

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

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

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності _____ 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми _____ «Біотехнологія»
на тему: Культивування *Sclerotium rolfsii* для одержання склероглюкану

Виконав: здобувач IV курсу, групи 1

Ярош Ульяна Михайлівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) _____ (підпис)

Керівник Тетеріна Світлана Миколаївна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) _____ (підпис)

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

Рецензент _____
(прізвище та ініціали) _____ (підпис)

Рецензент Корх Н. С.
(прізвище та ініціали) _____ (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма _____
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

_____ Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Ярош Ульяни Михайлівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Sclerotium rolfsii* для одержання склероглюкану
керівник роботи Тетеріна С. М., к.т.н., доцент

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

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

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Sclerotium rolfsii*, цільовий продукт:
склероглюкан

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

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема культивування *Sclerotium rolfsii* для одержання склероглюкану – 1 аркуш формату А1, 1 аркуш формату А3. Апаратурна схема культивування *Sclerotium rolfsii* для одержання склероглюкану – 4 аркуші формату А1. Схема автоматизації ділянки біосинтезу *Sclerotium rolfsii* для одержання склероглюкану – 1 аркуш формату А3

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	20.03.2020-25.03.2020	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	25.03.2020-03.04.2020	
3	Техніко-економічне обґрунтування	01.04.2020-12.04.2020	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	05.04.2020-25.04.2020	
5	Біосинтез цільового продукту	12.04.2020-20.04.2020	
6	Апаратурна схема	20.04.2020-20.05.2020	
7	Технологічна схема	20.04.2020-20.05.2020	
8	Специфікація	26.04.2020-20.05.2020	
9	Матеріальний баланс	25.04.2020-30.04.2020	
10	Опис технологічної схеми	10.05.2020-30.05.2020	
11	Контроль виробництва	10.05.2020-20.05.2020	
12	Автоматизація ділянки виробництва	12.05.2020-22.05.2020	
13	Список використаної літератури	20.05.2020-30.05.2020	
14	Вступ. Реферат. Зміст	30.05.2020	

Здобувач _____ Ярош У. М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник проекту (роботи) _____ Тетеріна С. М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Реферат

Дана робота містить інформацію про такий екзополісахарид як склероглюкан. А саме про його будову; фізико-хімічні, біологічні властивості; практичне застосування; умови біосинтезу, спосіб виділення готового продукту.

У роботі наведена порівняльна характеристика таких продуцентів склероглюкану як *Sclerotium rolfsii* MTCC 2156, *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126 та *Sclerotium glaucanicum* NRRL30063. Встановлено, що кращим з даних продуцентів для синтезу склероглюкану є *S. rolfsii* ATCC 201126.

Також наведено склад найбільш оптимального середовища для культивування обраного біологічного агента. Та обґрунтовано особливості біосинтезу склероглюкану, який включає культивування за високого вмісту джерела вуглецю, дробне внесення субстрату; використання турбінної мішалки під час культивування, для унеможливлення утворення склероцій. У проекті також наводиться обґрунтування етапів виділення готового продукту.

Загальний обсяг роботи становить 147 сторінок.

Робота складається з наступних частин: вступу, десяти розділів, ілюстративних матеріалів, списку використаних літературних джерел, апаратурної та технологічної схеми синтезу склероглюкану, ділянки автоматизації виробництва.

Ключові слова: екзополісахарид, склероглюкан, *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126, *Sclerotium rolfsii* MTCC 2156, *Sclerotium glaucanicum* NRRL30063.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1.ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	8
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	11
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	17
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	21
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	22
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	23
3.1Потреба у цільовому продукті.....	23
3.2 Розрахунок потужності виробництва	24
3.3Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера	26
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	27
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	31
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	31
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	32
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	34
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинте- зу.....	34
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	34
5.1.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря	37
5.1.3. Обґрунтування вибору мийних та дезинфікувальних засобів	38
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	45
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	50

5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту	62
РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ	64
РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	94
РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	103
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	129
9.1. Контроль виробництва	129
9.2. Карта постадійного контролю	133
РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА	139
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	145
ГРАФІЧНА ЧАСТИНА	
ДОДАТКИ	

Вступ

Склероглюкан - це біополімер, отриманий шляхом ферментації гриба рослини-збудника роду *Sclerotium*, методом аеробної ферментації.

Біополімер склероглюкан відноситься до продуктів грибкового походження, і завдяки своїй універсальності та унікальним властивостям він може використовуватись в різних галузях, таких як

- Нафтопереробна,
- Косметологічна,
- Харчова,
- Фармацевтична [1].

У теперішній час все більш актуальним є використання органічних продуктів харчування, засобів гігієни, речей побуту, що не мають шкідливого впливу для здоров'я людини, та не забруднюють навколишнє середовище. У зв'язку з цим попит на органічні продукти зростає.

Склероглюкан є природним згущувачем, саме тому його використовують у косметології, як аналог синтетичним загусникам.

Склероглюкан як загусник, емульгатор, стабілізатор зберігає свої властивості при впливі високих температур (до 149°C), дії більшості електролітів, та в широких межах рН.

Оскільки в Україні на даний момент не має виробництва склероглюкану, розробка проекту для введення такого підприємства у Україні є актуальною.

Мікробне виробництво склероглюкану, як в лабораторних, так і на промислових масштабах, залишається одним з найбільш багатоаспектних процесів, відомих сьогодні.

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ярош У. М.			Вступ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Тетеріна С. М.					6	147
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т. П.						

На даний момент і досі відкрите питання щодо оптимізації процесу виробництва склероглюкану, що забезпечить його конкурентоспроможність, адже умови культивування продуцента суттєво впливають як на концентрацію синтезованого ЕПС, так і на його фізико-хімічні властивості.

Цікаво, що умови, що сприяють виробництву склероглюкану, також збільшують кількість секретованого оксалату.

Проте при промисловому виробництві склероглюкану утворення оксалату, побічного продукту, є небажаним, оскільки він знижує продуктивність процесу та негативно впливає на подальшу обробку склероглюкану. Для деяких його застосувань, наприклад, у косметології та харчовій промисловості, необхідне витратне інтенсивне видалення оксалату [2].

Новизною даної роботи є впровадження виробництва склероглюкану в Україні.

Трикратне осадження склероглюкану дозволяє досягти вищого рівня чистоти готового продукту, що є необхідним, оскільки проект розробляється для використання екзополісахариду у косметичній промисловості.

Також, для використання у косметичній промисловості, склероглюкан має бути хімічно чистим, та не містити залишків спирту, що використовується при осадженні. Тому необхідним є трикратне промивання після осадження [1].

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

Склероглюкан - β -1,3- β -1,6-глюкан – полімер, що складається з основного ланцюга β -1,3- зв'язаних D-глюкопіранозильних одиниць. До кожного третього залишку ланцюга приєднана D-глюкопіранозильна група, за допомогою β -1,6 зв'язка.

ScIg - загальний термін, що використовується для позначення класу глюканів подібної структури, виробленої грибами, особливо родом *Sclerotium* [3].

Комерційний продукт називають склероглюкан, але він також відомий під іншими назвами відповідно до компанії, яка виробляє полісахарид (наприклад, *Actigum*, *Clearogel*, *Polytetran*, *Sclerogum*) [2].

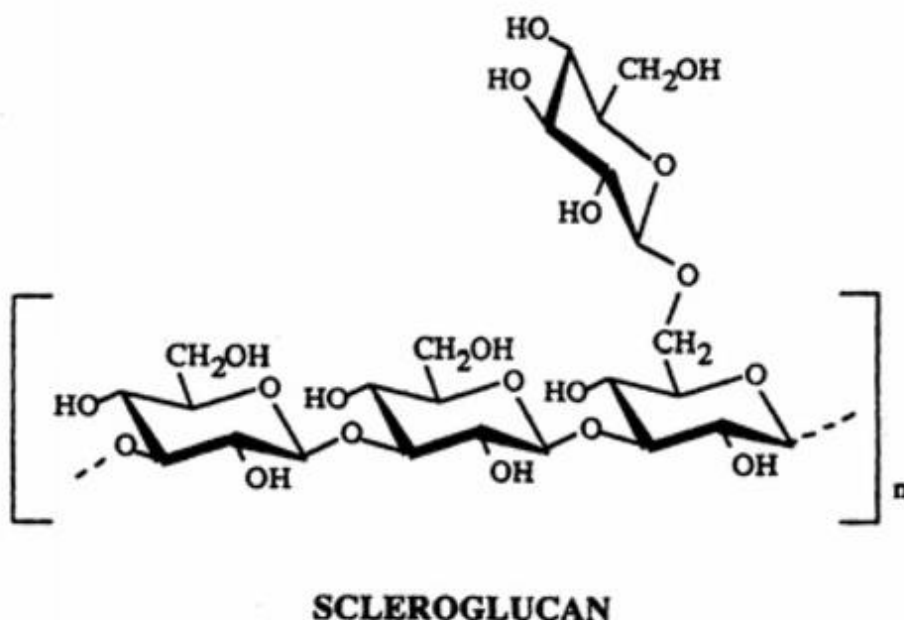


Рис. 1. Повторювана одиниця склероглюкану (структурна формула).
Вперше склероглюкан був описаний ще в 60-х роках минулого століття [3].

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ док.ум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1 Характеристика цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Ярош У. М.					8	147
Перевір.		Тетеріна С. М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т. П.						Кафедра БТМ

Фізико-хімічні властивості склероглюкану

Довжина полімерного ланцюга, а, отже, і молекулярна маса склероглюкану, може відрізнятися в залежності від штаму мікроорганізму, що використовувався для синтезу продукту; процесу ферментації (культурального середовища, часу ферментації та ін.).

Склероглюкан демонструє цілий ряд характерних фізико-хімічних властивостей, які надають перевагу перед іншими полісахаридами. [3]

- Стійкий до температур. Склероглюкан не втрачає властивостей при високих температурах (до 149° С). Більшість полісахаридів втрачають в'язкість при темп до 93 °С, розчин склероглюкану зберігає такі ж властивості як при кімнатній температурі до 149 °С. Крім того при таких високих температурах склероглюкан не руйнується вродовж тривалого проміжку часу, особливо в присутності малих кількостей кисню [4].

- Стійкий до різноманітних електролітів (NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ і MnCl₂) [1].

- Стійкий при широкому діапазоні рН [5]. Спіраль ScI_g розпадається при рН вище 13 [5].

- Легко розчиняється в холодній і гарячій воді [6].

При розчиненні у воді, при кімнатній температурі і низькій концентрації лугу, як правило, нижче 0,15 М NaOH, склероглюкану характерна високпорядкована потрійна спіральна структура.

Проте, при більш високих концентраціях NaOH, де зазвичай спостерігаються різкі зміни в'язкості, потрійна спіраль, піддається іонізації гідроксильних груп, що, таким чином, руйнує водневі зв'язки і призводить до подальшої денатурації полісахару [1].

- Склероглюкан має хорошу здатність до емульгування і діє як стабілізатор піни [5].

Біологічні властивості

Хоч фізико-хімічні властивості склероглюкану добре зрозумілі, практично нічого не відомо про його генетику біосинтезу [2].

Що стосується біологічних властивостей склероглюкану, повідомлялося, що його введення різними шляхами у щурів і собак не викликало токсичності, тканинної патології або аномалій крові. Роздратування очей, шкіри не було виявлено ні у свиней, ні у кроликів, ні в людей [1].

Глюкани є основними біоактивними сполуками, які, як відомо, мають біологічну активність, включаючи протиракову, протизапальну та імуномодуючу властивості. *Du, Lin, Bian, & Xu (2015)* довели ефективність глюканів, як імонустимуляторів, та речовин з протипухлиною дією [7].

Практичне застосування склероглюкану

Sc1g має різні промислові застосування:

- в нафтовій промисловості для згущення, бурових розчинів і для підвищення нафтовіддачі.
- Приготування клеїв, акварелей, друкарських фарб
- У косметичній промисловості в різних засобах для догляду за шкірою, волоссям (фарби, креми і захисні лосьйони)
- У харчовій промисловості у багатьох японських патентах описуються покращення якості заморожених продуктів, рисових крекерів і хлібобулочних виробів.
- У фармацевтичних препаратах Sc1g можна застосовувати як проносне, для стабілізації суспензій [3].
- Крім того, повідомляється про роль склероглюкана як імуностимулятора [1].
- Також підтвердженні такі властивості склероглюкану, як, протипухлинні, противірусні та антимікробні [3].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Згідно з теоретичними міркуваннями, висунутими Сазерлендом [2], синтез склероглюкану ґрунтується на загальній схемі виробництва полісахаридів у мікробних системах на трьох основних етапах:

- поглинання субстрату,
- внутрішньоклітинне утворення,
- екструзію з клітини.

Виробництво склероглюкану потребує певних специфічних культуральних умов для досягнення максимальної продуктивності. Вони включають не лише вимоги до виробничих штамів, але і такі як рН, температура, аерація, перемішування, контроль пін і розмір інокуляра [8].

На теперішньому етапі розвитку мікробіології та біотехнології продуцентами склероглюкану можуть бути:

- *Sclerotium rolfsii* MTCC 2156,
- *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126,
- *Sclerotium glaucanicum* NRRL 30063 [9].

Для визначення найбільш продуктивного продуцента, слід провести порівняння відомих штамів мікроорганізмів, з врахуванням всіх параметрів біосинтезу.

Умови культивування продуцента суттєво впливають як на концентрацію синтезованого ЕПС (склероглюкану), так і на його фізико-хімічні властивості.

					НУХТ БТЕК 04.01. 33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ярош У. М.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Тетеріна С. М.					11	147
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т. П						

Порівняння аналізу біологічних агентів, використовуваних для одержання склероглюкану за допомогою *S. rolfsii* MTCC 2156, *S. rolfsii* ATCC 201126 та *S. glaucanicum* NRRL30063 наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

**Порівняний аналіз біологічних агентів, використовуваних
для одержання склероглюкану за допомогою
S. rolfsii MTCC 2156, *S. rolfsii* ATCC 201126 та *S. glaucanicum* NRRL30063**

Біологічний агент	Склад поживного середовища (г/л)	Концентрація склероглюкану	Тривалість процесу	Особливості технологічного процесу	Використана література (1,2...)
<i>S. rolfsii</i> MTCC 2156	Сахароза - 80; NaNO ₃ - 3; MgSO ₄ - 0,25; K ₂ HPO ₄ - 1,3; дріжджовий екстракт - 1; лимонна к-а - 0,7, KCl - 0,5 ; FeSO ₄ ×7H ₂ O - 0,005.	16,58 г/л	72 год	Оптимальне виробництво склероглюкану відбувається за умов: підживлення середовища (початкова концентрація сахарози – 35 г/л); температура - 28°C, швидкість мішалки - 180 об/хв.	1,10
<i>S. rolfsii</i> ATCC 201126	Сахароза - 150; NaNO ₃ - 2,25 K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O - 2,0; KCl - 0,5; MgSO ₄ ×7H ₂ O - 0,5; дріжджовий екстракт – 1,0; лимонна к-а - 0,7; FeSO ₄ ×7H ₂ O - 0,05;	26 г/л	48 год	Оптимальне виробництво за умов: підживлення середовища (початкова концентрація сахарози – 35 г/л); температура -30 °C; початкове рН 4,5; швидкість мішалки - 400 об/хв;	1

<i>S. glucanicum</i> NRRL 30063	Сахароза - 30,0; (NH ₄) ₂ SO ₄ - 1,0; KH ₂ PO ₄ - 1,0; MgSO ₄ ×7H ₂ O - 0,5; дріжджовий ек- тракт - 1,0; FeSO ₄ - 0,01; KCl - 0,5	10,2 г/л	72 год	Оптимальне вироб- ництво за умов: температура 28 ° С; швидкість пе- ремішування 400 об/хв; двостадійний спосіб культи- вування (на першому етапі рН на рівні 3,5 упро- довж 36 год для накопичення біома- си, на другому — рН довели до 4,5.	1,10
------------------------------------	--	-----------------	-----------	--	------

Аналізуючи дану таблицю можемо зробити висновок, що найбільша концентрація цільового продукту спостерігається за культивування *S. rolfsii* ATCC 201126. Також час культивування є найменшим, що є найбільш економічно доцільно.

Проте така порівняльна характеристика технологічного процесу (див. *табл.2.1*) є недостатньою, тому на наступному етапі вибору біологічного агента порівнювалась вартість компонентів поживних середовищ найактивніших продуцентів склероглюкану (*табл.2.2*).

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування
S. rolfsii MTCC 2156, *S. rolfsii* ATCC 201126 та *S. glaucinum* NRRL30063**

Біологічний агент	Концентрація кожного компонента поживного середовища (г/л) для даного біологічного агента	Ціна компонента поживного середовища (грн/кг)	Вартість компонента для приготування 1 л середовища	Джерело інформації про ціну кожного компонента поживного середовища
<i>S. rolfsii</i> MTCC 2156	Сахароза – 80;	10,5	0,84	https://agrotender.com.ua/b-oar-d/-post-307720.html
	NaNO ₃ – 3;	16	0,048	https://aloks.prom.ua/p5
	MgSO ₄ - 0,25;	11	0,00275	https://dnepropetrovsk.flag
	K ₂ HPO ₄ - 1,3;	89,70	0,117	https://himport.net/p151
	дріжджовий екстракт – 1;	846	0,846	https://www.laboratorii.co-m/re
	лимонна к-а - 0,7;	27,5	0,019	https://him-element.com.ua/
	KCl - 0,5;	14,65	0,007	https://prom.ua/p1104
	FeSO ₄ ×7H ₂ O - 0,005.	8,80	0,000044	https://kiev.flagma.ua/z
Всього	1,878			
<i>S. rolfsii</i> ATCC 201126	Сахароза – 150;	10,50	1,58	https://agrotender.com.ua/b-oar-d/-post-307720.html
	NaNO ₃ - 2,25;	16	0,036	https://aloks.prom.ua/p5

	$K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 2;	84	0,168	https://prom.ua/p22
	KCl - 0,5;	14,65	0,007	https://prom.ua/p1104
	$MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,5;	14	0,007	https://ahc.in.ua/p
	дріжджовий екстракт – 1,0;	846	0,846	https://www.laboratorii.co-m/re
	лимонна к-а - 0,7;	27,5	0,019	https://him-element.com.ua/
	$FeSO_4 \times 7H_2O$ 0,05	8,80	0,00044	https://kiev.flagma.ua/z
Всього		2,663		
<i>S.glucani</i> cum NRRL 30063	Сахароза - 30,0;	10,50	0,315	https://agrotender.com.ua/b-oar-d/-post-307720.html
	$(NH_4)_2SO_4$ - 1,0;	50	0,05	http://agro-srv.com/ind
	KH_2PO_4 - 1,0;	59	0,059	https://selitra.biz/p194
	$MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,5;	14	0,007	https://ahc.in.ua/p
	дріжджовий екстракт - 1,0;	846	0,846	https://www.laboratorii.co-m/re
	$FeSO_4$ - 0,01;	8,80	0,88	https://kiev.flagma.ua/z
	KCl - 0,5.	14,65	0,007	https://prom.ua/p1104
Всього		2,164		

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

Проаналізувавши дані, що наведені у *табл. 2.1* та *табл. 2.2* варто узагальнити результати, та визначити умовну вартість цільового продукту (склероглюкану) та концентрацію цільового продукту, синтезованого за годину.

Результати аналізу умовної вартості склероглюкану зображено у *табл. 2.3*.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 мг склероглюкану при культивуванні

***S. rolfsii* MTCC 2156, *S. rolfsii* ATCC 201126 та *S. glucanicum* NRRL30063**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища	Концентрація склероглюкану (г/л)	Умовна вартість 1г цільового продукту (грн/г)	Тривалість культивування, год	Концентрація цільового продукту, синтезованого за год
<i>S. rolfsii</i> MTCC 2156	1,878	16,58	0,113	72	0,230
<i>S. rolfsii</i> ATCC 201126	2,663	26	0,102	48	0,542
<i>S.glucanicum</i> NRRL 30063	2,164	10,2	0,212	72	0,110

Узагальнивши дані, підводиться підсумок, що найкращим продуцентом для синтезу склероглюкану є *S. rolfsii* ATCC 201126.

Перш за все про це свідчить найбільший вихід склероглюкану – **26 г/л**, що значно більше у порівнянні з синтезом за *S. rolfsii* MTCC 2156 та за *S. glucanicum* NRRL 30063. Також, тривалість культивування *S. rolfsii* ATCC 201126 скорочено на одну третю, порівняно з іншими аналізованими мікроорганізмами, що дає велику перевагу.

Незважаючи на найвищу вартість середовища, що використовується для культивування *S. rolfsii* ATCC 201126, умовна вартість цільового продукту, є мінімальною порівняними з іншими біологічними агентами.

Слід зауважати, що концентрація цільового продукту (0,542 за год) значно перевищує показники за *S. rolfsii* MTCC 2156 та за *S. glaucanicum* NRRL 30063, (0,230 та 0,110, відповідно).

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Культивування *S. rolfsii* ATCC 201126 проводять на середовищі наступного складу (див. *табл. 2.4*)

Таблиця 2.4

Склад компонентів поживного середовища для культивування *S. rolfsii* ATCC 201126 – продуцента склероглюкану

	Компонент середовища	Вміст, г
1	Сахароза	150
2	NaNO ₃	2,25
3	K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O	2
4	KCl	0,5
5	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5
6	дріжджовий екстракт	1,0
7	лимонна к-а	0,7
8	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,07

Розрахунок складу поживного середовища

- **Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення**

Потреби для синтезу склероглюкану

Джерелом вуглецю у даному середовищі служить **сахароза**.

Розрахуємо, скільки вуглецю міститься в 26 г склероглюкану.

Молекулярна маса склероглюкану (C₆H₁₀O₅) становить 162 г/моль.

Отже, у 162 г склероглюкану міститься 72 г вуглецю (12×6).

Відповідно в 26 г склероглюкану $(26 \times 72) / 162 = 11,6$ г вуглецю.

Далі розрахуємо, у скількох грамах сахарози міститься 11,6 г вуглецю.

Сахароза – $C_{12}H_{22}O_{11}$. Молярна маса становить 342 г/моль.

Отже, у 342 г сахарози міститься 144 г вуглецю (12×12).

Тоді 11,6 г вуглецю міститься у $(342 \times 11,6) / 144 = 27,5$ г сахарози.

Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на вуглеводах близько 40% субстрату окислюється до CO_2 для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму – холосте окислення, вміст сахарози у середовищі становитиме $(27,5 \times 0,5) + 27,5 = 41,25$ г/л

Потреби для синтезу біомаси

Оскільки, у досліджуваній літературі немає точного значення кількості біомаси, отриманої при культивуванні *S.Rolfsii* ATCC 201126, для розрахунків, варто опиратись на загальні літературні дані, що становить для грибів 10 г.

