з ДСТУ 14961-91 або ДСТУ 6309-93, при цьому залишається гребінець ширини не більше 3 см по всій ширині мішка. Зшивання та зварювання мішків забезпечують їх міцність та герметичність. [61].

Транспортне маркування виробляють за ДСТУ 14192-96 на паперовий мішок з нанесенням знака «Берегти від вологи» та маркування, що характеризує продукцію:

- Найменування підприємства-виробника та його товарний знак;
- Найменування препарату;
- Номер партії;
- Маса нетто;
- Дата виготовлення;
- Масова частка вологи;
- Ферментативна активність;
- Найменування наповнювача;

Гарантійний термін зберігання;

Продукція має бути позначена згідно з нормативно-технічною документацією. Глюконо-дельта-лактон транспортується будь-яким видом транспорту, за винятком морського, у критих транспортних засобах згідно з правилами перевезення вантажів, чинними для цього виду транспорту та пунктом 3.3. ДСТУ 26142-84. Препарат зберігається у сухому приміщенні при температурі не вище 25°C та не нижче мінус 40°C у закритій неушкодженій тарі. Термін зберігання препарату становить 12 місяців від дня виготовлення. Після цього терміну препарат залишається придатним для вживання, але може відбутися зниження ферментативної активності, що потрібно враховувати при розрахунку дозувань під час його застосування. Негативне відхилення маси нетто від номінальної маси кожної упаковки повинно відповідати вимогам чинного законодавства та Держпродспоживслужби [62].

Термін зберігання препарату 12 місяців із дня його виготовлення. У процесі зберігання понад зазначений термін препарат придатний для вживання, але допускається зниження ферментативної активності, що необхідно враховувати при розрахунку дозувань при його застосуванні.

1.3.5 Негативне відхилення маси нетто від номінальної маси кожної упаковки має відповідати вимогам чинного законодавства та вимогам Держпродспоживслужби [63].

4 Вимоги безпеки

4.1 Харчовий глюконо-дельта-лактон не токсичний, пожежо- та вибухобезпечний.

4.2 За ступенем впливу на організм людини харчовий глюконо-дельта-лактон у відповідності [64]

З вимогами чинного законодавства відноситься до речовин малонебезпечних - четвертого класу небезпеки.

4.3 При роботі з харчовим глюконо-дельта-лактоном необхідно використовувати спецодяг

та засоби індивідуального захисту і дотримуватись правил особистої гігієни.

4.4 При виконанні аналізів необхідно дотримуватись вимог техніки безпеки при роботі з хімічними реактивами.

4.6 Приміщення, в яких проводять роботи з харчовим глюкозо-дельта-лактоном, та приміщення, де проводять роботи з реактивами, повинні бути обладнані припливно-витяжною вентиляцією [65].

Таблиця 7.3

Характеристика вихідної сировини та матеріалів

Найменування сировини, матеріалів та напівпродуктів	ДСТУ, ОСТ, ТУ, регламент чи методика на виготовлення сировини, матеріалів, напівпродуктів	Показники, обов'язкові для перевірки
А. Основна сировина та матеріали		
Глюкоза	ДСТУ 18-005-94	Біла кристалічна речовина
Вода водопровідна	ДСТУ 2874-82 Р51232-98	Водневий показник р № = 6,5-8,5
Б. Допоміжна сировина та матеріали		
Мішки паперові	ДСТУ 2226-88	Марка ВМ, відкриті, тришарові, розмір 96x51,5 см
Мішки поліетиленові для хімічної продукції	ДСТУ 17811-78	№5, розмір 80x55 см, товщина (0,15±0-03)
Нитки швейні бавовняні та синтетичні	ДСТУ 6309-93	Міцність