У біомасі міститься 50% вуглецю, отже вміст вуглецю у 10 г біомаси становить $10 \times 0,5 = 5$ г. Ця кількість вуглецю міститься у $(5 \times 342) / 144 = 11,87$ г сахарози.

Враховуючи 40%-і втрати субстрату на “холосте окислення”, для одержання 11,9 г/л біомаси у середовище необхідно внести $(11,87 \times 0,4) + 11,87 = 16,62$ г/л сахарози.

Отже, загальний вміст сахарози в середовищі, необхідний для синтезу біомаси та склероглюкану, становить - $16,62 + 94,74 = 111,36$ г/л.

• **Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення**

Потреби для синтезу біомаси.

Припустимо, що у біомасі міститься 10 % азоту. Таким чином, у 10 г біомаси вміст азоту становить $(10 \times 0,10) = 1$ г.

Потреби для синтезу склероглюкану

Так як до складу склероглюкану не входить нітроген, то робимо перерахунок на біомасу $(10 \times 0,1) = 1$ г нітрогену повинно міститися в середовищі.

До складу середовища входить NaNO_3 , що є джерелом нітрогену.

Розраховуємо, в якій кількості NaNO_3 міститься ця кількість азоту.

У 85 г NaNO_3 міститься 14 г нітрогену, тоді 1 г нітрогену буде міститися у $(85 \times 1) / 14 = 0,61$ г солі.

Для одержання 26 г склероглюкану та біомаси, вміст NaNO_3 у середовищі культивування повинен становити $- 1 + 0,61 = 1,61$ г солі.

- **Розрахунок вмісту фосфору у середовищі**

У біомасі міститься близько 3% фосфору. Отже, для синтезу 10 г/л біомаси вміст фосфору у середовищі повинен становити $10 \times 0,03 = 0,3$ г/л.

Джерелом фосфору у промисловому виробництві склероглюкану є $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$

Розраховуємо, у скількох грамах $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ міститься 0,3 г фосфору.

Отже, у 228 г K_2HPO_4 міститься 31 г фосфора, тоді 0,3 г фосфору міститься в $(228 \times 0,3) / 31 = 2,2$ г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$.

- **Розрахунок вмісту заліза у середовищі**

У біомасі міститься близько 0,2% заліза. Отже, для синтезу 10 г/л біомаси вміст заліза у середовищі повинен становити $10 \times 0,002 = 0,02$ г/л.

Джерелом заліза у промисловому виробництві склероглюкану є $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$.

Розраховуємо, у скількох грамах $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ міститься 0,02 г заліза.

У 278 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ міститься 56 г заліза, тоді 0,02 г заліза міститься у $(278 \times 0,02) / 56 = 0,099$ г

- **Інші компоненти середовища**

Джерелами необхідних елементів для росту продуцента є також дріжджовий екстракт.

Основні компоненти у складі дріжджового екстракту – це пептиди, нуклеотиди, амінокислоти. У свою чергу, амінокислоти включають: аспарагінову кислоту; глютамінову кислоту; діаміновалеріанову кислоту; треонін;

серин; гліцин; тирозин; пролін; валін; аланін; метіонін; лізин; цистеїн; лейцин; аргінін; фенілаланін; гістидин

Наведені вище розрахунки щодо складу поживного середовища можна подати у вигляді таблиці (табл.2.5).

Таблиця 2.5

Вміст компонентів поживного середовища

	Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л
1	Сахароза	111,36
2	NaNO ₃	1,61
3	K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O	2,2
4	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,099

Проаналізувавши необхідну кількість основних елементів і розрахувавши потрібну кількість компонентів можна зробити висновок про те, що всі компоненти середовища внесені у достатній кількості. Тому дане середовища є сприятливим для синтезу склероглюкану.

Відповідно до проведеного аналізу, найкращим продуцентом для синтезу склероглюкану є *S. rolfsii* ATCC 201126.

За найменший проміжок часу, можна отримати найбільший вихід готового продукту (відносно інших досліджуваних штамів).

Найбільш сприятливими умовами для культивування мікроорганізму є температура 30 ° C, початкове рН 4,5 (далі не контролюється протягом всього процесу). Культивування здійснюється при інтенсивному аеруванні. Виробництво склероглюкану проходить за умови підживлення середовища, адже, початкове внесення сахарози понад 40 г/л призводить до повного інгібування цільового продукту.

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

Sclerotium rolfii фітопатогенний гриб, що викликає захворювання у багатьох сільськогосподарських і садових рослинах. Однак, він також використовується в біотехнології для виробництва екзополісахариду (EPS) **склероглюкану** [11].

Колонії *S. rolfii* легко визначити на рослинному матеріалі чи на штучних середовищах за явними морфологічними характеристиками.

Sclerotium rolfii утворює міцелій білого кольору. Гриб утворює гіфи двох типів, великого діаметру (від 5 до 9 мкм) та гіфи меншого діаметру (від 2 до 4 мкм).

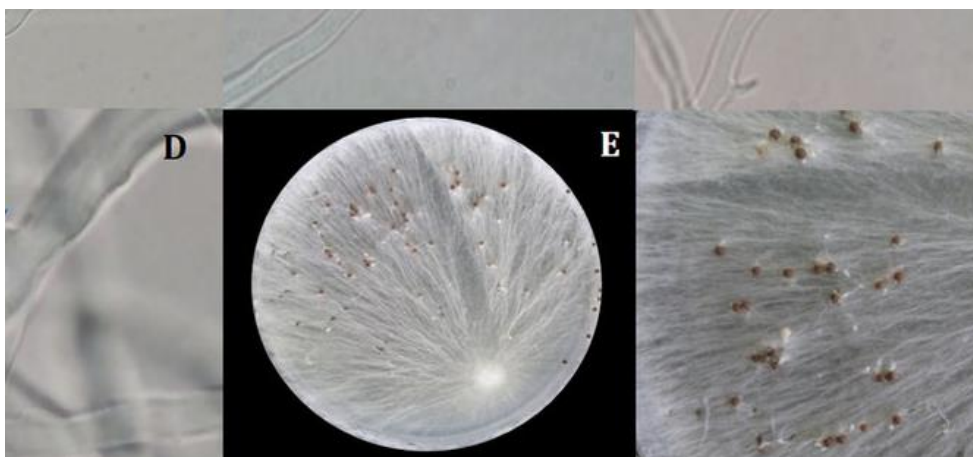


Рис. 2.1 Колонії *S. rolfii* на чашці Петрі

Склеротії (діаметром 0,5-2,0 мм) починають розвиватися через 4-7 днів росту міцелію. Склероцій темніє в міру дозрівання, набуваючи темно-коричневого кольору. Зрілі склероції тверді, мають виразну шкірку. Більшість склероцій є сферичними, деякі злегка сплюснені або зливаються з іншими, утворюючи неправильний склероцій.

Щодо фізіолого-біохімічних ознак, оптимальний діапазон рН для росту - 3,0 до 5,0, а склеротичне проростання відбувається між 2,0 та 5,0.

Проростання гальмується при рН вище 7,0. Зростання міцелію відбувається від 25 до 35 ° С. Міцелій гине при 0 С, але склеротія може вижити при температурі до -10 С

Міцеліальний ріст і склеротичне проростання відбуваються швидко при безперервному світлі, хоча вони відбудуться в темряві, якщо інші умови сприятливі.

2.4 Таксономічний статус біологічного агента

Царство: *Fungi*

Відділ: *Basidiomycota*

Клас: *Agaricomycotina*

Ряд: *Agaricomycetes*

Родина: *Atheliaceae*

Рід: *Athelia*

Наукова назва - *Athelia rolfsii*

Синоніми наукової назви - *Sclerotium rolfsii* [12].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

У теперішній час великою проблемою людства є забруднення навколишнього середовища пластиком та мікропластиком.

Не так давно, німецькі учені провели дослідження антарктичних льодів. За їх даними в одному кубометрі льоду може міститися до декількох мільйонів мікрочасток пластика. Це приблизно в тисячу разів більше, ніж результати колишніх вимірів, проведених ще в 2014 році.

Одним із джерел забруднень середовища та стічних вод мікропластиком є косметичні препарати, у яких як згущувач, стабілізатор використовують продукти нафतेпереробки - карбомер (акрилат полімер) [13].

Також, згідно з статистикою, у сьогодення люди почали звертати більшу увагу на здоров'я, те чим харчуються, речі побуду та догляду, та надавати перевагу органічним та натуральним складникам [3].

Склероглюкан – природний згущувач, стабілізатор, емульгатор, що здійснює зволожуючий вплив на шкіру, та сприяє плівкоутворенні [1].

Даний полісахарид демонструє цілий ряд характерних фізико-хімічних властивостей, які надають перевагу перед іншими. Саме тому для нього характерне використання у різних сферах:

- ✓ В нафтовій промисловості для згущення, бурових розчинів і для підвищення нафтовіддачі.
- ✓ Приготування клеїв, акварелей, друкарських фарб
- ✓ У косметичній промисловості в різних засобах для догляду за шкірою, волоссям (фарби, креми і захисні лосьйони)
- ✓ У харчовій промисловості численні японські патенти описують поліпшення якості заморожених продуктів, харчових продуктів на пару, рисових крекерів і хлібобулочних виробів

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ док.ум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Ярош У. М.			РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування		Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Тетеріна С. М.						23	147
Реценз.							Кафедра БТМ		
Н. Контр.									
Затверд.		Пирог Т. П.							

- ✓ У медицині препаратах склероглюкан застосовують як проносне [3].
- ✓ У фармацевтиці також повідомляється про роль склероглюкана як імуностимулятора [1].

Подальше дослідження потреби склероглюкану проводилось виключно у косметологічній промисловості.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

У косметичній промисловості склероглюкан використовується у шампунях, засобах догляду за шкірою, кремах, лосьйонах, як згущувач, стабілізатор, та компонент зі зволожуючими та захисними властивостями.

Згідно Державної служби статистики, в Україні за 2018 рік виготовлено та використано 6 700 тон косметичних засобів [14] (див. Додаток 2).

З них, за рік використовується:

- косметика для догляду за шкірою - 37% (2479 тон),
- догляд за волоссям – 22% (1474 тонни),
- декоративна косметика – 19% (1273 тонни),
- парфумерія – 12% (804 тонни),
- гігієнічні товари – 10% (670 тонни) [15].

Оскільки у парфумерії та гігієнічних товарах згущувачі не використовуються, подальші розрахунки проводяться, за виключенням цієї продукції, тобто

$6700 - 804 - 670 = 5226$ тон косметики.

В Україні відомо близько 200 підприємств, що виготовляють парфумерно-косметологічну продукцію. Проте з них виділяють 24 великих, потужних підприємств (PeNa, Illusor, White Mandarin, Младна, Vigor Cosmetique Naturelle, зелена аптека, Яка, і т. д), решту, малі прийmemo як ще одне велике повноцінне. [15, 16].

З них, більшість (~ 70 %) використовують у складі натуральні компоненти [17].

Окрім склероглюкана у косметології використовують такі природні згущувачі та стабілізатори як камідь (ксантанова смола), сульфатовані полісахариди з червоних водоростей і т. д [18].

Проте, так як в Україні немає підприємств з виготовлення даних продуктів, сировину закупають за кордоном.

Отже, з усіх косметологічних підприємств у своєму складі використовують

$$5226 * 0,7 = 3658 \text{ – натуральні компоненти}$$

$$5226 * 0,3 = 1568 \text{ – синтетичні компоненти.}$$

Допустимо, що 50% виробників що використовують синтетичні компоненти перейдуть на натуральні

$$1568 * 0,5 = 784 \text{ тонни виготовленої продукції}$$

З них, 30 % будуть використовувати виготовлений нами склероглюкан, інші 70% - будуть закупляти сировину закордону.

$$784 * 0,3 = \mathbf{235} \text{ тон.}$$

Крім цього, з виробництв, що вже використовують натуральні компоненти

30 % можуть використовувати вітчизняний згущувач,

$$3658 * 0,3 = \mathbf{1097,4} \text{ тонни.}$$

Отже, згідно проведеного аналізу склероглюканом потрібно забезпечити, виготовлення

$$235 + 1097,4 = 1332,4 \text{ тонни косметичних засобів.}$$

Відомо, що середній вміст згущувачів, стабілізаторів , наповнювачів становить 2-3%

$$1332,4 * 0,025 = 33,31 \text{ тон склероглюкану.}$$

Отже, річна потужність виробництва, з урахуванням можливих затрат на різних етапах виробництва становитиме: **34** тонни/рік.

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для забезпечення косметологічного ринку необхідно отримувати 34 тон склероглюкану.

Мінімально можлива кількість робочих днів, які можуть бути використані для виробництва продукції, становить 30 днів, максимальна – 330 днів. Прийmemo, що для даного виробничого біосинтезу необхідно 150 робочих трудоднів на рік.

Продуктивність штаму продуцента становить 0,026 кг/л. Розраховуємо яку кількість продукту яку можна отримати за добу, враховуючи кількість трудоднів ($V_{\text{гдн}} = 150$).

- Кількість продукту на добу, кг/добу:

$$G_{\text{нтд}} = G_{\text{нт}}/T_{\text{рд}} = 34000/150 = 226,7 \text{ кг/добу}$$

- Кількість готового препарату за цикл, кг/цикл

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{нтд}} * T_{\text{цф}}/24 = 226,7 * 58 / 24 = 548$$

- Кількість циклів на рік:

$$N_{\text{цк}} = G_{\text{нт}}/G_{\text{цк}} = 34000 / 548 = 62$$

- Об'єм культуральної рідини, у якій можна отримати дану кількість полісахариду за цикл з урахуванням втрат ($E_{\text{св}} = 20\%$) буде становити:

$$\begin{aligned} V_{\text{кр}} &= K1 \cdot G_{\text{цк}} * C_{\text{Ргп}}/P_{\text{кр}} \cdot (1 - E_{\text{св}}) = \\ &= (1.1 \times 548 \times 0,92)/(1 - 0.2) \times 0,026 = 26662 \text{ л.} \end{aligned}$$

Переводимо - 26,7 м³/цикл.

- Вихід продукту у кг з 1 м³ культуральної рідини:

$$P_{\text{кр}} = G_{\text{цк}}/V_{\text{кр}} = 548/26,7 = 20,6$$

3.3.1 Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу.

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

$$V_{\text{ф1}} = V_{\text{кр}}/(1 - E_{\text{ф}}) = 26,7/(1 - 0,1) = 29,7 \text{ м}^3.$$

- Кількість поживного середовища в ферментері складе:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{ф}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 29,7 / (1 + 0,1) = 27 \text{ м}^3.$$

- Необхідна кількість посівного матеріалу:

$$V_{\text{пмф1}} = V_{\text{ф}} - V_{\text{пс}} = 29,7 - 27 = 2,7 \text{ м}^3$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_3 = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{\text{гф}} = V_{\text{ф}} / K_3 = 29,7 / 0,6 = 49,5 \text{ м}^3$.

Обираємо стандартний ферментер геометричним об'ємом **50 м³**.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

1) Для одержання 2,7 м³ (2700 л) інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

- Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{ф2}} = V_{\text{пмф1}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 2700 / (1 - 0,1) = 3000 \text{ л},$$

- Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{ф2}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 3000 / (1 + 0,1) = 2727,3 \text{ л}.$$

- Необхідна кількість посівного матеріалу:

$$V_{\text{пмф2}} = V_{\text{ф2}} - V_{\text{пс2}} = 3000 - 2727,3 = 272,7 \text{ л}.$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_3 = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{\text{гф2}} = V_{\text{ф2}} / K_{32} = 3000 / 0,6 = 5000 \text{ л}$.

Обираємо стандартний ферментер геометричним об'ємом **5 м³**.

Утоянюємо коефіцієнт заповнення:

$$3000 / 5000 = 0,6$$

2) Для одержання 272,7 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

- Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{ф3}} = V_{\text{пмф2}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 272,7 / (1 - 0,1) = 303 \text{ л},$$

- Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{ф3}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 303 / (1 + 0,1) = 275,5 \text{ л}.$$

- Необхідна кількість посівного матеріалу:

$$V_{\text{пмф3}} = V_{\text{ф3}} - V_{\text{пс3}} = 303 - 275,5 = 27,5 \text{ л.}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_3 = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{\text{гф3}} = V_{\text{ф3}}/K_{33} = 303/0,6 = 505 \text{ л.}$

Обираємо стандартний ферментер геометричним об'ємом **0,63 м³**

Утоянюємо коефіцієнт заповнення:

$$303/630 = 0,5$$

3) Для одержання 27,5 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

- Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{ф4}} = V_{\text{пмф3}}/(1 - E_{\text{ф}}) = 27,5/(1 - 0,1) = 30,6 \text{ л,}$$

- Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{ф4}}/(1 + X_{\text{ф}}) = 30,6/(1 + 0,1) = 27,8 \text{ л.}$$

- Необхідна кількість посівного матеріалу:

$$V_{\text{пмф4}} = V_{\text{ф4}} - V_{\text{пс4}} = 30,6 - 27,8 = 2,8 \text{ л.}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_3 = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{\text{гф4}} = V_{\text{ф4}}/K_{34} = 30,6/0,6 = 51 \text{ л.}$

Обираємо стандартний ферментер геометричним об'ємом **60 л.**

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$30,6/60 = 0,51$$

4) Кількість інокуляту для засіву малого посівного апарата $V_{\text{пмф4}} = 2,8 \text{ л}$ можна одержати культивуванням грибів у колбах на качалці.

Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{3к} = 0,2$.

- Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить:

$$V_{\text{кол}} = V_{\text{пмф4}}/(1 - E_{\text{кол}}) = 2800/(1 - 0,01) = 2830 \text{ мл.}$$

- Кількість поживного середовища в посівному апараті становить:
- $V_{\text{пс5}} = V_{\text{кол}} / (1 + X_{\text{кол}}) = 2830 / (1 + 0,1) = 2570$ мл
- Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання колб, мл:

$$V_{\text{пмф5}} = V_{\text{кол}} - V_{\text{пс5}} = 2830 - 2570 = 260 \text{ мл.}$$

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пмф4}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}) = 2830 / (750 \times 0,2) = 19$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно **19** качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу полісахариду склероглюкану у ферментері об'ємом 50 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити в чотири стадії.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

На сьогодні біосинтез склероглюкану є практично невідомий. Однак гіпотетичні шляхи були описані (*Brigand 1993; Survase et al. 2007a*) дотримуючись загальної схеми синтезу екзополісахаридів.

Етапи біосинтезу екзополісахаридів включають синтез фосфорильованих попередників (глюкозо-6-фосфат), синтез нуклеозиддифосфатпохідних (УДФ) та реакції полімеризації, за допомогою сполук ліпідної природи (ліпід-Ф), що локалізовані в цитоплазматичній мембрані.

Взаємоперетворення вуглеводів

Ростовим субстратом для біосинтезу склероглюкану в поживному середовищі є сахароза.

Склад середовища для культивування склероглюкану наведений нижче: Сахароза – 150 г/л; NaNO_3 - 2,25 г/л; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ - 2,0 г/л; KCl - 0,5 г/л; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 г/л; дріжджовий екстракт – 1,0 г/л; лимонна к-а - 0,7 г/л; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05 г/л [1].

Внутрішньоклітинне руйнування дисахаридів починається з пірофосфолітичного розщеплення за участю ферментів фосфорилаз.

Отже, сахароза розщеплюється сахарозофосфорилазою до глюкозо-1-фосфату та фруктози.

Фруктоза включається в обмінні процеси, шляхом перетворення на інтермедіати гліколізу. Під впливом специфічної фруктокінази, що каталізує фосфорилування фруктози, утворюється фруктозо-1-фосфат, що розщеплюється під дією альдолази (фруктозо-1-фосфатальдолази) на дві тріози: гліцеральдегід та діоксиацетонфосфат.

Діоксиацетонфосфат – інтермедіат гліколізу, перетворюється під дією тріозофосфатізомерази на гліцеральдегід-3-фосфат.

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Ярош У. М.				РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Тетеріна С. М.						30	147
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т. П.							

Друга з тріоз – гліцеральдегід також перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат під дією тріозокінази.

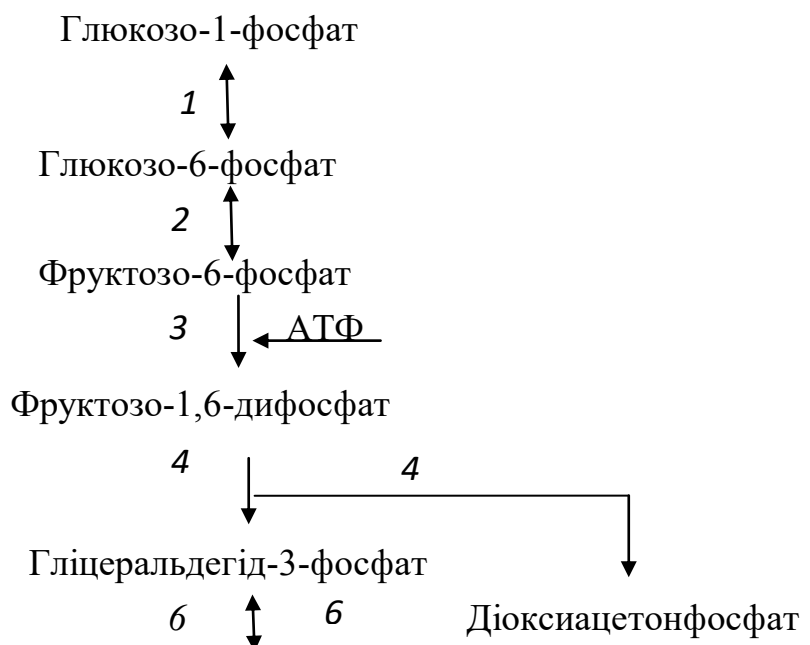
Катаболізму ростового субстрату

Під дією ферменту фосфоглюкомутаза (K01835) глюкозо-1-фосат перетворюється на глюкозо-6-фосфат. Фермент глюкозо-6-фосфатізомераза (K01810) каталізує взаємне перетворення глюкозо-6-фосфату та фруктозо-6-фосфату. Після чого 6-фосфофруктокіназа (K00850) активує перетворення фруктозо-6-фосфату на фруктозо-1,6-дифосфат.

На наступному етапі, під дією ферменту фруктозобіфосфатальдолази (K01624), здійснюється перетворення фруктозо-1,6-дифосфату до двох сполук: гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат.

Далі фермент гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (K00134) залучається до перетворення гліцеральдегід-3-фосфату на 1,3-дифосфогліцерат, який під дією фосфогліцераткінази (K00927) перетворюється на 3- фосфогліцерат.

Фермент 2,3-біфосфогліцерат (K15633) каталізує перетворення 3-фосфогліцерату до 2-фосфогліцерату, який за допомогою енолази (K01689) перетворюється на фосфоенолпіруват. [2]



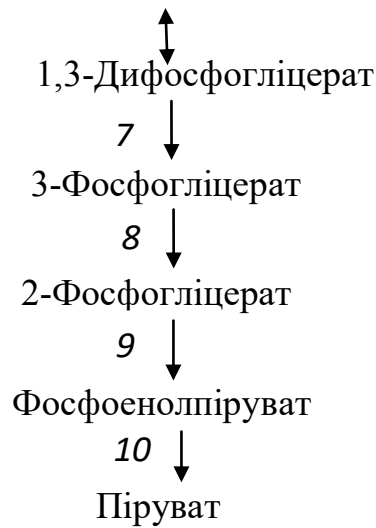


Рис. 4.1. Катаболізм глюкозо-1-фосфату у *S. rolfesii*

Ферменти: 1 – фосфоглюкомутаза (K01835); 2 - глюкозо-6-фосфат ізомераза (K01810); 3 - 6-фосфофруктокіназа (K00850); 4 - фруктозобіфосфатальдолаза (K01624); 5 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (K00134); 6 - тріозофосфатізомераза (K01803); 7 - фосфогліцераткіназа (K00927); 8 - 2,3-біфосфогліцерат (K15633); 9 - енолаза (K01689); 10 - піруваткіназа (K00873)

Повну схему катаболізму ростового субстрату див. Додаток 1.

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Вихідним продуктом для синтезу склероглюкану є глюкозо-6-фосфат, що утворюється у гліколізі.

Глюкозо-6-фосфат за участі фосфоглюкомутази перетворюється в глюкозо-1-фосфат. УДФ-глюкозо-1-фосфат уридилілтрансфераза активує глюкозо-1-фосфат до УДФ -глюкози. Після чого відбувається полімеризація ланцюга, з використання УДФ-глюкози як мономерної ланки (1 → 3) -β-глюкансинтазою. Передбачається, що останній крок, що призводить до (1 → 6) -β розгалуження на кожній третій молекулі глюкози, каталізується транс-D-глюкозидазами.

Цикл трикарбонних кислот

Ацетил-КоА вводиться в цикл в результаті цитрат-синтазної реакції, в якій оксалоацетат і Ацетил-КоА конденсуються з утворенням цитрату. За участі аконітази цитрат перетворюється на ізоцитрат. Ізоцитратдегідрогеназа каталізує реакції перетворення ізоцитрату на 2-оксоглутарат. Під дією 2-

оксоглутаратдегідрогенази з 2-оксоглутарату утворюється сукциніл-коА, що перетворюється на сукцинат за допомогою ферменту сукцинаттіокінази. Сукцинатдегідрогіназа здійснює окиснення сукцинат до фумарату. На наступному етапі циклу ферменту фумараза приєднує до фумарату воду та утворює малат. За допомогою малаьдегідрогенази відбувається дегідрування малату до окслоацетату.

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Найбільш сприятливими умовами для культивування *S. rolfsii* ATCC 201126 є наступні параметри: температура 30 ° С, початкове рН 4,5 (далі не контролюється протягом всього процесу). Культивування здійснюється при інтенсивному аеруванні.

Відомо, що приготування стандартного посівного матеріалу для роду *Sclerotium* як правило, є проблематичним, оскільки він не виробляє спори.

Однак для роду *Sclerotium* характерна здатність до утворення стійких структур, що називаються склероціями, які можуть бути використані для приготування інокулятів [1].

Активація склероцій у воді, з подальшим субкультивуванням в середовищі ПМ20 забезпечує правильну стандартизацію інокуляту.

Як і для будь-якого іншого мікробного процесу, виробництво склероглюкану вимагає деяких специфічних умов культивування, які стають критичними для досягнення максимальної продуктивності.

Для виробництва склероглюкану з *S. rolfsii* ATCC 201126 багато з цих умов спочатку експериментально регулювали в скляній колбі і потім масштабували до біореактора.

Відомо, що існує два способи отримання склероглюкану: періодичний процес та безперервний.

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Ярош У. М.					34	147
Перевір.		Тетеріна С. М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т. П.				Кафедра БТМ		

Проте, перевага надається періодичному, за якого продукуючий мікроорганізм інокулюється в культуральному середовищі, що містить всі необхідні поживні речовини. За цих умов виробництво EPS відбувається до вичерпання субстрату.

На відмінну від періодичного культивування, безперервна культура є менш ефективною щодо урожайності та якості продукції [1].

Оптимальною температурою для культивування *S. rolfsii* є 30 ° C, оскільки даний гриб є мезофілом.

Важливою умовою, для синтезу максимальної кількості цільового продукту (26 г/л) є підживлення середовища. Початкова концентрація сахарози у середовищі повинна становити не більше 40 г/л. При більшій концентрації джерела живлення починається інгібування цільового продукту.

Виробництво EPS характеризується утворенням дуже в'язкого культурального бульйону, що спричинене утворенням стійких структур – склероцій. При низьких та помірних швидкостях перемішування гриб утворює міцеліальні гранули. Це призводить до унеможливлення перенесення поживних речовин та кисню, вивільнення токсичних продуктів.

Тому процес культивування *S. rolfsii* ATCC 201126 проводять у ферментері з перемішуванням.

Так як *S. rolfsii* є аеробним мікроорганізмом, обов'язковою вимогою до процесу культивування є безперервна аерація середовища.

Отже, при масштабуванні до біореактора, слід використовувати реактори з резервуаром для перемішування, при наступних робочих умовах:

- підживлення середовища розчином сахарози,
- швидкість мішалки, 400 об/хв;
- температура, 30 ° C;
- початковий рН 4,5,
- швидкість повітряного потоку, 0,5 мкВт [1].

Обґрунтування вибору ферментера

Виробництво склероглюкану з *S. rolfsii* ATCC 201126 характеризується утворенням дуже в'язкого культурального бульйону.

Процес культивування *S. rolfsii* ATCC 201126 проводять у ферментері за високої швидкості перемішування (до 400 об/хв.) для попередження утворення гранул склероцію.

Обраний ферментер для культивування *S. rolfsii* оснащений турбінами Rushton, крильчатками радіального потоку. В систему перемішування входять відбивні перегородки – вузькі металеві пластини, прикріплені до внутрішніх стінок реактора. Ці перегородки запобігають виникненню повітряної воронки навколо мішалки, переводячи круговий рух рідини у вихровий, рівномірно розподілений по всьому об'єму [1].

Також проводились дослідження культивування *S. rolfsii* ATCC 201126 у ALR-ферментерах з внутрішніми та зовнішніми петлями, без механічного перемішування. Проте механічний спосіб перемішування на практиці є більш поширеним.

Аерація культуральної рідини забезпечується шляхом подачі повітря через барботер, який встановлений у нижній частині ферментера.

Для забезпечення оптимальної температури (30 °C), ферментер має бути оснащений термодатчиком та нагрівальними елементами такими, як теплообмінні кожухи до яких підведено тепло- та холодоносій.

Всім вище перерахованим вимогам відповідає ферментер Solida Biotech. Ферментери даного виробництва виробляють по індивідуальним замовленням, реалізуючи бажані параметри.

Даний ферментер повинен бути обладнаний:

- барботером в нижній його частині для подачі аераційного повітря;
- обладнаний мішалкою для забезпечення ефективних масообмінних процесів;
- наявні датчики: рН, температури, тиску, розчиненого кисню та рівня піни.

- клапан для підживлення [19].

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

S. rolfssii ATCC 201126 потребує культивування в аераційних умовах.

Відповідно в технологічній схемі необхідно передбачити стадії підготовки аераційного повітря.

Оскільки втрати аераційного повітря будуть порівняно великі, доцільно підготовку повітря здійснювати в окремих будівлях – компресорних відділеннях.

Підготовка аераційного повітря складається з наступних стадій:

- збір атмосферного повітря проводять за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником. Відбір здійснюється у найвищій точці.
- очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) здійснюється на плоских тканинних фільтрах грубого очищення;
- стиснення повітря в компресорах або турбоповітродувках (повітря нагрівається до температури 120-200⁰С);
- охолодження стисненого повітря до температури «точки роси», за даної температури волога повітря конденсується (використовують водяні теплообмінники різного типу: кожухотрубні, «труба в трубі»);
- видалення конденсованої води та парів мастила, що потрапили з компресора, у ресивері (ємність великого об'єму); крім того ресивер зменшує пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря;
- стабілізація показників (тиск, температура) підігріванням паром до температури 45-50⁰С у відповідних теплообмінниках;
- очищення у головних ємнісних набивних фільтрах (проводять для досягнення ступеня очищення $E=95\%$). Головні фільтри, зазвичай, встановлюють поблизу ферментаційних відділень;
- очищення в індивідуальних фільтрах. Повітря від головних фільтрів через трубопроводи (колектори) подається безпосередньо до індивідуальних

фільтрів, встановлених на ферментері. Очищення проводять до досягнення ступеня очищення E 99,99%.

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Для підтримання чистоти у виробничих приміщеннях здійснюють наступні операції (виробництво склероглюкану здійснюється упродовж 150 днів:

- миття підлоги - кожного дня -150 разів.
- обробка стін, вікон та підлоги – генеральне прибирання – щомісячно – 5 разів.
- обробка обладнання – перед кожним циклом (62 цикли) плюс додаткове миття після останнього циклу – 63 рази

Для підтримання чистоти використовують відповідні миючі та дезінфікуючі засоби. Для розрахунку кількості цих засобів необхідно встановити площу оброблення, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту 8 м.

Виробництво склероглюкану передбачає використання та підготовку такого обладнання: ферментер (1) - 50 м³, УБС-20, інокулятор (1) – 5 м³, інокулятор (2) – 630 л, інокулятор (3) – 60 л, збірники для приготування та стерилізації компонентів поживного середовища, качалки, а також бокс та лабораторне устаткування.

Слід врахувати, що ферментер на 50 м³, УБС-20 та збірник відповідного об'єму – це ємнісне обладнання, яке встановлене на валах та потребує розміщення обслуговуючого майданчика. З розрахунку на це, виділяється окрема кімната – цех виробничого біосинтезу.

Відповідно даним, наведеним на сайті виробника ООО «Био-Рус» габарити ферментера об'ємом 50 м³ становитимуть 3,15 м ширина, та 6,3 м висота. Габарити іншого обладнання наведені у *табл 5.1*

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва склероглюкану *S. rolfsii* ATCC 201126

Обладнання	Геометричний об'єм,	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер	50 м ³	3,15	6,3
Реактор-змішувач для приготування середовища для виробничого біосинтезу	50 м ³	3,15	6,3
Реактор-змішувач для приготування підживлювального розчину	9 м ³	1,8	3,6
УБС-20	20 м ³	2,4	4,8
Інокулятор (1)	5 м ³	1,47	2,94
Реактор-змішувач для приготування середовища для культивування в інокуляторі (1)	5 м ³	1,47	2,94
Інокулятор (2)	630 л	0,74	1,48
Реактор-змішувач для приготування середовища для культивування в інокуляторі (2)	630 л	0,74	1,48
Інокулятор (3)	60 л	0,34	0,67
Реактор-змішувач для приготування середовища для культивування в інокуляторі (3)	60 л	0,34	0,67
Загальні розміри	140 380		

На рис. 1 наведено приблизний план приміщення.

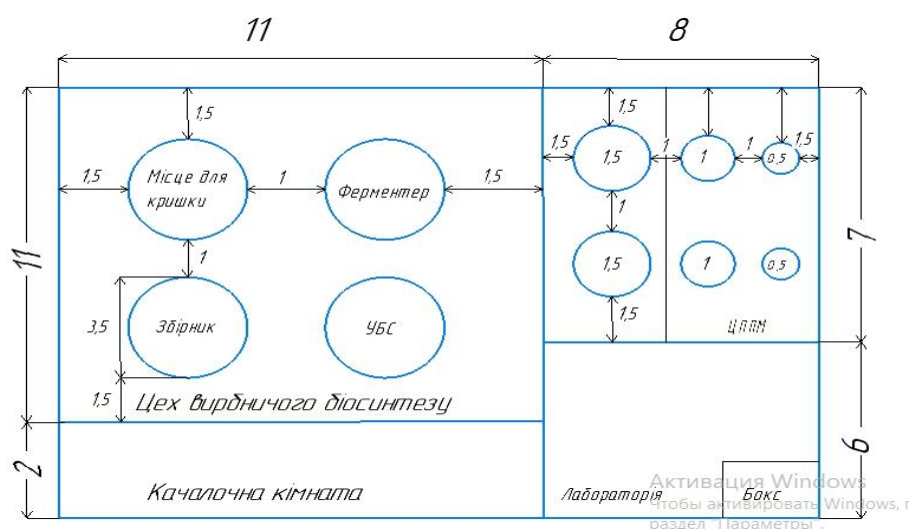


Рис. 1. План виробничого приміщення для синтезу склероглюкану *S. rolfsii* ATCC 201126

Відстань між стінами та апаратами становить 1,0 - 1,5 метра. Ширина проходів між ємнісними апаратами складає 1 метр.

Також, необхідно врахувати, що за приблизним планом виробництва цех виробничого біосинтезу становитиме 2 поверхи, тому необхідно врахувати площу підлоги та стін другого поверху.

Розраховуємо приблизну площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту 2,5 м, *табл. 5.2*

Таблиця 5.2

Розрахунок площі приміщень для виробництва комплексного мікробного препарату

Тип приміщення	Обладнання	Призначення	Площа підлоги, м²	Площа стін *, м²
Мікробіологічна лабораторія	Бокс, термостати, холодильники, апарати для проведення різних видів контролю	Контроль біологічний вихідної сировини і готового продукту	48	70
Качалочна кімната	Качалки	Отримання інокуляту в колбах на качалках	22	65
Цех підготовки ПМ, вирощування інокуляту	Інокулятори об'ємами 60 л, 630 л, 5 000 л, реактори-змішувачі	Приготування, стерилізація, вирощування інокуляту в інокуляторах,	56	75
Цех виробничого біосинтезу	Ферментер 50 м ³ , УБС-20, реактори-змішувачі	виробничий біосинтез	121+121*	110+110
Разом			368	430

* два поверхи цеху виробничого біосинтезу

Отже, загальна площа приміщень, що потрібно обробляти становить 798 м².

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва наведено в *табл. 5.3*.

Таблиця 2.3

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва склероглюкану

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (л)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) оброблюваного об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)
Обладнання, інвентар, комунікації	140 380	63	8 843 940
Підлога	368	150	55 200
Стіни, двері, вікна	430	5	2 150

При виборі мийних (для обладнання і комунікацій) та дезінфікувальних (стін, підлоги, вікон, дверей) засобів, потрібно враховувати їх вартість та витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення.

Приблизно на 1 м² затрачається 100 мл робочого розчину миючого чи дезінфікувального засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502)

Ємнісне обладнання миють автоматичною мийкою СІР, при цьому витрати мийного засобу складають 20% від загального об'єму обладнання. Враховуючи це, для миття обладнання необхідно:

$$8\,843\,940 \times 0,2 = 1\,768\,788 \text{ м}^3 \text{ мийного засобу на рік.}$$

Дезінфікувальний засіб рекомендовано змінювати раз в 3 місяці, щоб уникнути виникнення резистентних форм мікроорганізмів. Оскільки виробництво триває 150 днів, то потрібно підібрати як мінімум 2 різних засоби.

Таблиця 5.4

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва склероглюкану

Назва мийного/ дезінфікувального засобу	Активна діюча речовина	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн.	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття, дезінфекції за весь період виробництва, грн
Лів з активним хлором	Гіпохлориднатрію	Обладнання	3,0	8 843 940	1 768 788	43,74	1,31	2 317 112
Каустична сода	Їдкий натрій	Обладнання	2,0	8 843 940	1 768 788	18,75	0,35	619 075
Вітол	Суміш солей неорганічних кислот, ПАВ	Обладнання	0,5	8 843 940	1 768 788	22	0.11	194 567
Біомой	Сульфонол, лужна протеаза	Обладнання	0,3	8 843 940	1 768 788	116	0,35	619 075
Хлорантоін	Хлор активний	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2	57 350	5 735	230	0,46	2 638
Гембар	Гуанідинова полімерна сполука	Стіни, підлога, вікна, двері	0,1	57 350	5 735	262	0,26	1 419
Лойран–про 13	Їдкий натрій, ПАР, гліцерин	Стіни, підлога, вікна, двері	2	57 350	5 735	31	0,62	3 556
Саніфект		Стіни, підлога, вікна, двері	1	57 350	5 735	309	3,09	17 720

Примітка. Ціни наведено станом на жовтень 2019 р.: <https://prom.ua>

Отже, проаналізувавши *табл. 5.4*, для миття обладнання доцільно буде використовувати миючі засіб «Вімол», а для миття стін, підлоги, вікон та дверей – «Хлорантоїн», та «Гембар» адже враховуючи концентрацію даних розчинів, та їх вартість за один літр (кілограм) - витрати на їх закупку для всього періоду виробництва є найменшими.

Кожні три місяці дезинфікуючі засоби необхідно змінювати, для унеможливлення утворення резистентних штамів мікроорганізмів.

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

Лужні та нейтральні солі забезпечують високу миючу дію препарату. Використовується проти грампозитивних та грамнегативних вегетативних бактерій, грибів, ліпофільних вірусів. При зберіганні не розкладається. Наявність в складі пом'якшувачів води дозволяє використання розчину препарату при підвищеній жорсткості води.

Використовується для миття обладнання, тари, трубопроводів на підприємствах.

Зберігають в упакованому вигляді в закритих сухих провітрюваних приміщеннях за температури від мінус 10 до 40 °С, відносної вологості повітря не більше 85%, захищають від дії сонячних променів.

«Хлорантоїн» - хлорактивний, багатокомпонентний, поліфункціональний дезінфекційний засіб з миючим ефектом.

Хлорантоїн зберігають в упаковці виробника в критих, сухих, провітрюваних приміщеннях, недоступних для загального користування, на відстані не менше 1 м від нагрівальних приладів, при температурі від 5 °С до 30 °С.

Ящики і мішки із засобом зберігають на плоских дерев'яних піддонах або піддонах з полімерних матеріалів в штабелях

Гарантійний термін зберігання становить 3 роки з дати виробництва. Робочі розчини готують безпосередньо перед обробкою, щоб запобігти розкла-

данню та інактивації діючої речовини. При роботі з засобами, що містять хлорактивні речовини важливо пам'ятати про засоби індивідуального захисту (маска на обличчя та захисні рукавиці) [22].

Зазначимо, що ефективний час експозиції даного миючого засобу за концентрації 0,2 г/л – 30 хв, проте можливо використовувати при концентрації 0,1 г/л при обробці впродовж 1 години

«Гембар» є нетоксичною гуанідиною полімерною сполукою, використовується для дезінфекції поверхонь, інвентарю і посуду.

Препарату характерна пролонгована бактерицидна та фунгіцидна дія, низька токсичність і висока безпечність. Робочі розчини є стабільними. Не леткий (дозволяє проводити дезінфекцію в присутності людей, а обслуговуючому персоналу при роботі з робочими розчинами не застосовувати традиційних засобів індивідуального захисту очей і слизових оболонок); не агресивний до різних матеріалів (не знебарвлює тканини, не викликає корозію). Не викликає алергій, пошкоджень шкіри.

Для забезпечення належної чистоти повітря у виробничих приміщеннях передбачають наявність бактерицидних ламп, які вмикають на 1,5–2 год після проведення генерального прибирання (проводиться раз на тиждень), в попередньо звільнених від персоналу приміщеннях.

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого біосинтезу склероглюкану *S. rolf sii* ATCC 201126 використовується середовище наступного складу (г/л):

Таблиця 5.5

Склад компонентів поживного середовища для культивування *S. rolf sii* ATCC 201126 – продуцента склероглюкану

	Компонент середовища	Вміст, г
1	Сахароза	150
2	NaNO ₃	2,25
3	K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O	2
4	KCl	0,5
5	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5
6	дріжджовий екстракт	1,0
7	лимонна к-а	0,7
8	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,07

Найбільш сприятливими умовами для культивування *S. rolf sii* ATCC 201126 є наступні параметри: температура 30 ° С, початкове рН4,5 (далі не контролюється протягом всього процесу). Культивування здійснюється при інтенсивному аеруванні [1].

Важливою умовою, для синтезу максимальної кількості цільового продукту (26 г/л) є підживлення середовища. Початкова концентрація сахарози у середовищі повинна становити не більше 40 г/л. При більшій концентрації джерела живлення починається інгібування цільового продукту. Тому подальше культивування проходить за умови підживлення 50% розчином сахарози.

Культивування в колбах на качалці

При культивуванні в колбах на качалці (кількість інокуляту становить

3000 мл, з них поживне середовище - 2830 мл), необхідно внести компоненти поживного середовища в таких пропорціях (табл. 5.6):

Таблиця 5.6

Склад компонентів поживного середовища для культивування *S.rolfsii* ATCC 201126– продуцента склероглюкану в колбах

Компонент середовища	Вміст, г/(1000 мл)	Вміст, г/(2830 мл)
Сахароза	30	84,9
NaNO ₃	2,25	6,37
K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O	2	5,7
KCl	0,5	1,42
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	1,42
дріжджовий екстракт	1,0	2,83
лимонна к-а	0,7	2
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,07	0,2

Перед початком приготування середовища, всі компоненти потрібно простерилізувати.

Для цього компоненти, що входять до використовуваного середовища розділяють на композиції, в залежності від їх хімічної сумісності та режимів їх стерилізації.

Композиція А.

До складу входять даної композиції входять сахароза, дріжджовий екстракт та лимонна кислота. Стерилізація цих компонентів проходить при температурі 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

При стерилізації фосфоровмісних компонентів з магнієвими чи кальцієвими солями можливе випадіння в осад фосфатів кальцію та магнію. Тому решту компонентів варто розділити на наступні композиції:

Композиція В.

До даної композиції входять такі компоненти як NaNO_3 та $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$. Стерилізація проходить за умов: $t=131^\circ\text{C}$ та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

Композиція С.

До складу композиції входять такі компоненти, як $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ та KCl . Стерилізація проходить при таких самих умовах як і попередня композиція: $t=131^\circ\text{C}$ та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв. Зважування всіх компонентів потрібно проводити на технічних вагах. Стерилізація компонентів середовища проводиться в автоклаві.