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Пирог Т.П.* Загальна мікробіологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
2. *Пирог Т.П., Ігнатова О.А.* Загальна біотехнологія. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
3. *K. Kirimura, Y. Honda, T. Hattori* Gluconic and Itaconic Acids. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition), Vol.3, 2011, pp.143-147* DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00175-6
4. *I. Goldberg, J.S. Rokem* Organic and Fatty Acid Production, *Microbial Encyclopedia of Microbiology (Third Edition).* - 2009, pp. 421 – 442 DOI: 10.1016/B978-012373944-5.00156-5
5. *M. Papagianni* Organic Acids. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition).* – 2011, pp.109-120. DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00011-8
6. *Poonam Yadav, Anil K. Chauhan, Ram B. Singh, Shairy Khan, Ghazi Halabi.* Organic acids: microbial sources, production, and applications. *Functional Foods and Nutraceuticals in Metabolic and Non-Communicable Diseases* – 2022, pp. 325-337. DOI: 10.1016/B978-0-12-819815-5.00053-7
7. *I. Goldberg, J.S. Rokem.* Organic and Fatty Acid Production, *Microbial Encyclopedia of Microbiology (Third Edition).* – 2009, pp. 421-442 DOI: 10.1016/B978-012373944-5.00156-5
8. *Claude Grison, Vincent Escande, Jacques Biton* A New Approach to Multi-Site and Multi-Scale Rehabilitation by Phytoextraction. *Ecocatalysis.* – 2015, pp. 1 - 49 DOI: 10.1016/B978-1-78548-030-0.50001-6
9. *M. Sauer, D. Mattanovich, H. Marx.* Microbial production of organic acids for use in food. *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals.* – 2013, pp. 288 – 320 DOI: 10.1533/9780857093547.2.288
10. *Финогенова Т.В.* Перспективы производства органических кислот // Прикл. биохим. микробиол. - 2005. - № 5. - с. 478-480
11. *Mitsuyasu Okabe, Dwiarti Lies, Shin Kanamasa, Enoch Y. Park* Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* volume 84, 2009, pp. 597–606

12 Патент UA 21546, Спосіб отримання ітаконової кислоти / Петренко О.М., Іванов С.П., Ковальов В.І. – Опубл. 03.07.2008, Бюл. № 12.

13 Ana M., Inés M., Jorge E. Gluconic acid: Properties, production methods and applications—An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization // Proc.Biochem. – 2016. – Vol. 51, N 12. – P 1891-1903

14 Gluconic Acid. National Center for Biotechnology Information – [Електронний ресурс] – Режим доступу - https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-gluconic_acid#section=Top

16 O V Singh, A Sharma, R P Singh Optimisation of fermentation conditions for gluconic acid production by a mutant of *Aspergillus niger*, Indian J Exp Biol. – 2001, pp. 1136-1143

17 Choi S, Song CW, Shin JH, Lee SY: Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. Metab Eng 2015, P. 223-239.

18 Аквалан [Електронний ресурс]: - Режим доступу: <http://akvalan2017.business.site/>

19 Застосування дельта-глюконолактону в натуральній косметиці та в харчовій промисловості [Електронний ресурс]: - Режим доступу: <https://lekostyle.ua/news/statti/delta-glukonolakton-v-naturalnij-kosmetici-ta-v-harcovij-promislovosti>

20 Держпродспожслужба [Електронний ресурс]: - Режим доступу: <https://dpss.gov.ua/bezpechnist-harchovih-produktiv-ta-veterinarna-medicina>

21 Пасичный В.Н. Сырокопченые и сыровяленые колбасы выпускаются не только по ДСТУ – – [Електронний ресурс] – Режим доступу - <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/10539/1/Uncooked%20smoked.pdf>

22 Glucono Delta-Lactone. United States Department of Agriculture (USDA) [Електронний ресурс] – Режим доступу - <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Glucono%20Delta%20Lactone%20TR.pdf>

23 Glucono- δ -lactone . Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) [Електронний ресурс] – Режим доступу - http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/Additive-202.pdf

24 Glucono-delta-Lactone Uniqueness in acidification. Viachem [Електронний ресурс] – Режим доступу - <https://www.viacheminc.com/wp-content/uploads/Product-Data-Sheet-Glucono-delta-Lactone.pdf>

25 Калорийный обзор: колбасный рынок Украины в 2018 году – – [Електронний ресурс] – Режим доступу - <https://koloro.ua/blog/issledovaniya/kolbasnyj-rynok-ukrainy.html>

26 Shi F., Tan J., Chu J. A qualitative and quantitative high-throughput assay for screening of gluconate high-yield strains by *Aspergillus niger* // J. Microbiol Methods. – 2015. – N 109. – P. 134-9. doi: 10.1016/j.mimet.2014.12.004.