Культивування в інокуляторах об'ємом 60л, 630 л та 5 м³

Оскільки об'єми поживних середовищ занадто великі для стерилізації в автоклаві, їх потрібно стерилізувати безпосередньо в посівному апараті. Перед кожним посівним апаратом розміщується збірник відповідного об'єму для приготування композиції. Це вимагає перескладання композицій поживного середовища:

Таблиця 5.7

Склад компонентів поживного середовища для культивування

S.rolfsii ATCC 201126– продуцента склероглюкану

	Вміст компонентів середовища, кг							
Робочий об'єм, л	Сахароза	Дріжджовий екстракт	Лимонна кислота	NaNO_3	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	KCl
Вміст компонентів г/л	30 **	1,0	0,7	2,25	2,0	0,5	0,07	0,5
29 700 *	891	29,7	20,8	66,8	59,4	14,85	2,1	14,85
3 000	90	3	2,1	6,75	6	1,5	0,203	1,5
303	9,09	0,303	0,212	0,68	0,606	0,15	0,021	0,15
30,6	0,92	0,0306	0,0214	0,0689	0,06	0,015	0,0021	0,015

*виробничий біосинтез,

**без урахування підживлювального розчину на етапі виробничого біосинтезу (загальний вміст на цьому етапі – 150 г/л)

Стерилізація компонентів у даних інокуляторах буде проходити за наступних умов.

Композиція А.

До складу даної композиції входять сахароза, дріжджовий екстракт та лимонна кислота. Стерилізація цих компонентів проходить при температурі 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв в збірнику, гострою парою.

Композиція В.

До складу даної композиції входять такі компоненти як NaNO_3 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ та KCl .

Для забезпечення можливості стерилізація солей разом потрібно приготувати титрувальні агенти (6% розчин хлоридної кислоти для підкислення середовища та 6% розчин гідроксиду натрію, для подальшого відновлення).

Стерилізація даної композиції проходить за умов: $t=131^\circ\text{C}$ та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв. Стерилізація компонентів середовища проводиться безпосередньо у ферментері.

Підготовка титрувальних агентів

Як було зазначено вище, для стерилізації всіх сольових компонентів разом необхідною є підготовка 6% розчину HCl . Для цього проводять розбавлення концентрованої кислоти, добавляючи кислоту у воду. Вміст необхідної кількості кислоти визначають за об'ємом композицій середовища, що підкилюється.

Для стабілізації кислотності (оптимальна кислотність для культивування *S.rolfsii* становить 4,5) використовують стерильний розчин NaOH .

Тому, для виробничого культивування титрувальні агенти готуються в окремих збірниках.

Розчини HCl та NaOH варто готувати у розрахунку 2 мл водних розчинів на 1 л середовища.

Підготовка підживлювального розчину

Підживлення середовища проводять лише на останньому етапі біосинтезу – у ферментері 50 м³.

Тоді упродовж культивування (після 20 год) потрібно внести ще 120 г/л (загальна кількість – 150 г/л). Останню порцію підживлювального розчину слід вносити за 8 год до закінчення культивування. Тобто, якщо загальна тривалість процесу культивування *S.rolfsii* ATCC 201126 становить 48 год, підживлювальний розчин (120 г/л) слід вносити протягом 20 год (з 21 години культивування по 40), тобто кожні 2 год по 12 г/л (22, 24 ...40 год).

Слід зауважити, при приготуванні підживлювального розчину, збірник слід обирати з урахуванням зміни об'єму, після змішування компонентів.

Обєм підживлювального розчину збільшиться на 50%.

Виробничий біосинтез у ферментері 50 м³

Проводять при $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, що досягається за допомогою теплообмінного кожуха, протягом 48 год. На 22 годині культивування починають вносити підживлювальний розчин. Підживлення здійснюють через кожні 2 год, до 40 години культивування.

Культивування ведуть до досягнення максимального накопичення цільового продукту (26г/л). Кожні 5 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

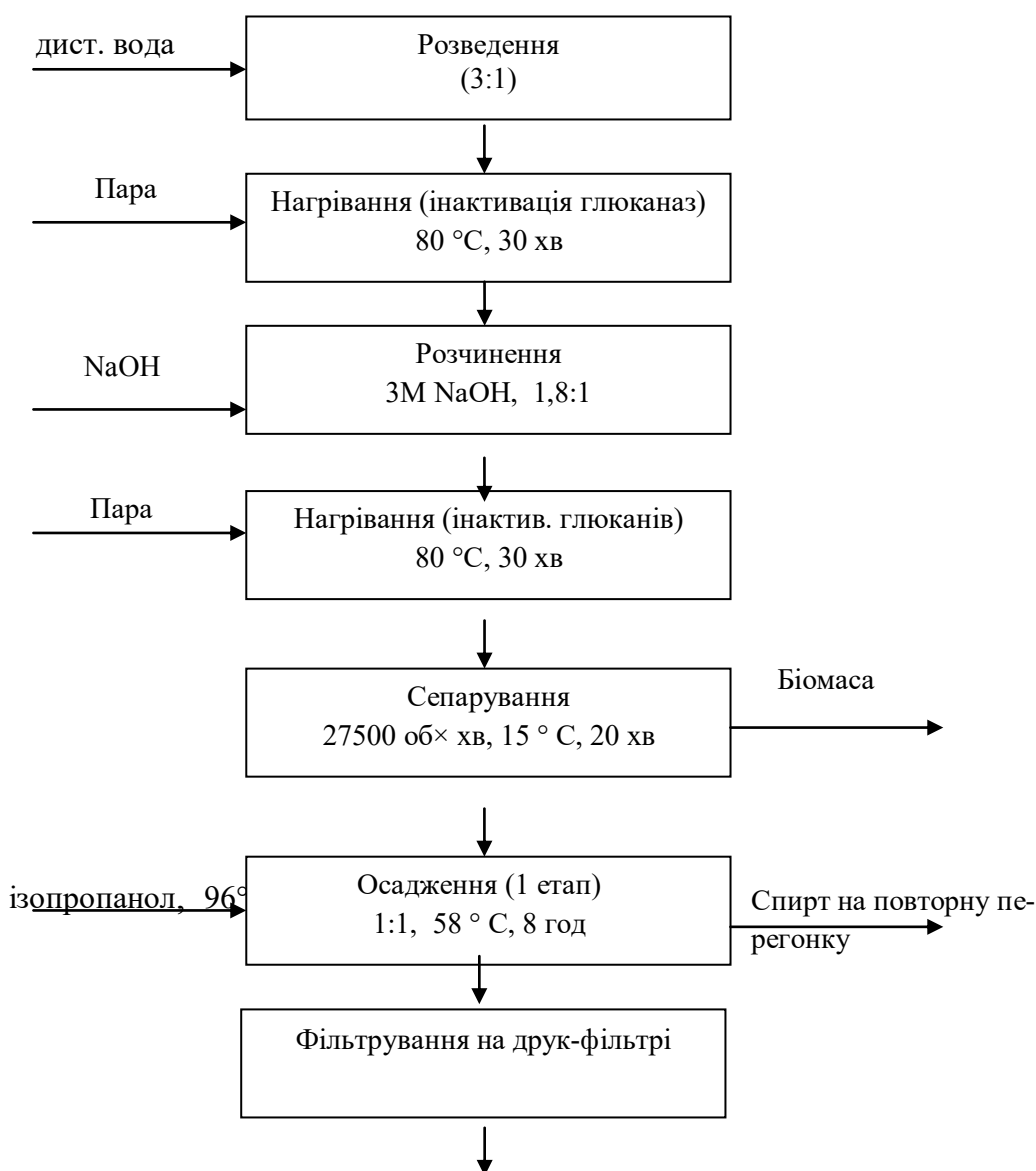
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

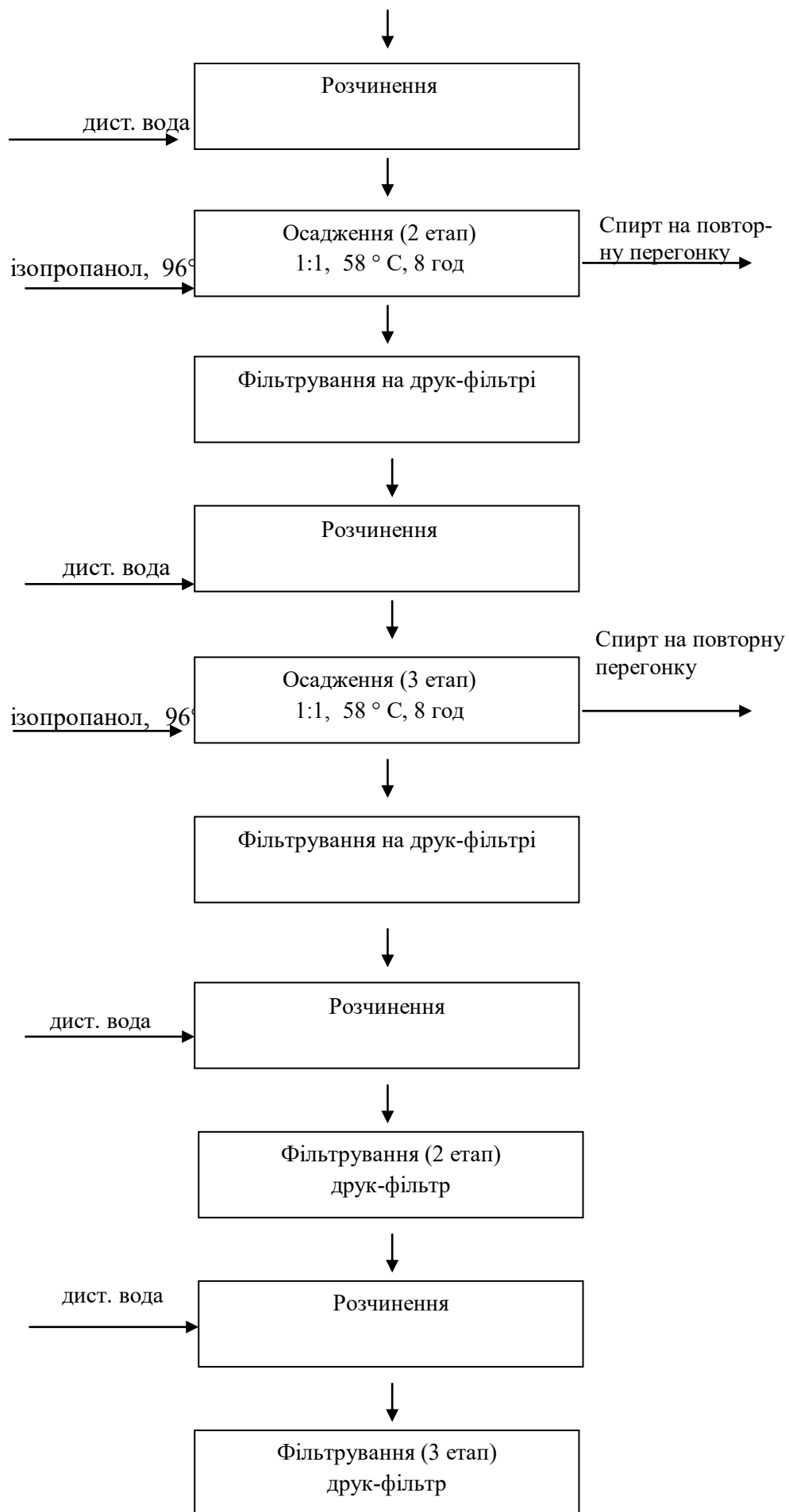
Склероглюкан, як готовий продукт, що використовується у косметології представляє білий, біло-жовтий порошок. Ступінь очищення готового продукту екзополісахариду – високий (фармацевтична промиловість (імуно-стимулятор, проносне) – найвищий).

Виділення склероглюкану є складним поетапним процесом.

На даному етапі дослідження виділення склероглюкану було встановлено кілька методів, проте найефективнішим методом, з високим ступенем очищення є наступний.

Промислово прийнятий протокол виділення склероглюкану включає наступні стадії:





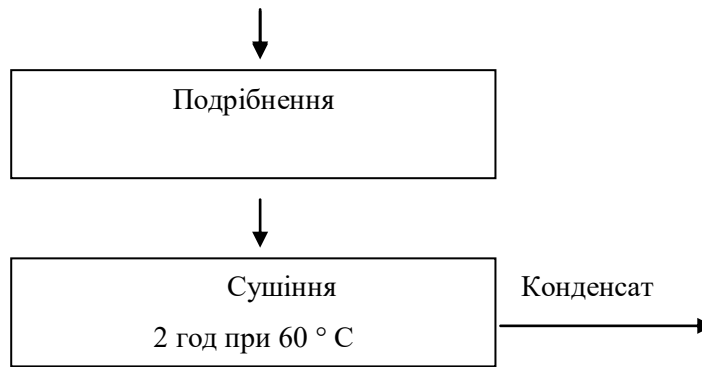


Рис.5.2 Схема отримання склероглюкану [1,17].

Обґрунтування попередньої обробки культуральної рідини. Відділення біомаси.

При культивуванні *S. rolfsii* ATCC 201126 утворюється досить в'язкий культуральний бульйон. Для проведення подальших стадій виділення склероглюкану необхідно зменшити його в'язкість.

Культуральну рідину триразово **розводять** дистильованою водою у співвідношенні 3:1 (дистильована вода : культуральна рідина). На даному етапі варто передбачити підготовку дистильованої води на виробництві.

Після розведення водою культуральної рідини проводять **нагрівання до 80°C**, продовж 30 хвилин з метою знищення мікробних клітин, інактивації небажаних ферментів (глюканаз) та полегшення відшарування EPS від клітин. Розчинення дистильованою водою та підігрівання можливо провести в реакторі, обладнаному сорочкою, датчиком температури і мішалкою.

Подальше руйнування капсул і зменшення в'язкості розчину відбувається за **нейтралізації** розчином NaOH.

Варто зазначити, що загальноприйнятий спосіб зменшення в'язкості розчинів екзополісахаридів за умови нагрівання розчину, є не доцільним.

Склероглюкан проявляє високу стійкість до температур. Даний екзополісахарид не втрачає своїх властивостей при високих температурах (до 149°C), при тому, що більшість полісахаридів втрачають в'язкість при температурі до 93 °C. Крім того при таких високих температурах склероглюкан не

руйнується вродовж тривалого проміжку часу, особливо в присутності малих кількостей кисню [1,2].

Склероглюкан має впорядковану потрійну спіральну конформацію при низьких концентраціях лугу нижче 0,15 М NaOH.

Водний розчин склероглюкану піддавали впливу розчину лугу різних концентрацій, щоб визначити критичну точку, в якій відбувається денатурація полімеру.

При більш високих концентраціях NaOH спостерігаються різкі зміни в'язкості, потрійні спіралі склероглюкану ймовірно, піддаються іонізації гідроксильних груп, які призводить до руйнування водневих зв'язків та подальшої денатурації полісахариду.

Денатуровані розчини виявляють значно нижчу або нульову в'язкість порівняно з розчинами, що містять триплекс.

Відносну зміну в'язкості можна розрахувати за формулою:

$$\frac{\eta_1 - \eta_2}{\eta_2} \times 100\%$$

де η_1 — в'язкість розчину ЕПС у досліджуваних умовах;

η_2 — в'язкість розчину ЕПС у дистильованій воді.

Оскільки, у використовуваній методиці не вказано молярність початкового використовуваного розчину лугу, опираючись на методику отримання іншого полісахариду, з подібними властивостями, для розчинення культуральної рідини склероглюкану необхідно використати 3М NaOH, у співвідношенні 1,8:1.

Розведений/нейтралізований бульйон *нагрівають* при 80 °С протягом 30 хв, щоб інактивувати зрештою вироблені глюкани, що руйнують ферменти, та сприяють утворенню побічного продукту оксалату. Утворення оксалату пригнічує синтез склероглюкану.

Для посилення солюбілізації глюкану у воді, *сепарують* (27500 об× хв, 15 °С, 20 хв) [1]. На даному етапі відбувається відділення біомаси.

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

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

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

Застосування сепарування дозволяє розділяти суспензію, що погано фільтрується, інтенсифікувати виділення та концентрування мікроорганізмів та твердих частинок розміром більше 0,5 мкм.

Обґрунтування способу виділення склероглюкану

Наступним етапом виділення є *осадження* цільового продукту.

За фізико-хімічними особливостями, склероглюкан осаджується при дії на нього органічного розчинника, завдяки впорядкованій потрійній спіральній конформації.

Склероглюкан з прозорого супернатанту осаджують додаванням еквівалентного об'єму органічного розчинника, як правило, нижчого спирту.

Для осадження склероглюкану один об'єм спирту змішують з одним об'ємом культуральної рідини. Цю суміш витримують при 58 ° С протягом 8 годин, для повного осадження екзополісахариду.

Для забезпечення високого рівня чистоти цільовоо продукту (98%) проводять трикратне осадження ізопропанолом.

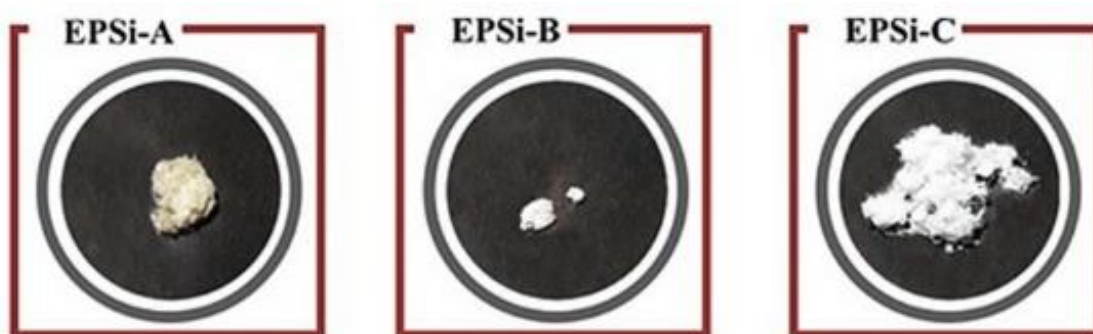


Рис. 2. Зовнішній вигляд EPS, вироблений *S. rolfsii* ATCC 201126 [3,20]. Склероглюкан, осаджений ізопропанолом після 1 (А), 2 (В) або 3 (С) етапів повторного розчинення / повторного осадження.

Обґрунтування способу відділення сухого продукту

Для концентрованих розчинів, що містять 15–40 % біологічно активних речовин, використовують процеси випарювання, фільтрації, кристалізації, ультрафільтрації, флотації та ін.

Отриманий осад склероглюкану **фільтрують** через друк-фільтр. Фільтрування є процесом розділення речовин, за якого з розчину вилучається розчинена речовина, завдяки тому, що гідравлічний тиск протискає тільки розчинник крізь відповідну мембрану.

Перевагою друк –фільтра є те, що цільовий продукт не підлягає тепловим і хімічним впливам, легко зберігається герметичність, апарат є простим в конструкції, компактним, має незначну енергоємність.

Склероглюкан фільтрують і розчиняють у воді. Цю дію повторюють тричі, після чого осад промивають дистильованою водою і висушують. В результаті отримують розчинений у воді сухий склероглюкан. Всі досліді і вимірювання проводять тричі.

Обґрунтування способу сушіння готового продукту

Наспуним етапом виділення є **сушіння**, процес видалення вологи з матеріалів (продуктів, препаратів).

Доцільно використовувати вакуумну сушарку, оскільки при сушінні можуть міститись залишки ізопропанолу, що є вибухонебезпечним. Вакуумна сушарка, на відміну від інших типів, дає можливість сушіння термічно нестійких речовин в розрідженому повітрі (в вакуумі до 0,01 атм).

Після випаровування ізопропанолу осад сушать у вакуумній сушарці протягом 2 год при 60 ° С.

Вибір обладнання

Сепаратори-просвітлювачі

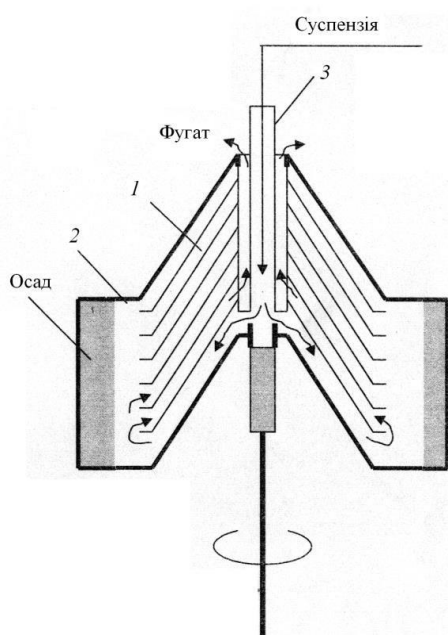


Рис. 5 – Схема роботи просвітлювального тарілчастого сепаратора періодичної дії

Культуральна рідина по центральній трубці для живлення надходить у внутрішню порожнину утримувача тарілки, а потім у шламівий простір барабана. Під дією відцентрової сили найбільш великі та важкі частинки біомаси відкидаються до периферії барабана, а рідина з більш дрібними частинками біомаси направляється в пакет конічних тарілок. Тонкий шар та ламінарність потоку забезпечує виділення найдрібніших частинок біомаси в міжтарілчастому просторі на внутрішніх поверхнях тарілок.

Просвітлена рідина – фугат піднімається по зовнішніх каналах утримувача тарілки в камері напірного диска та виводиться з барабана, а виділені частинки біомаси скочуються по поверхні тарілок у шламовий простір барабана. При повному заповненні шламового простору біомасою подачу культуральної рідини припиняють та за допомогою двох клапанів зливають фугат із міжтарілкового простору в приймач. Біомасу за допомогою механізму розвантаження викидають у приймач шламу.

Після припинення подачі буферної води в порожнину над поршнем барабан закривають і технологічний цикл повторюється [21].

Доцільно використовувати сепаратор MBRX 810H



Рис. 7. Сепараційна система

Повністю герметична сепараційна система MBRX 810H використовується для видалення часток розмірами від 0,5 до 500 мкм з рідини (сепарація бактерій, продуктів РДНК, ферментів, клітинних культур і вакцин)

Продуктивність даного апарату становить – 15 м³/год, що передбачає, що на підприємстві будуть паралельно працювати 4 установки.

Регульований обсяг вивантаження забезпечує вивантаження твердої фази з високим вмістом сухої речовини, зводячи втрати продукту до мінімуму. Оптимізовано для систем СІР. Регульована швидкість для полегшення оптимізації продуктивності.

Друк-фільтр

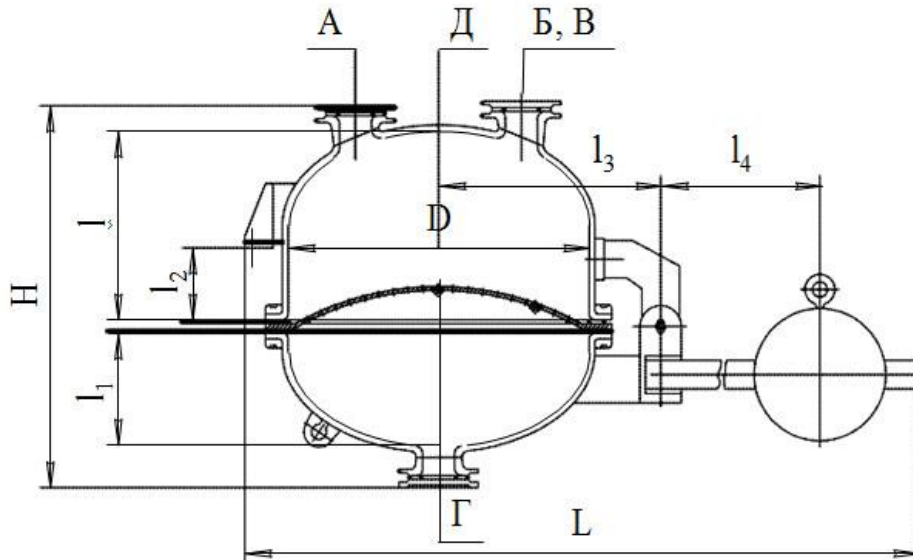


Рис. 6. Друк-фільтр

Друк фільтр – це пуч, який має закриту верхню половину. За рахунок конструкції таких фільтрів з'являється можливість формування в них високого тиску, який буде необхідним для забезпечення максимально високої швидкості фільтрації. Нижня частина пристрою є негерметичною, а необхідний тиск формується за рахунок застосування стисненого повітря.

Найбільш поширеним застосування такого обладнання є у випадках, коли мова йде про необхідність обробки ефірних, спиртових та інших органічних розчинників, що відрізняються досить низькою температурою кипіння.

Такі апарати мають досить велику фільтруючу поверхню, за рахунок чого вони відрізняються вкрай високою продуктивністю [22].

Друк-фільтри FitroDryer

Базова конструкція друк-фільтра являє собою циліндричну ємність зі знімним плоским дном. Мішалка з різною формою елемента дозволяє не тільки "зрізати" продукт з фільтра, але і не дає йому злежуватися.

Для вивантаження продукт (порошку) передбачений бічний патрубок. Промивання внутрішніх поверхонь відбувається за допомогою системи СІР-мийки.

Фільтруюча поверхня становить до $15,9 \text{ м}^2$

Продуктивність даного фільтра до 16 м³ на годину [23].

Вакуумна сушильна шафа

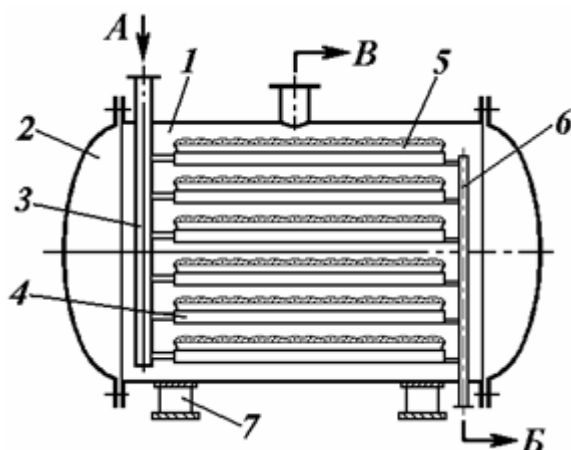


Рис. 7. Вакуумна сушильна шафа

1 - корпус; 2 - кришка; 3 - паровий колектор; 4 - нагрівні плити; 5 - полиці з матеріалом; 6 - колектор для відведення конденсату; 7 - опора; Потіки: А - гріюча пара; Б - конденсат; В - пароповітряна суміш

В корпусі сушарки 1 на опорній конструкції встановлені порожнисті нагрівальні плити 4, усередину яких через колектори підводять і відводять теплоносії. Полиці 5 з висушуваним матеріалом розміщують на нагрівні плити, на полицях перебуває вологий матеріал з висотою шару 20 - 40 мм. Після завантаження матеріалу шафу герметично закривають і за допомогою вакуум-насоса створюють у сушарці розрідження.

Для зниження втрат теплоти корпус і кришку вакуум-сушильної шафи теплоізолюють. При подачі теплоносія в плити матеріал, що висушується, на полицях нагрівається й з нього випаровується волога. Для зниження температури сушіння процес проводять під вакуумом, пари вологи відводять у конденсатор. При необхідності в процесі сушіння шар матеріалу, що висушується, періодично перемішують.

Сушіння матеріалу у вакуум-сушильній шафі триває декілька годин, після закінчення процесу матеріал охолоджують і вивантажують із сушарки, потім процес сушіння знову повторюють.

Вакуум-сушильні шафи UOS LAB



Рис. 8 Вакуум-сушильні шафи **UOS LAB**

Обігрів робочої камери здійснюється теплоносієм, що циркулює всередині двошарових полиць, плавно переходять в стінки камери. Завдяки оптимально підбраному теплообміну забезпечується рівномірний обігрів всього робочого простору і відсутнє утворення конденсату на стінках камери.

Вакуумні сушильні шафи **UOS LAB** виробляються за індивідуальними проектами, відповідно необхідних параметрів.

Особливості вакуум-сушильних шаф **UOS LAB**

- Потужність – до 3000 л.
- Кількість полиць - 3 ... 14 шт.
- Загальна площа поверхні полиць - 1,27 ... 15,44 м².
- Максимальна температура поверхні полиць 200 ° С.
- Рівномірний розподіл температури.
- Водяний або масляний теплоносій.
- Виготовлена з нержавіючої сталі марки AISi 304 або AISi 316 до складу якої входить молібден, що робить її особливо стійкою до корозії, високих температур і агресивних середовищ.
- Закруглені кути робочої камери і полиць.
- Зварні двері, виготовлені з урахуванням стандартів по теплоізоляція.

Інші типи сушарок (роторна, трубчастого типу, трикорпусна випарна, з примусовою циркуляцією) є недоцільними, оскільки процес сушіння буде вибухонебезпечним [21,24].

5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту

До допоміжних робіт відносять:

1. Підготовка дистильованої води
2. Підготовка розчинів для попередньої обробки культуральної рідини
3. Підготовка розчинів для осадження склероглюкану

Підготовка дистильованої води

Для отримання склероглюкану необхідно великі об'єми дистильованої води (на етапі розведення культуральної рідини, та на етапах триразового промивання після осадження). Тому доцільно очищувати воду на підприємстві.

Для дистиляції води в промислових масштабах використовують дистилятор для води MASCARINI.



Рис. 9. Дистилятор для води MASCARINI

Перевагами даної установки є його продуктивність (до 24 000 л/год – серія BD), простота та дешевизна обслуговування, можливість отримання дистильованої води температури 25-85 *С, високоефективне видалення неконденсованих газів

Основними вузлами будь-якого дистиляційного апарата є випарник, конденсатор і збірник. Суть методу перегонки полягає в тому, що вихідну воду заливають у випарник і нагрівають до кипіння. Відбувається фазове перетворення рідини в пару, при цьому водяні пари направляються в конденсатор, де конденсуються й у вигляді дистиляту надходять у збірник.

Підготовка розчинів для попередньої обробки культуральної рідини

Зменшення в'язкості культуральної рідини відбувається за *нейтралізації* розчином NaOH.

Оскільки, у використовуваній методиці не вказано молярність початкового використовуваного розчину лугу, опираючись на методику отримання іншого полісахариду, з подібними властивостями [25], для розчинення культуральної рідини склероглюкану необхідно використати 3М NaOH, у співвідношені 1,8:1.

Підготовка розчинів для осадження склероглюкану

Для виділення склероглюкану, були випробувані різні спирти (етанол 96°, ізопропанол, PEG та ін). Серед них виявили, що етанол 96° та ізопропанол дозволяють отримати найвищий коефіцієнт відновлення, високу ступінь чистоти, оптимальну розчинність у воді та найкращі реологічні властивості полісахариду.

За використання інших розчинників (спирти, луги) спостерігалась зміна кольору склероглюкану (пожовтіння, потемніння), зниження розчинності у воді.

Для осадження склероглюкану один об'єм 96° спирту змішують з одним об'ємом культуральної рідини. Цю суміш витримують при 58 ° С протягом 8 годин, для повного осадження екзополісахариду.

РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання.

За розрахунками у розділі ТЕО, потреба на рік становить 34 тони (34 000 кг), продуктивність штаму *S. rolfsii* АТСС 201126 становить 26 г/л (0,026 кг/л). Таку кількість необхідно виготовити за $T_{рд} = 150$ трудоднів.

Відомо, що максимальна концентрація склероглюкану накопичується в кількості 26 г/л, на середовищі наступного складу (г/л) (за умови високого вмісту вуглецю, початкова кількість джерела вуглецю становить 30 г/л, з подальшим підживленням, розчином сахарози:

C_1 - Сахароза – 30;

C_2 - Дріжджовий екстракт - 1,0;

C_3 - Лимонна кислота - 0,7;

C_4 - $NaNO_3$ - 2,25;

C_5 - $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 2;

C_6 - $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,5;

C_7 - $FeSO_4 \times 7H_2O$ - 0,07;

C_8 - KCl - 0,5;

Всього $C_{\Sigma л} = 37,02$ г/л.

Для вирощування посівного матеріалу використовують середовище такого ж складу (г/л):

C_1 - Сахароза – 30;

C_2 - Дріжджовий екстракт - 1,0;

C_3 - Лимонна кислота - 0,7;

C_4 - $NaNO_3$ - 2,25;

C_5 - $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 2;

C_6 - $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,5;

C_7 - $FeSO_4 \times 7H_2O$ - 0,07;

C_8 - KCl - 0,5;

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання.	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Ярош У. М.					64	147
Перевір.		Тетеріна С. М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т. П.					Кафедра БТМ	

Всього $C_{\Sigma л} = 37,02$ г/л [1].

Для подальших розрахунків приймаємо наступні показники:

- час роботи ферментера $T_{цф} = 58$ год, що включає в себе допоміжні стадії тривалістю 10 годин та 48 годин ферментації.
- $K_1=1,1$ – коефіцієнт запасу часу, що враховує втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій;
- Сумарні втрати продукту при виробництві $E_{св} = 0,20$;
- Вологість продукту 8 % (вміст сухих речовин 92 %);
- Коефіцієнт заповнення ферментера $K_{ф}=0,6$;
- Коефіцієнт заповнення посівного апарата $K_{пп} = 0,6$;
- Коефіцієнт заповнення колб $K_{кол} = 0,2$;
- Коефіцієнт заповнення збірника $K_{зб} = 0,8$

6.1. Розрахунок кількості виробничих циклів.

Річна потреба склероглюкану ($G_{нтд}$) становить 34 тон/рік.

Продуктивність штаму продуцента становить 0,026 кг/л. Розраховуємо яку кількість продукту яку можна отримати за добу, враховуючи кількість трудоднів ($V_{тдн} = 150$).

- Кількість продукту на добу, кг/добу:

$$G_{нтд} = G_{нт}/T_{рд} = 34000/150 = 226,7 \text{ кг/добу}$$

- Кількість готового препарату за цикл, кг/цикл

$$G_{цк} = G_{нтд} * T_{цф}/24 = 226,7 * 58 / 24 = 548$$

- Кількість циклів на рік:

$$N_{цк} = G_{нт}/G_{цк} = 34000 / 548 = 62$$

- Об`єм культуральної рідини, у якій можна отримати дану кількість полісахариду за цикл з урахуванням втрат ($E_{св} = 20$ %) буде становити:

$$V_{кр} = K_1 * G_{цк} * C_{Ргп}/P_{кр} * (1 - E_{св}) =$$

$$(1.1 * 548 * 0,92)/(1 - 0.2) * 0,026 = 26662 \text{ л.}$$

Переводимо - 26,7 м³/цикл.

- Вихід продукту у кг з 1 м³ культуральної рідини:

$$R_{кр} = G_{цк}/V_{кр} = 548/26,7 = 20,6$$

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

6.2.1. Приготування та стерилізація поживного середовищ для виробничого біосинтезу

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

$$V_{\phi 1} = V_{кр}/(1 - E_{\phi}) = 26,7/(1 - 0,1) = 29,7 \text{ м}^3.$$

- Кількість поживного середовища в ферментері складе:

$$V_{пс1} = V_{\phi}/(1 + X_{\phi}) = 29,7/(1 + 0,1) = 27 \text{ м}^3.$$

- Необхідна кількість посівного матеріалу:

$$V_{пм\phi 1} = V_{\phi} - V_{пс} = 29,7 - 27 = 2,7 \text{ м}^3$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_3 = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{г\phi} = V_{\phi}/K_3 = 29,7/0,6 = 49,5 \text{ м}^3$.

Обираємо стандартний ферментер геометричним об'ємом **50 м³**.

6.2.2. Розрахунок кількості стадій вирощування посівного матеріалу

1) Для одержання 2,7 м³ (2700 л) інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

- Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\phi 2} = V_{пм\phi 1}/(1 - E_{\phi}) = 2700/(1 - 0,1) = 3000 \text{ л},$$

- Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс2} = V_{\phi 2}/(1 + X_{\phi}) = 3000/(1 + 0,1) = 2727,3 \text{ л}.$$

- Необхідна кількість посівного матеріалу:

$$V_{пм\phi 2} = V_{\phi 2} - V_{пс2} = 3000 - 2727,3 = 272,7 \text{ л}.$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_3 = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{гф2} = V_{ф2}/K_{з2} = 3000/0,6 = 5000$ л.

Обираємо стандартний ферментер геометричним об'ємом **5 м³**.

Утоянюємо коефіцієнт заповнення:

$$3000/5000 = 0,6$$

2) Для одержання 272,7 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу чер ез колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

- Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{ф3} = V_{пмф2}/(1 - E_{ф}) = 272,7/(1 - 0,1) = 303 \text{ л,}$$

- Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс3} = V_{ф3}/(1 + X_{ф}) = 303/(1 + 0,1) = 275,5 \text{ л.}$$

- Необхідна кількість посівного матеріалу:

$$V_{пмф3} = V_{ф3} - V_{пс3} = 303 - 275,5 = 27,5 \text{ л.}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_3 = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{гф3} = V_{ф3}/K_{з3} = 303/0,6 = 505$ л.

Обираємо стандартний ферментер геометричним об'ємом **0,63 м³**

Утоянюємо коефіцієнт заповнення:

$$303/630 = 0,5$$

3) Для одержання 27,5 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

- Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{ф4} = V_{пмф3}/(1 - E_{ф}) = 27,5/(1 - 0,1) = 30,6 \text{ л,}$$

- Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс4} = V_{ф4}/(1 + X_{ф}) = 30,6/(1 + 0,1) = 27,8 \text{ л.}$$

- Необхідна кількість посівного матеріалу:

$$V_{\text{пмф4}} = V_{\text{ф4}} - V_{\text{пс4}} = 30,6 - 27,8 = 2,8 \text{ л.}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_3 = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{\text{гф4}} = V_{\text{ф4}}/K_{34} = 30,6/0,6 = 51 \text{ л.}$

Обираємо стандартний ферментер геометричним об'ємом **60 л.**

Утоянюємо коефіцієнт заповнення:

$$30,6/60 = 0,51$$

4) Кількість інокуляту для засіву малого посівного апарата $V_{\text{пмф4}} = 2,8 \text{ л}$ можна одержати культивуванням грибів у колбах на качалці.

Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{3к} = 0,2$.

- Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить:

$$V_{\text{кол}} = V_{\text{пмф4}} / (1 - E_{\text{кол}}) = 2800 / (1 - 0,01) = 2830 \text{ мл.}$$

- Кількість поживного середовища в посівному апараті становить:
- $V_{\text{пс5}} = V_{\text{кол}} / (1 + X_{\text{кол}}) = 2830 / (1 + 0,1) = 2570 \text{ мл}$
- Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання колб, мл:

$$V_{\text{пмф5}} = V_{\text{кол}} - V_{\text{пс5}} = 2830 - 2570 = 260 \text{ мл.}$$

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пмф4}} / (V_{\text{колб}} \times K_{3к}) = 2830 / (750 \times 0,2) = 19$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно **19** качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу полісахариду склероглюкану у ферментері об'ємом 50 м^3 з коефіцієнтом заповнення $0,6$ буде проходити в чотири стадії.

6.2.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері геометричним об'ємом 50 м³

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}}$, при заповненні ферментера на 27 м³.

Відповідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу, загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища ($V_{\text{псф}}$) складуть :

$$G_{\text{ф}} = V_{\text{псф}} \times C_{\Sigma\text{ф}} = 27 \times 37,02 = 999,5 \text{ кг, в тому числі, кг :}$$

$$\text{Сахароза – } G_1 = G_{\text{ф}} \times C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 999,5 \times 30 / 37,02 = 810;$$

$$\text{Дріжджовий екстракт – } G_2 = G_{\text{ф}} \times C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 999,5 \times 1 / 37,02 = 27 ;$$

$$\text{Лимонна кислота - } G_3 = G_{\text{ф}} \times C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 999,5 \times 0,7 / 37,02 = 18,9;$$

$$\text{NaNO}_3 \text{ – } G_4 = G_{\text{ф}} \times C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 999,5 \times 2,25 / 37,02 = 60,8;$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} \text{ – } G_5 = G_{\text{ф}} \times C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 999,5 \times 2 / 37,02 = 54;$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ – } G_6 = G_{\text{ф}} \times C_6 / C_{\Sigma\text{ф}} = 999,5 \times 0,5 / 37,02 = 13,5;$$

$$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ – } G_7 = G_{\text{ф}} \times C_7 / C_{\Sigma\text{ф}} = 999,5 \times 0,07 / 37,02 = 1,9;$$

$$\text{KCl} \text{ – } G_8 = G_{\text{ф}} \times C_8 / C_{\Sigma\text{ф}} = 999,5 \times 0,5 / 37,02 = 13,5.$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого ферментера з 27 м³ поживного середовища

Оскільки об'єм поживного середовища у ферментері складає $V_{\text{псф}} = 27 \text{ м}^3$.

Враховуючи, що під час виробничого біосинтезу в ферментер порціями вноситься 50% розчин сахарози (з розрахунку 120 г/л), кількість якої становитиме, кг:

$$27 \times 120 = 3240, \text{ для розбавлення якої необхідно така ж кількість води.}$$

Тож, об'єм підживлювального розчину становитиме:

$$V_{\text{пж}} = 3\,240 + 3\,240 = 6\,480 \text{ л.}$$

Тоді об'єм поживного середовища для початкового заповнення ферментеру становитиме:

$$27\,000 - 6480 = 20\,520 \text{ л.}$$

Даний об'єм поживного середовища доцільно стерилізувати в УБС потужністю 20 м^3 .

При цьому частка конденсату, що утворюватиметься – $K_{\text{кон}}$ становитиме 0,2 кількість конденсату становитиме:

$$V_{\text{фк}} = 20\,520 \times 0,2 = 4\,100 \text{ л.}$$

При стерилізації підживлювального розчину в реакторі-змішувачі частка конденсату становитиме 0,1:

$$V_{\text{пжк}} = 6480 \times 0,1 = 648 \text{ л}$$

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде, л :

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}} - V_{\text{пж}} - V_{\text{пжк}} = 27\,000 - 999,5 - 4\,100 - 6\,480 - 648 = 14\,770$$

Формуємо композицій :

Таблиця 6.1

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

Компоненти середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, кг/ м ³	Вміст компонента в 27 м ³ середовища ,кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Сахароза	30	810	А	19 870
Дріжджовий екстракт	1	27		
Лимонна кислота	0,7	18,9		
NaNO ₃	2,25	60,8		
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	2	54		

MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5	13,5	А	19 870
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.07	1,9		
KCL	0,5	13,5		
Вода		14 770		
Конденсат, 10 %		4 100		
Сахароза	120	3 240	Підживлювальний розчин	7 130
Вода		3 240		
Конденсат		648		
Сума Σ	37,02	27 000	-	27 000

6.2.4. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для посівного апарата у кількості 2727,3 л (2,73 м³)

Відповідно з прийнятим складом поживного середовища для посівного матеріалу, загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища ($V_{\text{пс2}}$) складуть :

$G_{\text{ін1}} = V_{\text{пс2}} \times C_{\Sigma\text{ф}} = 2,73 \times 37,02 = 101 \text{ кг}$, в тому числі, кг :

Сахароза – $G_1 = G_{\text{ф}} \times C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 101 \times 30 / 37,02 = 81,9$;

Дріжджовий екстракт – $G_2 = G_{\text{ф}} \times C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 101 \times 1 / 37,02 = 2,73$;

Лимонна кислота - $G_3 = G_{\text{ф}} \times C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 101 \times 0,7 / 37,02 = 1,9$;

NaNO₃ – $G_4 = G_{\text{ф}} \times C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 101 \times 2,25 / 37,02 = 6,2$;

K₂HPO₄*3H₂O – $G_5 = G_{\text{ф}} \times C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 101 \times 2 / 37,02 = 5,5$;

MgSO₄*7H₂O – $G_6 = G_{\text{ф}} \times C_6 / C_{\Sigma\text{ф}} = 101 \times 0,5 / 37,02 = 1,4$;

FeSO₄*7H₂O – $G_7 = G_{\text{ф}} \times C_7 / C_{\Sigma\text{ф}} = 101 \times 0,07 / 37,02 = 0,19$;

KCl – $G_8 = G_{\text{ф}} \times C_8 / C_{\Sigma\text{ф}} = 101 \times 0,5 / 37,02 = 1,4$.

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для 3 м³ посівного матеріалу

Оскільки об'єм поживного середовища у посівному апараті складає $V_{\text{пс2}} = 2,73 \text{ м}^3$, кількість конденсату становитиме $V_{\text{к.ін1}} = 2,73 \times 0,1 = 0,273 \text{ м}^3 = 273 \text{ л}$.

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде :

$$V_{в.ін1} = V_{пс2} - G_{ін1} - V_{к.ін1} = 2730 - 101 - 273 = 2\,356 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків приймаємо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$.

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л.