27 Ковальчук Н.М., Петрова Л.А., Сидоренко О.П. *Біотехнологія ферментних препаратів: навчальний посібник.* – Київ : Видавництво КНУБА, 2013. – 112 с.

28 Методи відділення біомаси від культуральної рідини [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://ukrbukva.net/page,6,120721-Metody-otdeleniya-biomassy-ot-kul-tural-noiy-zhidkosti.html>

29 Іванова О.П. *Основи генної інженерії в рослинництві: Методичний посібник.* – Київ: Видавництво КНУ, 2018. – 312 с.

30 Седикантер Flottweg – [Електронний ресурс] – Режим доступу. – <https://www.flottweg.com/ru/productlines/decanter/z3e/>

31 Патент UA 265032, Спосіб отримання пищової добавки глюконо-дельта-лактону / Іваненко О.М. (UA), Петренко В.С. (UA), Ковальов В.І. (UA). – Опубл. 15.12.2018.

32 Патент CN 1155012A, Production of lactone gluconate by using black aspergillus to ferment glucose/. – Опубл.16.02.2000

33 Сидоров Ю. І. Чушков В. І. Процеси і апарати хіміко-фармацевтичної промисловості. – Вінниця: Нова книга. – 2010. – 816 с.

- 34 Герасименко В.Г, Герасименко М.О. Біотехнологія: Підручник. — К.: Фірма «ІНКОС», 2006. — 647 с.
35. Марценюк О.С., Мельник Л.М, Процеси і апарати харчових виробництв : Підручник. – К.: НУХТ, 2011. – 407 с
36. Tevz̃, G., Benc̃ina, M., Legiša, M., 2010. Enhancing itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (5), 1657–1664.
37. Ulber, R., Sieker, T., Tippkötter, N., Bart, H.J., Dimitrova, D., Heinzle, E., Neuner, A., 2010. Grassilage als Rohstoff für die chemische Industrie. *Chem. Ing. Tech.* 82 (8), 1153–1159.
38. Vassilev, N., Kautola, H., Linko, Y.-Y., 1992. Immobilized *Aspergillus terreus* in itaconic acid production from glucose. *Biotechnol. Lett.* 14 (3), 201–206.
39. Voll, A., Marquardt, W., 2012. Reaction network flux analysis: optimization-based evaluation of reaction pathways for biorenewables processing. *AIChE J.* 58 (6), 1788–1801.
40. Wang, J.-H., Tsai, S.-H., Teng, K., 2011. Producing Itaconic Acid in Yeast Using Glycerol as the Substrate. Industrial Technology Research Institute (ITRI). US Patent 0053232.
41. Wasewar, K.L., Shende, D., Keshav, A., 2011. Reactive extraction of itaconic acid using tri-n-butyl phosphate and aliquat 336 in sunflower oil as a non-toxic diluent. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86 (2), 319–323.
42. Welter, K., 2000. Biotechnische Produktion von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen mit immobilisierten Zellen. Ph.D. thesis. In: Gemeinsame Naturwissenschaftliche Fakultät, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. Braunschweig, Germany.
43. Werpy, T., Petersen, G., 2004. Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. In: *Top Value Added Chemicals from Biomass*
44. Yang, W., Hu, Y., Chen, Z., Jiang, X., Wang, J., Wang, R., 2012. Solubility of itaconic acid in different organic solvents: experimental measurement and thermodynamic modeling. *Fluid Phase Equilibr.* 314, 180–184.