Сахароза –	$V_{1в.ін1} = V_{в.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2\,356 \times 30/37,02 = 1909,2;$
Дріжджовий екстракт –	$V_{2в.ін1} = V_{в.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2\,356 \times 1/37,02 = 63,6;$
Лимонна кислота -	$V_{3в.ін1} = V_{в.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2\,356 \times 0,7/37,02 = 44,5;$
NaNO ₃ –	$V_{4в.ін1} = V_{в.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2\,356 \times 2,25/37,02 = 143,2;$
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O –	$V_{5в.ін1} = V_{в.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2\,356 \times 2/37,02 = 127,3;$
MgSO ₄ *7H ₂ O –	$V_{6в.ін1} = V_{в.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2\,356 \times 0,5/37,02 = 31,8;$
FeSO ₄ *7H ₂ O –	$V_{7в.ін1} = V_{в.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2\,356 \times 0,07/37,02 = 4,5;$
KCl –	$V_{8в.ін1} = V_{в.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2\,356 \times 0,5/37,02 = 31,8.$
Всього: 2356 л	

Розраховуємо кількість конденсату покомпонентно:

Сахароза –	$V_{1к.ін1} = V_{к.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 273 \times 30/37,02 = 221,2;$
Дріжджовий екстракт –	$V_{2к.ін1} = V_{к.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 273 \times 1/37,02 = 7,4;$
Лимонна кислота -	$V_{3к.ін1} = V_{к.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 273 \times 0,7/37,02 = 5,2;$
NaNO ₃ –	$V_{4к.ін1} = V_{к.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 273 \times 2,25/37,02 = 16,9;$
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O –	$V_{5к.ін1} = V_{к.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 273 \times 2/37,02 = 14,7;$
MgSO ₄ *7H ₂ O –	$V_{6к.ін1} = V_{к.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 273 \times 0,5/37,02 = 3,7;$
FeSO ₄ *7H ₂ O –	$V_{7к.ін1} = V_{к.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 273 \times 0,07/37,02 = 0,5;$
KCl –	$V_{8к.ін1} = V_{к.ін1} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 273 \times 0,5/37,02 = 3,7.$
Всього: 273 л	

Формуємо композицій :

Склад композицій для стерилізації поживного середовища яке використовується для приготування 3 м³ посівного матеріалу.

Компоненти середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, кг/ м³	Вміст компонента в 2,73 м³ середовища ,кг (л)	Композиція	Об'єм композиції , л
1	2	3	4	5
Сахароза	30	81,9	А	2 286
Дріжджовий екстракт	1	2,73		
Вода		1 973		
Конденсат, 10 %		228,6		
Лимонна кислота	0,7	2,06	Б	443,5
NaNO ₃	2,25	6,63		
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	2	5,89		
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5	1,47		
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.07	0,206		
KCL	0,5	1,47		
Вода		381,1		
Конденсат, 10 %		44,7		
Сума Σ	37,02	2 730	-	2 730

**Примітка* Солі фосфати та сульфати стерилізуються разом при пониженому рН 4.5 а при введенні в біосинтез рН стабілізують до оптимального.

6.2.5. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для посівного апарата 630 л

Відповідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу, загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища ($V_{\text{пс3}} = 275,5$ л) складуть :

$$G_{\text{ін2}} = V_{\text{пс3}} \times C_{\Sigma\phi} = 275,5 \times 37,02 = 10\,200 \text{ г}, \text{ в тому числі, г :}$$

$$\text{Сахароза} - G_1 = G_{\phi} \times C_1 / C_{\Sigma\phi} = 10\,200 \times 30 / 37,02 = 8\,265;$$

$$\text{Дріжджовий екстракт} - G_2 = G_{\phi} \times C_2 / C_{\Sigma\phi} = 10\,200 \times 1 / 37,02 = 275,5;$$

$$\text{Лимонна кислота} - G_3 = G_{\phi} \times C_3 / C_{\Sigma\phi} = 10\,200 \times 0,7 / 37,02 = 192,9;$$

$$\text{NaNO}_3 - G_4 = G_{\phi} \times C_4 / C_{\Sigma\phi} = 10\,200 \times 2,25 / 37,02 = 620;$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - G_5 = G_{\phi} \times C_5 / C_{\Sigma\phi} = 10\,200 \times 2 / 37,02 = 551;$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_6 = G_{\phi} \times C_6 / C_{\Sigma\phi} = 10\,200 \times 0,5 / 37,02 = 138;$$

$$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_7 = G_{\phi} \times C_7 / C_{\Sigma\phi} = 10\,200 \times 0,07 / 37,02 = 19,3;$$

$$\text{KCl} - G_8 = G_{\phi} \times C_8 / C_{\Sigma\phi} = 10\,200 \times 0,5 / 37,02 = 138.$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища в посівному апараті 630 л

Оскільки об'єм поживного середовища у посівному апараті складає $V_{\text{пс3}} = 275,5$ л, кількість конденсату становитиме $V_{\text{к.ін2}} = 275,5 \times 0,1 = 27,5$ л

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде :

$$V_{\text{в.ін2}} = V_{\text{пс3}} - G_{\text{ін2}} - V_{\text{к.ін2}} = 275,5 - 10,2 - 27,5 = 237,8 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків приймаємо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$.

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л.

$$\text{Сахароза} - V_{1\text{в.ін2}} = V_{\text{в.ін2}} \times C_1 / C_{\Sigma\phi} = 237,8 \times 30 / 37,02 = 192,7;$$

$$\text{Дріжджовий екстракт} - V_{2\text{в.ін2}} = V_{\text{в.ін2}} \times C_2 / C_{\Sigma\phi} = 237,8 \times 1 / 37,02 = 6,4;$$

$$\text{Лимонна кислота} - V_{3\text{в.ін2}} = V_{\text{в.ін2}} \times C_3 / C_{\Sigma\phi} = 237,8 \times 0,7 / 37,02 = 4,5;$$

$$\text{NaNO}_3 - V_{4\text{в.ін2}} = V_{\text{в.ін2}} \times C_4 / C_{\Sigma\phi} = 237,8 \times 2,25 / 37,02 = 14,5;$$

$$\begin{aligned}
 \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - & V_{5\text{в.ін2}} = V_{\text{в.ін2}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 237,8 \times 2/37,02 = 12,8; \\
 \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - & V_{6\text{в.ін2}} = V_{\text{в.ін2}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 237,8 \times 0,5/37,02 = 3,2; \\
 \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - & V_{7\text{в.ін2}} = V_{\text{в.ін2}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 237,8 \times 0,07/37,02 = 0,5; \\
 \text{KCl} - & V_{8\text{в.ін2}} = V_{\text{в.ін2}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 237,8 \times 0,5/37,02 = 3,2. \\
 \text{Всього: } & 237,8 \text{ л}
 \end{aligned}$$

Розраховуємо кількість конденсату покомпонентно:

$$\begin{aligned}
 \text{Сахароза} - & V_{1\text{к.ін2}} = V_{\text{к.ін2}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 27,5 \times 30/37,02 = 22,3; \\
 \text{Дріжджовий екстракт} - & V_{2\text{к.ін2}} = V_{\text{к.ін2}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 27,5 \times 1/37,02 = 0,74; \\
 \text{Лимонна кислота} - & V_{3\text{к.ін2}} = V_{\text{к.ін2}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 27,5 \times 0,7/37,02 = 0,5; \\
 \text{NaNO}_3 - & V_{4\text{к.ін2}} = V_{\text{к.ін2}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 27,5 \times 2,25/37,02 = 2; \\
 \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - & V_{5\text{к.ін2}} = V_{\text{к.ін2}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 27,5 \times 2/37,02 = 1,48; \\
 \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - & V_{6\text{к.ін2}} = V_{\text{к.ін2}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 27,5 \times 0,5/37,02 = 0,37; \\
 \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - & V_{7\text{к.ін2}} = V_{\text{к.ін1}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 27,5 \times 0,07/37,02 = 0,05; \\
 \text{KCl} - & V_{8\text{к.ін2}} = V_{\text{к.ін2}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 27,5 \times 0,5/37,02 = 0,37. \\
 \text{Всього: } & 27,5 \text{ л}
 \end{aligned}$$

Формуємо композицій:

Таблиця 6.3

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для підготовки 303 л посівного матеріалу.

Компоненти середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, кг/м ³	Вміст компонента в 275,5 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
1	2	3	4	5
Сахароза	30	8 265	А	230 680
Дріжджовий екстракт	1	275,5		
Вода		199 100		
Конденсат, 10 %		23 040		

Лимонна кислота	0,7	192,9	Б	44 820
NaNO ₃	2,25	620		
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	2	551		
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5	138		
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.07	19,3		
KCl	0,5	138		
Вода		38 700		
Конденсат, 10 %		4 770		
Сума Σ	37,02	275 500		

**Примітка* Солі фосфати та сульфати стерилізуються разом при пониженому рН 4.5 а при введенні в біосинтез рН стабілізують до оптимального

6.2.6. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для посівного апарата 60 л.

Відповідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу, загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища ($V_{\text{пс4}} = 27,8$ л) складуть:

$$G_{\text{ін3}} = V_{\text{пс4}} \times C_{\Sigma\text{ф}} = 27,8 \times 37,02 = 1\,030 \text{ г}, \text{ в тому числі, г :}$$

$$\text{Сахароза} - G_1 = G_{\text{ф}} \times C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 1\,030 \times 30 / 37,02 = 834;$$

$$\text{Дріжджовий екстракт} - G_2 = G_{\text{ф}} \times C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 1\,030 \times 1 / 37,02 = 27,8;$$

$$\text{Лимонна кислота} - G_3 = G_{\text{ф}} \times C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 1\,030 \times 0,7 / 37,02 = 19,46;$$

$$\text{NaNO}_3 - G_4 = G_{\text{ф}} \times C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 1\,030 \times 2,25 / 37,02 = 62,55;$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - G_5 = G_{\text{ф}} \times C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 1\,030 \times 2 / 37,02 = 55,6;$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_6 = G_{\text{ф}} \times C_6 / C_{\Sigma\text{ф}} = 1\,030 \times 0,5 / 37,02 = 13,9;$$

$$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_7 = G_{\text{ф}} \times C_7 / C_{\Sigma\text{ф}} = 1\,030 \times 0,07 / 37,02 = 1,9;$$

$$\text{KCl} - G_8 = G_{\text{ф}} \times C_8 / C_{\Sigma\text{ф}} = 1\,030 \times 0,5 / 37,02 = 13,9.$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища в посівному апараті 60 л

Оскільки об'єм поживного середовища у посівному апараті складає $V_{\text{пс4}} = 27,8$ л, кількість конденсату становитиме $V_{\text{к.ін3}} = 27,8 \times 0,1 = 2,8$ л

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде :

$$V_{\text{в.ін3}} = V_{\text{пс4}} - G_{\text{ін3}} - V_{\text{к.ін3}} = 27,8 - 1,03 - 2,8 = 24 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків приймаємо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$.

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л.

Сахароза –	$V_{1\text{в.ін3}} = V_{\text{в.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 24 \times 30/37,02 = 19,45$
Дріжджовий екстракт –	$V_{2\text{в.ін3}} = V_{\text{в.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 24 \times 1/37,02 = 0,64;$
Лимонна кислота -	$V_{3\text{в.ін3}} = V_{\text{в.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 24 \times 0,7/37,02 = 0,45;$
NaNO_3 –	$V_{4\text{в.ін3}} = V_{\text{в.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 24 \times 2,25/37,02 = 1,45;$
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ –	$V_{5\text{в.ін3}} = V_{\text{в.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 24 \times 2/37,02 = 1,29;$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –	$V_{6\text{в.ін3}} = V_{\text{в.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 24 \times 0,5/37,02 = 0,32;$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –	$V_{7\text{в.ін3}} = V_{\text{в.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 24 \times 0,07/37,02 = 0,05;$
KCl –	$V_{8\text{в.ін3}} = V_{\text{в.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 24 \times 0,5/37,02 = 0,32.$

Всього: 24 л

Розраховуємо кількість конденсату покомпонентно:

Сахароза –	$V_{1\text{к.ін3}} = V_{\text{к.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2,8 \times 30/37,02 = 2,26;$
Дріжджовий екстракт –	$V_{2\text{к.ін3}} = V_{\text{к.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2,8 \times 1/37,02 = 0,07;$
Лимонна кислота -	$V_{3\text{к.ін3}} = V_{\text{к.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2,8 \times 0,7/37,02 = 0,05;$
NaNO_3 –	$V_{4\text{к.ін3}} = V_{\text{к.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2,8 \times 2,25/37,02 = 0,17;$
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ –	$V_{5\text{к.ін3}} = V_{\text{к.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2,8 \times 2/37,02 = 0,15;$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –	$V_{6\text{к.ін3}} = V_{\text{к.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2,8 \times 0,5/37,02 = 0,037;$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –	$V_{7\text{к.ін3}} = V_{\text{к.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2,8 \times 0,07/37,02 = 0,005;$
KCl –	$V_{8\text{к.ін3}} = V_{\text{к.ін3}} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2,8 \times 0,5/37,02 = 0,037.$

Всього: 2,8 л

Формуємо композицій :

Таблиця 6.4

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для підготовки 30,8 л посівного матеріалу.

Компоненти середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/ л	Вміст компонента в 27,8 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Сахароза	30	834	А	23 280
Дріжджовий екстракт	1	27,8		
Вода		20 090		
Конденсат, 10 %		2 330		
Лимонна кислота	0,7	19,46	Б	4 520
NaNO ₃	2,25	62,55		
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	2	55,6		
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5	13,9		
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.07	1,9		
KCL	0,5	13,9		
Вода		3 880		
Конденсат, 10 %		449		
Сума Σ	37,02	27 800	-	27 800

**Примітка* Солі фосфати та сульфати стерилізуються разом при пониженому рН 4.5 а при введенні в біосинтез рН стабілізують до оптимального

6.2.7. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для качалочних колб в яких одержують 2,8 л посівного матеріалу.

Відповідно з прийнятим складом поживного середовища для приготування посівного матеріалу, загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища ($V_{\text{пс5}} = 2,8$ л) складуть:

$$G_{\text{кол}} = V_{\text{пс5}} \times C_{\Sigma\text{ф}} = 2,8 \times 37,02 = 103,7 \text{ г, в тому числі, г :}$$

$$\text{Сахароза} - G_1 = G_{\text{ф}} \times C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 103,7 \times 30 / 37,02 = 84;$$

$$\text{Дріжджовий екстракт} - G_2 = G_{\text{ф}} \times C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 103,7 \times 1 / 37,02 = 2,8;$$

$$\text{Лимонна кислота} - G_3 = G_{\text{ф}} \times C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 103,7 \times 0,7 / 37,02 = 1,96;$$

$$\text{NaNO}_3 - G_4 = G_{\text{ф}} \times C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 103,7 \times 2,25 / 37,02 = 6,3;$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - G_5 = G_{\text{ф}} \times C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 103,7 \times 2 / 37,02 = 5,6;$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_6 = G_{\text{ф}} \times C_6 / C_{\Sigma\text{ф}} = 103,7 \times 0,5 / 37,02 = 1,4;$$

$$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_7 = G_{\text{ф}} \times C_7 / C_{\Sigma\text{ф}} = 103,7 \times 0,07 / 37,02 = 0,2;$$

$$\text{KCl} - G_8 = G_{\text{ф}} \times C_8 / C_{\Sigma\text{ф}} = 103,7 \times 0,5 / 37,02 = 1,4.$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища в качалочних колбах

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

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде :

$$V_{\text{в.кол}} = V_{\text{пс5}} - G_{\text{кол}} = 2,8 - 0,1 = 2,7 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків приймаємо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто 1 л = 1 кг.

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л.

$$\text{Сахароза} - V_{1\text{в.кол}} = V_{\text{в.кол}} \times C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 2,7 \times 30 / 37,02 = 2,2$$

$$\text{Дріжджовий екстракт} - V_{2\text{в.кол}} = V_{\text{в.кол}} \times C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 2,7 \times 1 / 37,02 = 0,07;$$

Лимонна кислота - $V_{3в.кол} = V_{в.кол} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2,7 \times 0,7/37,02 = 0,051;$
 $NaNO_3$ – $V_{4в.кол} = V_{в.кол} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2,7 \times 2,25/37,02 = 0,16;$
 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – $V_{5в.кол} = V_{в.кол} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2,7 \times 2/37,02 = 0,145;$
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – $V_{6в.кол} = V_{в.кол} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2,7 \times 0,5/37,02 = 0,036;$
 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – $V_{7в.кол} = V_{в.кол} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2,7 \times 0,07/37,02 = 0,005;$
 KCl – $V_{8в.кол} = V_{в.кол} \times C_1/C_{\Sigma\phi} = 2,7 \times 0,5/37,02 = 0,036.$

Всього: 2,7 л

Формуємо композиції:

Таблиця 6.5

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для підготовки 3 л посівного матеріалу.

Компоненти середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 2,8 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
1	2	3	4	5
Сахароза	30	84	А	2350
Дріжджовий екстракт	1	2,8		
Вода		2 270		
Лимонна кислота	0,7	1,96	Б	370
$NaNO_3$	2,25	6,3		
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	2	5,6		
Вода		356		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	1,4		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.07	0,2	В	80
KCL	0,5	1,4		
Вода		77		
Сума Σ	37,02	2 800	-	2 800

Компоненти готуються в колбах і стерилізуються в автоклаві.

Матеріальний баланс на один цикл виробництва.

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, г, мл	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, г, мл
1	2	3	4	5
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл, г)			
1.1.	Сахароза	84	Нестерильне ПС	2800
1.2.	Дріжджовий екстракт	2,8		
1.3.	Лимонна кислота	1,96		
1.4.	NaNO ₃	6,3		
1.5.	K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	5,6		
1.6.	MgSO ₄ *7H ₂ O	1,4		
1.7.	FeSO ₄ *7H ₂ O	0,2		
1.8.	KCL	1,4		
1.9.	Вода	2700		
1.7	Всього:	2 800	Всього:	2 800
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ (мл)			
2.1.	Нестерильне ПС	2800	Стерильне ПС	2800
2.2	Всього:	2800	Всього:	2800
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл)			

Продовження табл. 6.6

3.1.	Стерильне ПС	2800	Посівний матеріал	2800
3.2.	Посівний ма- теріал	30		
3.3.	Втрати (частка)	0,01		30
3.4.	Всього:	2830	Всього:	2830
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА на 60 л (г, мл)			
4.1.	Сахароза	834	Нестерильне ПС	25 000
4.2.	Дріжджовий екст- ракт	27,8		
4.3.	Лимонна кислота	19,46		
4.4.	NaNO ₃	62,55		
4.5.	K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	55,6		
4.6.	MgSO ₄ *7H ₂ O	13,9		
4.7.	FeSO ₄ *7H ₂ O	1,9		
4.8.	KCL	13,9		
4.9.	Вода	23 970		
4.10	Всього:	25 000	Всього:	25 000
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА (мл)			
5.1.	Нестерильне ПС	25 000	Стерильне ПС	27 800

5.2.	Конденсат	2 779	(втрат немає)	0,0
5.3	Всього:	27 800	Всього:	27 800
6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ НА 60 Л (мл)			
6.1.	Стерильне ПС	27 800	Посівний матеріал	27 500
6.3.	Посівний ма- теріал з колб на ка- чалках	2 800		
6.4.	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	3 100
6.5	Всього:	30 600	Всього:	30 600
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ НА 630 л (г, мл)			
7.1.	Сахароза	8 265	Нестерильне ПС	247 690
7.2.	Дріжджовий екст- ракт	275,5		
7.3.	Лимонна кислота	192,9		
7.4.	NaNO ₃	620		
7.5.	K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	551		
7.6	MgSO ₄ *7H ₂ O	138		
7.7	FeSO ₄ *7H ₂ O	19,3		
7.8	KCL	138		
7.9	Вода	237 800		
7.10	Всього:	247 690	Всього:	247 690

8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ НА 630 Л (мл)			
8.1.	Нестерильне ПС	247 690	Стерильне ПС	275 500
8.2.	Конденсат	27 810	(втрат немає)	0,0
8.3.	Всього:	275 500	Всього:	275 500
9.	ОДЕРЖАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 630 л (л)			
9.1.	Стерильне ПС	275 500	Посівний матеріал	272 700
9.2.	Посівний ма- теріал інокулятора	27 500		
9.3.	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	30 300
9.4.	Всього:	303 000	Всього:	303 000

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, л	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, л
1	2	3	4	5
10.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 5 м ³ (кг, л)			
10.1.	Сахароза	81,9	Нестерильне ПС	2456,7
10.2.	Дріжджовий екстракт	2,73		
10.3.	Лимонна кислота	2,06		
10.4.	NaNO ₃	6,63		
10.5.	K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	5,89		
10.6.	MgSO ₄ *7H ₂ O	1,47		

Продовження табл. 6.6

10.7	FeSO ₄ *7H ₂ O	0,206		
10.8	KCL	1,47		
10.9.	Вода	2 354,1		
10.10	Всього:	2456,7	Всього:	2456,7
12.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 5 м ³ (кг, л)			
12.1.	Нестерильне ПС	2 456,7	Стерильне ПС	2 730
12.2	Конденсат	273,3	(втрат немає)	0,0
	Всього:	2 730	Всього:	2 730
13.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 5 м ³ (л)			
13.1.	Стерильне ПС	2 730	Посівний матеріал	2 700
13.2.	Посівний ма-теріал	272,7		
13.3	Втрати(частика)	0,1	Втрати (кількість)	300
	Всього:	3000	Всього:	3000
14.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ В ФЕРМЕНТЕРІ НА 50 м ³ (кг, л)			
14.1.	Сахароза	810	Нестерильне ПС	15 770
14.2.	Дріжджовий екстракт	27	Нестерильний підживлювальний розчин	6 480
14.3.	Лимонна кислота	18,9		
14.4.	NaNO ₃	60,8		

14.5.	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	54		
14.6	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	13,5		
14.7	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1,9		
14.8	KCL	13,5		
14.9	Підживлювальний розчин	6 480		
14.10	Вода	14 770		
14.11	Всього:	22 250	Всього:	22 250
15.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ В ФЕРМЕНТЕРІ НА 50 м ³ (кг, л)			
15.1.	Нестерильне ПС	15 770	Стерильне ПС	27 000
15.2	Нестерильний підживлювальний розчин	6480		
15.3	Конденсат	4 748	(втрат немає)	0,0
15.4	Всього:	27 000	Всього:	27 000
16.	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ В ФЕРМЕНТЕРІ 50 м ³ (л)			
16.1.	Стерильне ПС	27 000	Культуральна рідина, що подається на очищення	26 700
16.2.	Посівний ма-теріал	2 700		

16.3	Втрати(частика)	0,1	Втрати (кількість)	3 000
16.4	Всього:	29 700	Всього:	29 700

Оскільки, кількість культуральної рідини згідно матеріального балансу (26 700 л) співпадає із кількістю культуральної рідини, розрахованої відповідно до п. 1.4 (26,7 м³) розрахунку партій продукту, вважаємо, що матеріальний баланс зроблено вірно.

6.3 Розрахунок технологічного обладнання.

6.3.1 Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання.

Уточнюючий розрахунок кількості виробничих ферментерів кількість поживного середовища ПС та ПМ становить 29,7 м³)

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

$$V_{фг} = V_{ф}/K_3 = 29,7/0,6 = 49,5 \text{ м}^3$$

4.1.1.2. Обираємо ферментер найближчого об'єму 50 м³.

4.1.1.3. Кількість виробничих ферментерів при заданому K_3 :

$$N_{фр} = V_{фг} / V_{фг} = 49,5/50 = 0,99 - \text{приймаємо } 1.$$

4.1.1.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зф} = V_{ф} / (V_{фг} \times N_{фг}) = 29,7 / (50 \times 1) = 0,59$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5 – 0,65) приймаємо до установки кількість ферментерів $N_{фг} + 1$ запасний

6.3.2 Уточнюючий розрахунок кількості посівних апаратів

і інокуляторів

1) Розрахунок кількості інокуляторів (кількість поживного середовища ПС та ПМ становить 5 000 л)

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

$$V_{\text{ін1Г}} = V_{\text{ін1}} / K_3 = 3\,000 / 0,6 = 5\,000 \text{ л} = 5 \text{ м}^3.$$

Обираємо промисловий ферментер з таблиці стандартних ферментерів - $V_{\text{ін1Г}} = 5 \text{ м}^3$

Кількість інокуляторів при заданому $K_{\text{ін}}$, од:

$$N_{\text{ін1р}} = V_{\text{ін1Г}} / V_{\text{ні1Г}} = 5 / 5 = 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зін}} = V_{\text{ін1}} / (V_{\text{ні1Г}} N_{\text{ін1Г}}) = 3\,000 / (5\,000 \times 1) = 0,6$$

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

2) *Розразунок кількості інокуляторів (кількість поживного середовища ПС та ПМ становить 303 л)*

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

$$V_{\text{ін2Г}} = V_{\text{ін2}} / K_3 = 303 / 0,6 = 505 \text{ л}$$

Обираємо промисловий ферментер з таблиці стандартних ферментерів - $V_{\text{ін2Г}} = 0,63 \text{ м}^3$

Кількість інокуляторів при заданому $K_{\text{ін}}$, од:

$$N_{\text{ін2р}} = V_{\text{ін2Г}} / V_{\text{ні2Г}} = 505 / 630 = 0,8 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зін}} = V_{\text{ін2}} / (V_{\text{ні2Г}} N_{\text{ін2Г}}) = 303 / (630 \times 1) = 0,5$$

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

3) *Розразунок кількості інокуляторів (кількість поживного середовища ПС та ПМ становить 30,6 л)*

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

$$V_{\text{ін3Г}} = V_{\text{ін3}} / K_3 = 30,6 / 0,6 = 43,7 \text{ л}$$

Обираємо промисловий ферментер з таблиці стандартних ферментерів -

$$V_{\text{інЗТ}} = 60 \text{ л}$$

Кількість інокуляторів при заданому $K_{\text{ін}}$, од:

$$N_{\text{інЗр}} = V_{\text{інЗГ}} / V_{\text{ніЗТ}} = 43,7 / 60 = 0,73 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зін}} = V_{\text{інЗ}} / (V_{\text{ніЗТ}} N_{\text{інЗТ}}) = 30,6 / (60 \times 1) = 0,51$$

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

4) *Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб*

Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому

$$K_{\text{кол}} = 0,2$$

$$V_{\text{колГ}} = V_{\text{кол}} / K_{\text{кол}} = 2,83 / 0,2 = 14,15 \text{ л}$$

Об'єм однієї качалочної колби

$$V_{\text{колТ}} = 0,750 \text{ л}$$

Кількість качалочних колб при заданому $K_{\text{кол}}$, од.

$$N_{\text{кол}} = V_{\text{колГ}} / V_{\text{колТ}} = 14,15 / 0,75 = 18,9 - \text{приймаємо } 19$$

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

1) *Уточнюючий розрахунок реактора для приготування композицій А та для стерилізації в УБС*

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача для УБС при заданому $K_{\text{зб}} = 0,8$:

$$V_{\text{Апа}} = V_{\text{А}} / K_{\text{зб}} = 19\,870 / 0,8 = 24\,838 \text{ л} = 24,9 \text{ м}^3,$$

обираємо реактор змішувач місткістю 25 м^3 типу СЕРН

Кількість реакторів при заданому $K_{\text{зб}}$ становить :

$$N_{\text{р}} = V_{\text{Апа}} / V_{\text{рст}} = 24,9 / 25 = 0,99 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{\text{зр}} = V_{\text{Апа}} / (V_{\text{рст}} \times N_{\text{р}}) = 19,87 / 25 = 0,79$$

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

2) Уточнюючий розрахунок реактора-змішувача для приготування підживлювального розчину

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації підживлювального розчину. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$:

$$V_{пжр} = V_{1пжр} / K_{зб} = 7130 / 0,8 = 8\,912,5 \text{ л}$$

Обираємо реактор змішувач місткістю 9 м^3 типу СЕРН

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

$$N_p = V_{пжр} / V_{рст} = 8\,912,5 / 9\,000 = 0,99 - \text{приймаємо } 1 .$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{пжр} / (V_{рст} \times N_p) = 7\,130 / 9\,000 = 0,79$$

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

3) Уточнюючий розрахунок реакторів-змішувачів для приготування композиції А і Б для ферментера з кількістю поживного середовища $2,73 \text{ м}^3$.

Композиція А

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$:

$$V_{Апа} = V_A / K_{зб} = 2\,286 / 0,8 = 2\,857,5 \text{ л}$$

Обираємо реактор змішувач типу СЕРН об'ємом 3000 л

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

$$N_p = V_{Апа} / V_{рст} = 2\,857,5 / 3\,000 = 0,95 - \text{приймаємо } 1 .$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{Апа} / (V_{рст} \times N_p) = 2\,286 / (3\,000 * 1) = 0,76$$

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

Композиція Б

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції В. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$:

$$V_{Впа} = V_B / K_{зб} = 443,5 / 0,8 = 554,4 \text{ л}$$

Обираємо реактор змішувач типу СЕРН об'ємом 550 л

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

$$N_p = V_{Впа} / V_{рст} = 554,4 / 550 = 1,007 - \text{приймаємо } 1 .$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{Впа} / (V_{рст} \times N_p) = 443,5 / (550 * 1) = 0,8$$

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

4) Уточнюючий розрахунок реакторів-змішувачів для приготування композиції А і Б для ферментера з кількістю поживного середовища 275,5 л.

Композиція А

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$:

$$V_{Апа} = V_A / K_{зб} = 230,7 / 0,8 = 288,4 \text{ л}$$

Обираємо реактор змішувач типу СЕРН об'ємом 300 л

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

$$N_p = V_{Апа} / V_{рст} = 288,4 / 300 = 0,96 - \text{приймаємо } 1 .$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{Апа} / (V_{рст} \times N_p) = 230,7 / (300 * 1) = 0,77$$

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

Композиція Б

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції В. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$:

$$V_{Впа} = V_B / K_{зб} = 44,8 / 0,8 = 56 \text{ л}$$

Обираємо реактор змішувач типу СЕРН об'ємом 60 л

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

$$N_p = V_{Впа} / V_{рст} = 56 / 60 = 0,94 - \text{приймаємо } 1 .$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{Впа} / (V_{рст} \times N_p) = 44,8 / (60 * 1) = 0,75$$

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

5) Уточнюючий розрахунок реакторів-змішувачів для приготування композиції А і В для ферментера з кількістю поживного середовища 27,8 л.

Композиція А

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$:

$$V_{Апа} = V_A / K_{зб} = 23,3 / 0,8 = 29,125 \text{ л}$$

Обираємо реактор змішувач типу СЕРН об'ємом 30 л

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

$$N_p = V_{Апа} / V_{рст} = 29,125 / 30 = 0,97 - \text{приймаємо } 1 .$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{Апа} / (V_{рст} \times N_p) = 23,3 / (30 * 1) = 0,78$$

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

Композиція В

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції В. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$:

$$V_{\text{Впа}} = V_{\text{В}} / K_{36} = 4,5 / 0,8 = 5,625 \text{ л}$$

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_{\text{Впа}} / V_{\text{рст}} = 5,625 / 6 = 0,94 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{3p} = V_{\text{Впа}} / (V_{\text{рст}} \times N_p) = 4,5 / (6 * 1) = 0,75$$

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

РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання

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

Таблиця 7.1.

Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу склероглюкану у *S. rolfsii* ATCC 201126

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
P-1	Мобільна СІР-мийка	1	СІР-мийка номінальним об'ємом 40 м ³ (2 збірника, дозатор, фільтр, насос відцентровий), сталь SUS316L. Виробник: «BIORUS» (Росія) ¹ .
ПЗ-2	Пристрій для забору повітря	1	Повітрозбірник А1И 019.000-01 Повітрозабірник, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень ² НПЦ Вектор-Кондвент
Ф-3	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр G3 Фільтруючий матеріал – скловолокно, Площа фільтруючої поверхні 0,48 м ² , Продуктивність 2800 м ³ /год (0,78 м ³ /с) Виробник: Компанія «Фармстрой», Росія ²
К-4	Компресор	1	Компресор Inversys Plus з прямим приводом. Максимальний робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «Dalgakiran» (Туреччина). ²

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання			Літ.	Арк.	Акрушів		
Розроб.	Ярош У. М.									94	147	
Перевір.	Тетеріна С. М.							Кафедра БТМ				
Реценз.												
Н. Контр.												
Затверд.	Пирог Т. П.											

Продовження таблиці 7.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
T-5	Теплообмінник-охолоджувач	1	Повітронагрівач каналний водяний SystemairVBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 °С. Виробник:«Systemair» (Швеція) ²
P-6	Ресивер	1	Ресивер Р 270.600. Об'єм 270 л, Робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «ДНТ-Прайм Група компаній, ООО» (Росія). ³
T-7	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітронагрівач каналний водяний Systemair VBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 °С. Виробник:«Systemair» (Швеція) ²
Ф-8	Головний фільтр очистки	1	Фільтр (P)–GSL N. Фільтруючий матеріал – нержавіюча стальна сітка, Швидкість фільтрування – 0,025 м/с, Е = 95 %. Виробник: «Donaldson» (США) ⁴
З-9	Збірник для хлоридної кислоти	1	Збірник об'ємом 8 л, оснащений мішалкою, сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ⁵
Д-10 Д-13 Д-17 Д-20 Д-25 Д-28 Д-43 Д-46	Дозатор	8	Ваговий дозатор автоматичний ДВП-2 Точність дозування +/- 2 г Клас точності 1 по ДСТУ 10223-97 6 Виробник: АСВІК центр (Україна)

Продовження таблиці 7.1

Д-32 Д-35 Д-40 Д-50	Дозатор	4	Ваговий дозатор ДВЛ-50Б Точність дозування +/- 20 г Клас точності 1 по ДСТУ 10223-97 ⁶ Виробник: АСВІК центр (Україна)
Н-11 Н-15 Н-36 Н-41 Н-48 Н-52 Н-58 Н-61 Н-63 Н-67 Н-71 Н-74 Н-76 Н-79 Н-81	Насос відцентровий	15	Насоси горизонтальні відцентрові Debet MB 160. Продуктивність 9-55,0 м ³ /год Матеріал поліпропілен (PP/PVDF). Можливе перекачування в'язких розчинів Debet, Україна ⁷
Н-56	Насос кулачковий	1	Роторний (кулачковий) насос РОМАС Продуктивність до 30 м ³ /год. Виготовлені з нержавіючої сталі. Робочий тиск до 15 бар. Виробник: «ТОМАС» (Голландія) ¹⁰ . Поставщик «УкрРесурс»
Р-12 Р-45	Реактор-змішувач для на- трію гідроксиду	1	Реактор-змішувач для стерилізації об'ємом 9 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь» (Україна) ⁸

Продовження таблиці 7.1

Ф-14 Ф-18 Ф-23 Ф-26 Ф-30 Ф-33 Ф-38 Ф-47 Ф-51 Ф-55	Індивідуальний фільтр	10	Фільтр повітряний <i>Ultradepth PP-SRF</i> . Фільтруючий матеріал - боросилікат, діапазон температур від -20 до 200 °С, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 %. Виробник: «Donaldson» (США). ⁹
Р-16	Реактор-змішувач для композиції А	1	Реактор-змішувач для стерилізації об'ємом 5 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь» (Україна) ⁸
Р-19	Реактор-змішувач для композиції Б	1	Реактор-змішувач для розчинення об'ємом 35 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ⁵
ІН-21	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 60 л, Діаметр – 0,34 м, висота – 0,67 м оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником сталь 316L, швидкість мішалки 400 об/хв. Виробник: «BIORUS» (Росія) ¹ .
ЗП-22	Засівний пристрій	1	Засівний пристрій для подачі посівного матеріалу вирощеного в колбах на качалках
Р-24	Реактор-змішувач для композиції А	1	Реактор-змішувач для стерилізації об'ємом 30 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь» (Україна) ⁸

P-27	Реактор-змішувач для композиції Б	1	Реактор-змішувач для розчинення об'ємом 335 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «ВіоТехно Груп»(Росія) ⁵
ІН-29	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 630 л, Діаметр – 0,74 м, висота – 1,48 м оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, швидкість мішалки 400 об/хв. сталь 316L. Виробник: «BIORUS» (Росія) ¹ .
P-31	Реактор-змішувач для композиції Б	1	Реактор-змішувач для розчинення об'ємом 350 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «ВіоТехно Груп»(Росія) ⁵
P-34	Реактор-змішувач для композиції А	1	Реактор-змішувач для стерилізації об'ємом 3,5 м ³ оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь» (Україна) ⁸
ІН-37	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 5 м ³ , Діаметр – 1,47 м, висота – 2,94 м сталь 316L оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, швидкість мішалки 400 об/хв. Виробник: «BIORUS» (Росія) ¹ .
P-39	Реактор-змішувач для поживного середовища	1	Реактор-змішувач для розчинення об'ємом 27 м ³ , сталь AISI 316, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «ВіоТехно Груп»(Росія) ⁵

УБС-53	Установка безперервної стерилізації	1	УБС потужністю 20 м ³ /год фірми «Ле-Лаваль»
Р-49	Реактор-змішувач для підживлювального розчину	1	Реактор-змішувач для стерилізації об'ємом 7 м ³ Діаметр – 1,7 м, висота – 3,4 м сталь 12Х18Н10Т, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), Виробник: «Красный октябрь» (Україна) ⁸
Фр-54	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 50 м ³ , Діаметр – 3,15 м, висота – 6,3 м сталь AISI 316L, швидкість мішалки 400 об/хв (можлива комплектація до 1000 об/хв.) оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником і перемішувальним пристроєм, Виробник: «BIORUS» (Росія) ¹ .
3-57 3-62 3-65 3-69 3-72 3-75	Збірник	6	Обладнаний мішалкою. Перемішувальний пристрій приводяться в рух за допомогою електроприводів. Також обладнаний сорочкою для нагріву та охолодження. Виготовлені з нержавіючої сталі Потужність електроприводу підбираються виходячи з щільності і в'язкості продукту. Flowtech, Україна ¹¹
3-75 3-78 3-80	Збірник	3	Обладнаний мішалкою. Перемішувальний пристрій приводяться в рух за допомогою електроприводів. Виготовлені з нержавіючої сталі Потужність електроприводу підбираються виходячи з щільності і в'язкості продукту. Flowtech, Україна ¹¹

Продовження таблиці 7.1

<p>Д-60 Д-67 Д-61 Д-74</p>	<p>Дозатор рідких компонентів</p>	<p>4</p>	<p>Продуктивність 1-300 л/хв (залежить від комплектації) Установка доз від 0,01 до 9999 л Похибка 1-0,5% Пам'ять до 50 програм Відображення щосекундного дозування Дозатор.Укр, Україна ¹²</p>
<p>С-64</p>	<p>Сепаратор</p>	<p>5</p>	<p>Повністю герметична сепарації система МВРХ 810Н використовується для видалення часток розмірами від 0,5 до 500 мкм з рідини (сепарація бактерій, продуктів РДНК, ферментів, клітинних культур і вакцин) Продуктивність – 15 м³/год Оптимізовано для систем СІР. Регульована швидкість для полегшення оптимізації продуктивності. БіоТехногруп, Росія ¹³</p>
<p>Ф-69 Ф-78</p>	<p>Друк-фільтр</p>	<p>6</p>	<p>Знімне або фіксоване днище, система вивантаження осаду, ліфтова система для верхньої частини. Перемішувальний пристій підбирають під продукт, його особливості. Для вивантаження продукту передбачений бічний патрубок. Промивання внутрішніх поверхонь відбувається за допомогою системи СІР-мийки. Продуктивність – 16 м³ FitroDryer, ¹⁴</p>

СШ-83	Вакуум-сушильна шафа	1	<p>Потужність – до 3000 л. Кількість полиць – 3- 14 шт. Загальна площа поверхні полиць 15,44 м². Максимальна температура поверхні полиць 200 ° С. Рівномірний розподіл температури. Водяний або масляний теплоносій Виконання з високоякісних матеріалів.¹⁵</p>
ДМ-84	Дробарка молоткова з тангенціальним підводом повітря	1	<p>Висока гнучкість Двигун потужністю до 250 кВт Широко відкриваються двері дають можливість простого доступу до сит; для зміни молотків їх можна знімати з петель. Сита не мають рамок і тому можуть зніматися без застосування інструментів. Тонкі сита для частинок розміром 0,3-1,5 мм. Насипна щільність 0,2 - 0,8 кг/дм³ при вологості до 15%. Bühler, Швейцарія¹⁶</p>
ФМ-86	Фасувальна машина	1	<p>Потужність: близько 6,5 кВт 380 ± 10% 50Гц Повний автоматичний оббіг. Пакувальні матеріали: 1. Сумки з покриттям (покрита плівка) 2. Крафтові мішки 3. Пластмасова композитна плівка (товщина більше 0,18 мм) 25-50 кг / мішок 10-15 пачок в хвилину Процес наповнення автоматично зупиняється, коли з'являється витік або відсутність мішка. IARACK, Китай¹⁷</p>

Закінчення таблиці 7.1

ММ-87	Маркувальна машина	1	Режим функціонування: контрольоване PLC Застосування - для мішків 30-200 м/хв. Skilt, Китай ¹⁸
ПМ-88	Пакувальна машина	1	Транспортує та упаковує готовий продукт у мішках в паперовий ящик відповідно до необхідного порядку. PLC-програмувальний контролер Високоміцний сталевий стрічковий конвеєр Потужність 5KW 100 мішків/хв. 5 коробкок / хв IAPACK, Китай ¹⁹

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

- 1 - <http://bio-rus.ru/> (ємнісне обладнання);
- 2 - <http://www.dalgakiran.com.ua> («Далгакиран компресор Україна», обладнання для підготовки повітря);
- 3 - <https://resiver.all.biz/resiver-r-270600-270-litrov-10-bar-g3418704> («ДНТ-Прайм Група компаній, ООО» ресивер);
- 4 - <http://www.emea.donaldson.com> («Donaldson» фільтри для повітря);
- 5 - <https://biotechno.ru/> (ємнісне обладнання);
- 6 - <https://asvik.kiev.ua/ua/catalog/group/product/26> (вагове обладнання);
- 7 - www.debem.com.ua («Debem», насоси);
- 8 - <https://2723-ua.all.biz/> («Красный октябрь», ємнісне обладнання під замовлення, Україна);
- 9 - <http://www.emea.donaldson.com> («Donaldson» фільтри для повітря);
- 10 - <https://prom.ua/p432294-rotornyj-kulachkovyj-nasos.html> (Роторний насос)
- 11 - <https://flowtech.com.ua/kupit-yomkost-s-meshalkoj/> (Збірник)
- 12 - <http://www.xn--80ahjlacmm.xn--j1amh/produkcija/dozator-vody-i-zhidkostejj> (Дозатор)
- 13 - <https://biotechno.ru/chem/vysokoskorostnye-separatory/promyshlennyy-separator-dlya-biotekhnologii-mbpx-810h/> (Сепаратор)
- 14 - https://tirit.org/reactor_him/nutch_filtrodryer.php (Друк-фільтр)
- 15 - <http://yos.com.ua/home/news/93-prom-oven.html> (Вакуумна сушильна шафа)
- 16 - <https://former.buhlergroup.com/europe/ru/2103.htm> (Молоткова дробарка)
- 17 - <https://uk.iapack.com/automatic-25kg-milk-powder-bulk-packing-machine.html> (Фасувальна машина)
- 18 - <https://www.directindustry.com.ru/prod/skiltpack/product-213153-2186443.html> (Маркувальна машина)
- 19 - <https://uk.iapack.com/bag-carton-case-packer-machine.html> (Пакувальна машина)

РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема виробництва склероглюкану *S. rolfsii* ATCC 201126 включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка аераційного повітря, титрувальних агентів та поживних середовищ), технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез цільового продукту), етапи виділення цільового продукту, ПМВ, утилізацію відходів.

Технологічну схему біосинтезу цільового продукту наведено у графічній частині курсового проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка мийних та дезінфікуючих засобів

ДР 1.1.1. Приготування розчину засобу «Вітол»

Кількість робочого розчину «Вітол» концентрацією 0,5 %, для генерального прибирання становить 28,1 м³. Миючий розчин готують в резервуарі об'ємом 40 м³.

В збірник 40 м³ через об'ємно-ваговий дозатор, подають 1 412 кг засобу, та 26 688 м³ питної води.

Збірник оснащений сорочкою, для забезпечення підігрівання робочого розчину до оптимальної температури миття – 70-80 °С. Розчин перемішують протягом 10 хвилин, після чого отримуємо готовий підігрітий розчин для миття обладнання, що використовується на стадії ДР 1.3.1.

За допомогою СП-мойки (Р-1) миючий розчин розподіляється до обладнання.

ДР 1.1.2. Приготування дезінфікувального розчину «Хлорантоїн»

Кількість робочого розчину «Хлорантоїн» концентрацією 0,2 % для генерального прибирання становить 370 л. Розчин готують в резервуарі об'ємом 500 л.

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми.	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Ярош У. М.					103	147
Перевір.		Тетеріна С. М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т. П.				Кафедра БТМ		

В збірник 500 л через об'ємно-ваговий дозатор подається 7,4 кг засобу, та 492,6 л питної води.

Збірник оснащений сорочкою, що забезпечує підігрівання робочого розчину до оптимальної температури – 70-80 °С. Розчин перемішують протягом 10 хвилин. Готовий підігрітий розчини охолоджують, та використовують на стадії ДР 1.2.1 та ДР 1.2.2.

ДР 1.1.3. Приготування дезінфікувального розчину «Гембар»

Кількість робочого розчину «Гембар» коцентрацією 0,1 %, для генерального прибирання становить 370 л. Розчин готують в резервуарі об'ємом 500 л.