45. Sieker, T., Duwe, A., Poth, S., Tippkötter, N., Ulber, R., 2012. Herstellung von Itaconsäure aus Buchenholz-Hydrolysaten. 14.–16.05.2012, Freiburg.
46. Yahiro, K., Takahama, T., Jai, S.-r., Park, Y., Okabe, M., 1997b. Comparison of air-lift and stirred tank reactors for itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Biotechnol. Lett.* 19 (7), 619–621.
47. T. Godjevargova, R. Dayal, S. Turmanova, Gluconic acid production in bioreactor with immobilized glucose oxidase plus catalase on polymer membrane adjacent to anion-exchange membrane, *Macromol. Biosci.* 4 (2004) 950–956
48. M. Röhr, C.P. Kubicek, J. Kominek: Gluconic Acid. In: *Biotechnology*, Vol. 3, H.J. Rehm, G. Reed (Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, Germany (1983) pp. 455–465.
49. K. Bernhauer, Zum Problem der Säurebildung durch *A. niger* (About the problem of acid formation by *A. niger*), *Biochem. Z.* 153 (1924) 517–521.
50. K. Bernhauer, Über die Characterisierung der Stämme von *A. niger* auf Grund ihres biochemischen Verhaltens (Distinguishing *A. niger* genera based on their biochemical characterization), *Biochem. Z.* 197 (1928) 278–287.
52. A. Kapat, J.K. Jung, Y.H. Park, Enhancement of glucose oxidase production in batch cultivation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*; Optimization of oxygen transfer condition, *J. Appl. Microbiol.* 90 (2001) 216–222.
53. A. Pandey, C.R. Soccol, J.A.R. Leon, P. Nigam: *Solid-State Fermentation in Biotechnology*, Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India (2001) p. 221.
54. O.V. Singh, R.K. Jain, R.P. Singh, Gluconic acid production under varying fermentation conditions by *Aspergillus niger*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78 (2003) 208–212.
56. M. Felder, A. Gupta, V. Verma, A. Kumar, G.N. Qazi, J. Cullum, The pyrroloquinoline quinone synthesis genes of *Gluconobacter oxydans*, *FEMS Microbiol. Lett.* 193 (2000) 231–236
57. N.V. Sankpal, B.D. Kulkarni, Optimization of fermentation conditions for gluconic acid production using *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils, *Process Biochem.* 37 (2002) 1343–1350.

59. A. Pandey, C.R. Soccol, J.A.R. Leon, P. Nigam: Solid-State Fermentation in Biotechnology, Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India (2001) p. 221.
60. Y. Ikeda, E.Y. Park, N. Okuda, Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger*, *Bioresour. Technol.* 97 (2006) 1030–1035.
61. Паперові пакети VS поліетиленові пакети. Назва з екрану. Доступ: <https://fabrika-upakovki.com/ua/n286290-bumazhnye-pakety-polietilenovye.html>
62. Шредер В.Л., Пилипенко С.Ф. Упаковка з картону.- К.: ІАЦ Упаковка, 2004.- 148 с. 5. Пакувальне обладнання: В 3-х кн. Кн.3. Обладнання для обробки транспортних пакетів/ О.М. Гавва, А.П.Беспалько, А.І.Волчко.- К.: ІАЦ Упаковка, 2006.- 96 с. 6. Шредер В.Л. Картон. Тара и упаковка. – К.: Упаковка, 1999. – 192с.
63. Гавва О.М. Пакувальне обладнання [текст]: підручник [для студ. вищ. навч. закл.] / О.М.Гавва, А.П. Беспалько, А.І. Волчко, О.О.Кохан. – К.: ІАЦ «Упаковка», 2010. – 744 с.
64. Сирохман І. В. Товарознавство пакувальних товарів і тари [текст]: підручник [для студ. вищ. навч. закл.] / І. В. Сирохман, В. М. Завгородня. – К.: Центр учбової літератури, 2009. — 616 с.
65. Колосов О.Є. Технологія пакувального виробництва [навчальний посібник] / Колосов О.Є. – Київ, ВПК «Політехніка», 2015. – 247 с.
66. Колосов О.Є. Технологія зберігання неупакованої та упакованої харчової продукції: навчальний посібник [для студ. вищ. навч. закл.; електронне видання] / Колосов О.Є. - К.: НТУУ КПІ, 2016. - 180 с. Назва з екрана. – Доступ : <http://ela.kpi.ua/handle/123456789/14443>