В збірник об'ємом 500 л, за допомогою об'ємно-вагового дозатора подають 3,7 кг засобу та 496,3 м³ питної води.

Збірник оснащений сорочкою, для забезпечення підігрівання робочого розчину до оптимальної температури – 70-80 °С. Розчин перемішують протягом 10 хвилин. Після чого його охолоджують до оптимальної температури та використовують на стадії ДР 1.2.1 та ДР 1.2.2.

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1 Щоденне прибирання виробничих приміщень

Щоденне прибирання приміщень (миття підлоги) проводять кожного дня вологим способом, з використанням дезінфікувальних засобів від ДР 1.1.2 або ДР 1.1.3.

З виробничої дільниці, побутових, лабораторних, підсобних приміщень видаляють готову продукцію, напівпродукти, відходи виробництва та невикористані матеріали.

Відпрацьовані розчини надходять на знешкодження рідких відходів (до ЗВ 12.3).

Для контролю чистоти приміщення проводять мікробіологічний аналіз приміщення (КУО<800/см²).

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень

Генеральне прибирання виробничих приміщень проводять один раз на місяць або за потреби бактеріолога при виявленні мікробної контамінації.

Для обробки використовують 0,2 % робочий розчин засобу «Хлорантоїн» (від ДР 1.1.2), або розчин «Гембар» 0,1% від ДР 1.1.3 (засіб замінюють кожні 3 місяці). Для знезараження повітря після генерального прибирання включають бактерицидні лампи.

При кожній заміні миючого засобу проводять мікробіологічний контроль ($KУО < 300/см^2$), щоб перевірити його ефективність. Відпрацьовані розчини надходять до знешкодження рідких відходів (до ЗВ 12.3).

ДР 1.3. Підготовка технологічного обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання

Миття обладнання забезпечується автоматизовано, за допомогою СПМийки (Р-1), мийний засіб використовується об'ємом 20% від геометричного об'єму обладнання (від ДР 1.1.1).

Обробка здійснюється протягом 15-20 хвилин, після чого відпрацьований розчин подають на відновлення до Р-1 з попередньою очисткою за допомогою фільтрів на вході до збірників або зливають (ЗВ 12.3).

Обладнання промивається питною водою після кожної обробки, таким же чином, відпрацьована вода йде на переробку.

ДР 1.3.2. Технічний огляд

Після миття та ополіскування обладнання проводиться візуальний технічний огляд з метою виявлення неущільнень в комунікаціях та запірній апаратурі на обладнанні.

Для усунення неущільнень проводять підтягування різьбових з'єднань .

ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність

Закривши усю запірну арматуру ємнісного обладнання, подають аераційне повітря до рівня надлишкового тиску $P=0,1-0,2$ Мпа, перекривають

вентиль подачі повітря і фіксують покази манометра на кришці апарата та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі.

Апарат вважається герметичним, якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів.

В апарат вносять невелику кількість леткої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон – CCl_4), закривають усю запірну арматуру. Апарат нагрівають до 80 °С і збільшують тиск до 0,2 МПа. Пари галогеновмісної речовини проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість операції становить 1,5-2 год.

У разі виявлення неущільнень здійснюють їх ліквідацію – підтягують різьбове з'єднання або міняють ущільнюючу прокладку.

ДР 1.3.4. Стерилізація обладнання

Для стерилізації обладнання в сорочку подають глуху пару, після цього нагрівають до 80-90°С. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають насичену пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, також відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату.

При досягненні температури стерилізації 125-131°С всю запірну арматуру, окрім парової, закривають та витримують протягом 1 години. Після чого закривають запірну арматуру подачі пари в апарат, потім подають стерильне повітря, в сорочку подається холодна вода.

Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30 - 40° С і надлишкового тиску $P = 0,003-0,005$ МПа.

ДР 1.4. Підготовка персоналу

ДР 1.4.1 Навчання персоналу

Весь персонал проходить систематичне навчання по правильному виробництву продукції в асептичних умовах, гігієни і основ мікробіології.

ДР 1.4.2 Санітарно-гігієнічна підготовка персоналу

Для миття рук на виробництвах застосовують туалетне або господарське мило. Дезінфекцію рук проводять 76% етиловим спиртом.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрозбірник (ПЗ-2), що розташовується на висоті 10 м.

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення

Повітря пропускають через фільтр (Ф-3), що містить скловолокно. У даному фільтрі здійснюється відділення крупних часток бруду та затримання пилу. Фільтрування забезпечує очищення повітря до 75%.

ДР 2.3. подача повітря на компресор

Стиснення повітря відбувається у компресорі (К-4) до тиску 0,4 Мпа. Температура повітря зростає від 120 до 250°C.

ДР 2.4. Охолодження повітря і видалення вологи

Наступним етапом очищення є виведення вологи. Повітря охолоджують до 18-19° С у теплообміннику (Т-5). Далі подача повітря відбувається до ресивера (Р-6), де відділяється зайва волога - $W=60\%$.

ДР 2.5. Підігрів повітря

Для унеможливлення конденсації вологи на волокнах головного і індивідуальних фільтрів, повітря підігрівають у теплообміннику-нагрівачі (Т-7) до температури 30-35°C.

ДР 2.6. Тонке очищення повітря

Наступним етапом очищення повітря є очищення від мікроорганізмів, що відбувається в головному фільтрі (Ф-8), ступінь очищення становить 95 %.

Очищене повітря подається до індивідуальних фільтрів (Ф-14, 18, 23, 26, 31, 37, 40, 47, 51, 55)

ДР 2.7. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах

Перед кожним інокулятором (ІН - 21, 29, 37) і виробничим ферментером (Фр – 54), а також перед збірниками, у яких містяться стерильні розчини (Р – 12, 14, 16, 24, 31), установлюють індивідуальні фільтри (Ф-14, 18, 23, 26, 30, 33, 38, 47, 51,55).

При використанні у якості фільтруючого матеріалу боросилікату, ступінь очищення становить $E=99,999\%$.

ДР 3. Приготування та стерилізація допоміжних розчинів

ДР 3.1. Приготування та стерилізація титрувальних розчинів

ДР 3.1.1 Приготування 6% розчину хлоридної кислоти

Необхідна кількість компонентів для приготування 6% розчину хлоридної кислоти, потрібної для стадій підготовки поживного середовища, наведена в *табл. 8.1*.

Таблиця 8.1

Розрахунок кількості компонентів для приготування 6% НСІ

	Об'єм титрованого розчину, л	Об'єм необхідної кількості 6% НСІ (з 10% запасом), мл	Кількість 37% НСІ для приготування титрувального розчину, мл	Кількість води для приготування розчину, мл
1	25,1	55	9	46
2	249,2	548	87	460
3	2 467	5 427	866	4 560
4	Загальний об'єм на 2 741 л титрованого р-ну (окрім виробничого (4))	6 031	960	5 070

Приготування хлоридної кислоти для трьох етапів культивування проводять разом. Приготований розчин хлоридної кислоти трубопроводами подають до відповідного інокулятора, через титрувальні системи.

У збірник (З-9) об'ємом 8 л, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-10) подають 5 068 мл питної води. Далі при постійному перемішуванні вносять 962 мл 37% розчину НСІ.

Обов'язково рідини змішують у такому порядку (для уникнення сильної екзотермічної реакції).

ДР 3.1.2. Приготування 6% розчину хлоридної кислоти для виробничого культивування

Необхідна кількість компонентів для приготування 6% розчину хлоридної кислоти, необхідної для підтримання початкового рН (4,5), наведена в *табл. 8.2.*

Таблиця 8.2

Розрахунок кількості компонентів для приготування 6% НСІ

Об'єм титрованого розчину, л	Об'єм необхідної кількості 6% НСІ (з 10% запасом), мл	Кількість НСІ для приготування 6% титрувального розчину, г	Кількість води для приготування розчину, мл
1	2	3	4
29,7	65 310	10 590	54 720

У реакторі (З-42) об'ємом 90 л, через об'ємно-ваговий дозатор (Д- 43) подають 54,8 л питної води. Далі при постійному перемішуванні вносять 10,6 кг 37% розчину НСІ.

Обов'язково рідини змішують у такому порядку (для уникнення сильної екзотермічної реакції).

Приготований розчин хлоридної кислоти трубопроводами подають до ферментера (Фр-54).

ДР 3.1.3. Приготування стерильного 6% розчину натрій гідроксиду

Необхідна кількість компонентів для приготування стерильного 6% розчину натрій гідроксиду, потрібного для кожної зі стадій підготовки поживного середовища, наведена в *табл. 8.3.*

Розрахунок кількості компонентів для приготування 6% NaOH

Об'єм титрованого розчину, л	Об'єм необхідної кількості 6% NaOH (з 10% запасом), мл	Кількість NaOH для приготування 6% титрувального розчину, г	Кількість води для приготування розчину, мл
2 727,3	6 000	360	5 640
275,5	606	36,4	569,6
27,8	61	3,7	57,3
Всього, на 3030,6 л титр-ну	6 667	400,1	6 266,9

На технічних вагах зважують 400,1 г кристалічного натрій гідроксиду, який вносять у збірник (Р-12) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-13) об'ємом 9 л, додають 6 267 л питної води при постійному перемішуванні 50 – 100 об/хв. Після повного розчинення стерилізують при 131 °С упродовж 40 хв.

Готовий розчин подають до ТП 5.5, ТП 5.6, ТП5.7 для унеможливлення реагування солей композицій середовища.

ДР 3.1.4. Приготування стерильного 6% розчину натрій гідроксиду для виробничого біосинтезу

Необхідна кількість компонентів для приготування стерильного 6% розчину натрій гідроксиду, для контролю рівня рН на виробничому біосинтезі, наведена в *табл. 8.4*

Розрахунок кількості компонентів для приготування 6% NaOH

Об'єм титрованого розчину, л	Об'єм необхідної кількості 6% NaOH (з 10% запасом), мл	Кількість NaOH для приготування 6% титрувального розчину, г	Кількість води для приготування розчину, мл
1	2	3	4
29,7	65 310	3 920	61 390

У реактор (Р-45) об'ємом 90 л, через об'ємно-ваговий дозатор (Д- 46) подають 39 кг кристалічного натрій гідроксиду, потім додають 61,4 л питної води при постійному перемішуванні 50 – 100 об/хв. Після повного розчинення стерилізують при 131⁰С упродовж 40 хв.

Готовий розчин подають до ферментера (Фр-54) для контролю рівня рН (4,5).

ДР 3.2 Приготування та стерилізація підживлювального розчину

Виробничий біосинтез склероглюкану проходить за умови підживлення 50% розчином сахарози.

Необхідна кількість підживлювального розчину вказана в *табл. 8.5*

Таблиця 8.5

Вміст сахарози в підживлювальному розчині

Компонент	Вміст, г/л	Вміст, кг/(29,7 м³)
1	2	3
Сахароза	120	3 564

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-50) у реактор (Р-49) об'ємом 7 м³ подають 3 564 кг сахарози та 3 564 л питної води, при постійному перемішуванні 0-100 об/хв.

Після повного розчинення сахарози, розчин стерилізують при температурі 112⁰С упродовж 30 хв.

Готовий підживлювальний розчин подають до ТП 6.1 у ферментер (Фр-54), через кожні 2 години, з 21 по 40 години культивування (22, 24 .. 40 год).

ДР 3.3 Приготування 3М розчину NaOH

Для розведення культуральної рідини необхідно використати 3 М розчину гідроксиду натрію у співвідношенні (1.8 гідроксиду натрію : 1 культуральної рідини).

Об'єм культуральної рідини (попередньо розведений дистильованою водою становить 112 м³).

Отже, необхідно приготувати 200 м³ 3М розчину гідроксиду натрію.

Для приготування 214 м³ розчину лугу в збірнику (З-61) об'ємом 270 м³ на об'ємно-ваговому дозаторі (Д-60) зважують натрій гідроксид та дистильовану воду. Проводять перемішування протягом 30 хв до повного розчинення лугу. Розчин передають за допомогою моноблочного насосу (Н-62) до збірника (З-63).

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу становить 2 830 мл. Вміст посівного матеріалу становить 10%.

Вміст компонентів для приготування 2 830 мл середовища наведено в табл. 8.6.

Таблиця 8.6

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2 830 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для робочого об'єму 2 830 мл, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Сахароза	30	84,9	А	1 600
Дріжджовий екстракт	1	2,8		
Вода		1 514		
Лимонна кислота	0,7	2	Б	600
NaNO ₃	2,25	6,4		
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	2	5,7		
Вода		586		
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5	1,4	В	600

FeSO ₄ *7H ₂ O	0.07	0,2		
KCL	0,5	1,4		
Вода		597		
Разом	37,02	2 801,7		2 800

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічні ваги ставлять мірний стаканчик, тарують, та зважують 84,9 г сахарози, після чого знову тарують, зажують 2,8 г дріжджового екстракту. Добавляють 500 мл води, перемішують, до повного розчинення компонентів та переносять у колбу, об'ємом 3 л, добавляють 1014 мл води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою, та стерилізують в автоклаві при температурі 112° упродовж 30 хв.

ДР 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 6,4 г NaNO₃, відтаровують та зважують 5,7 г K₂HPO₄×3H₂O. Після цього зважують останній компонент композиції – відповідно тарують стаканчик з попередніми компонентами та зважують 2 г лимонної кислоти. Наважку переносять у колбу об'ємом 1 л та додають 586 мл води, перемішують до розчинення солей. Після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131° упродовж 40 хв.

ДР 4.1.3 Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 1,4 г MgSO₄×7H₂O, відтаровують та зважують 0,2 г FeSO₄×7H₂O. Після цього зважують останній компонент композиції – відповідно тарують стаканчик з попередніми компонентами та зважують 1,4 г KCl. Наважку переносять у колбу об'ємом 1, перемішують до розчинення солей, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131° упродовж 40 хв.

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в 60 л інокуляторі

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу становить 30,6 л. Вміст посівного матеріалу становить 10%.

При розрахунку вмісту води в середовищі, варто врахувати, що стерилізація проводиться гострою парою, тому об'єм конденсату становитиме 10% (3,06 л).

Вміст компонентів для приготування 30,6 л середовища наведено в *табл. 8.7*.

Таблиця 8.7

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 30,6 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/ л	Кількість для робочого об'єму 30,6, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Сахароза	30	918	А	2 400
Дріжджовий екстракт	1	30,6		
Конденсат		240		
Вода		1 211,4		
Лимонна кислота	0,7	21,4	Б	25 100
NaNO ₃	2,25	68,9		
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	2	61,2		
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5	15,3		
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.07	2,2		
KCL	0,5	15,3		
Конденсат		2 510		
Вода		22 405,7		
Разом	37,02	27 500		27 500

ДР 4.2.1 Приготування та стерилізація композиції А

У реактор (Р-16), об'ємом 3 л, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-17) вносять 918 г сахарози. На технічні ваги ставлять мірний стаканчик, тарують, зважують 30,6 г дріжджового екстракту, та подають у збірник через воронку та заливають 1,2 л води, з урахуванням конденсату. Після цього вмикають перемішувальний пристрій до утворення однорідної суспензії. Стерилізують гострою парою при температурі 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічні ваги ставлять мірний стаканчик, тарують, зважують 21,4 г лимонної кислоти, повторно тарують та зважують 68,9 г NaNO_3 , повторно тарують, зважують 61,2 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$. Аналогічно зважують решту компонентів даної композиції, у відповідних кількостях: $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 15,3 г; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 2,2 г; KCl - 15,3 г. Солі переносять в збірник (Р-19), обладнаний сорочкою для нагріву та мішалкою.

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-20) у збірник (Р-19), об'ємом 35 л, подають воду - 22,5 л. Включають мішалку, та подають гостру пару (40° С) для утворення однорідної суспензії. Після чого розчин самоплином поступає у інокулятор (ІН-21). Розчин солей підкислюють водним розчином соляної кислоти (від ДР 3.1.1), стерилізують при температурі 131° упродовж 40 хв.

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в 630 л інокуляторі

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу становить 303 л. Вміст посівного матеріалу становить 10%. При розрахунку вмісту води в середовищі, варто врахувати, що стерилізація проводиться гострою парою, тому об'єм конденсату становитиме 10% (30,3 л). Вміст компонентів для приготування 303 л середовища наведено в табл. 5.8.

ДР 4.3.1 Приготування та стерилізація композиції А

У збірник (Р-24) об'ємом 30 л, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-25) вносять 9,1 кг сахарози, 303 г дріжджового екстракту, та заливають 11,8 л води, з урахуванням конденсату. Після цього вмикають перемішувальний пристрій до утворення однорідної суспензії. Стерилізують гострою парою при температурі 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічні ваги ставлять мірний стаканчик, тарують, зважують 212 г лимонної кислоти, повторно тарують та зважують 682 г NaNO_3 , повторно тарують, зважують 606 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$. Аналогічно зважують решту компонентів даної композиції, у відповідних кількостях: $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 152 г; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 21 г; KCl – 152 г. Солі переносять в збірник (Р-27), обладнаний сорочкою для нагріву та мішалкою.

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-28) у збірник (Р-27) подають воду – 222,5 л. Включають мішалку, та подають гостру пару (40° С) для утворення однорідної суспензії. Після чого розчин самопливом поступає у інокулятор (ІН-29). Розчин солей підкислюють водним розчином соляної кислоти (від ДР 3.1.1), стерилізують при температурі 131° упродовж 40 хв.

Таблиця 8.8

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 303 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для робочого об'єму 303, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Сахароз	30	9 090	А	23 500
Дріжджовий екстракт	1	303		
Конденсат		2 350		
Вода		11 757		
Лимонна кислота	0,7	212	Б	249 200

NaNO ₃	2,25	682		
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	2	606		
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5	152		
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.07	21		
KCL	0,5	152		
Конденсат		24 920		
Вода		222 455		
Разом	37,02	272 700		272 700

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в 5 м³ інокуляторі

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу становить 3 000 л. Вміст посівного матеріалу становить 10%.

При розрахунку вмісту води в середовищі, варто врахувати, що стерилізація проводиться гострою парою, тому об'єм конденсату становитиме 10% (300 л).

Вміст компонентів для приготування 3000 л середовища наведено в табл 8.9.

ДР 4.3.1 Приготування та стерилізація композиції А

У збірник (Р-31) об'ємом 350 л, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-32) вносять 90 кг сахарози, 3 кг дріжджового екстракту, та заливають 210 л води, з урахуванням конденсату. Після цього вмикають перемішувальний пристрій до утворення однорідної суспензії. Стерилізують гострою парою при температурі 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв. Після чого розчин самопливом поступає у інокулятор (ІН-37).

ДР 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б

У збірник (Р-34) об'ємом 3,5 м³, обладнаний сорочкою для нагріву та мішалкою, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-35) вносять наступні компоненти: 2,1 кг лимонної кислоти, 6,8 кг - NaNO₃, 6 кг - K₂HPO₄×3H₂O, 1,5 кг - MgSO₄×7H₂O; 0,2 кг - FeSO₄×7H₂O – 21 г; 1,5 кг – KCl, та заливають

2 202 л вод. Включають мішалку, та подають гостру пару (40° С) для утворення однорідної суспензії.

Після чого розчин за допомогою насосу (Н-6 поступає у інокулятор (ІН-37). Розчин солей підкислюють водним розчином соляної кислоти (від ДР 3.1.1), стерилізують при температурі 131° упродовж 40 хв.

Таблиця 9.9

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3 000 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/ л	Кількість для робочого об'єму 303, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	30	90	А	233
Дріжджовий екстракт	1	3		
Конденсат		23,3		
Вода		209,7		
Лимонна кислота	0,7	2,1	Б	2 467
NaNO ₃	2,25	6,8		
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	2	6		
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5	1,5		
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.07	0,2		
KCL	0,5	1,5		
Конденсат		246,7		
Вода		2 202,2		
Разом	37,02	2 700		

ДР 4.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу становить 29,7 м³. Вміст посівного матеріалу становить 10%. Розраховуючи вміст води в середовищі необхідно врахувати, що виробничий біосинтез проходить за умов підживлення (7 130 л)

Вміст компонентів для приготування 29,7 м³. середовища наведено в табл. 9.10.

Таблиця 9.10

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 29,7 м³ середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для робочого об'єму 29 700 л, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	30	891	А	19 600
Дріжджовий екстракт	1	29		
Лимонна кислота	0,7	21		
NaNO ₃	2,25	67		
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	2	59		
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5	15		
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.07	2		
KCL	0,5	15		
Вода		18 500		
Разом	37,02	19 600		

У збірник (Р-39) об'ємом 27 м³, обладнаний сорочкою для нагріву та мішалкою, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-40) вносять наступні компоненти:

891 кг – сахароза; 29 кг – дріжджовий екстракт; 21 кг – лимонна кислота; 67 кг - NaNO₃, 59 кг - K₂HPO₄×3H₂O, 15 кг - MgSO₄×7H₂O; 2 кг - FeSO₄×7H₂O; 15 кг – KCl, та заливають 18,5 м³ вод.

Включають мішалку, та подають гостру пару (40° С) для утворення однорідної суспензії.

Готовий однорідний розчин подають на стрелізіцію, за допомогою насоса (Н-41) до УБС-53.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Підтримання колекційної культури *S. rolfsii* ATCC 201126 здійснюється зберіганням склероції в стерильній дистильованій воді, в холодильнику, при температурі до 4°C.

ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Одержання робочої культури здійснюється активацією склероції. Гранули склероції колекційної культури в асептичних умовах петлею переносять у чашки Петрі з середовищем Чапека та вирощують у термостаті при температурі 30°C.

ТП 5.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Ізольовані пророщені гранули петлею переносять в асептичних умовах на стерильне середовище ПМ₂₀ (по 1 гранулі) і культивують за умов 220 об/хв, 30°C.

ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках

У колбу, що містить композицію А (ДР 4.1.1) переносять, дотримуючись умов асептики, композиції В та С (від ДР 4.1.2 та ДР 4.1.3) і ретельно перемішують.

Стерильне середовище розливають по 150 мл в 19 стерильних качалочних колби об'ємом 750 мл. Колби в асептичних умовах засівають робочою культурою від ТП 5.3.

Культивування здійснюється у колбах на качалці 220 об/хв при $t = 30^{\circ}\text{C}$ упродовж 48 год. Значення рН = 4,5.

По закінченню процесу проводять мікробіологічний аналіз культуральної рідини кожної колби. Після проведення мікробіологічного контролю посівний матеріал з колб вносять в стерильну засівну колбу.

ТП 5.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 60 л

В інокулятор (ІН – 21), що містить композицію Б (ДР 4.2.2) через патрубок відкривши вентиль подають композицію А (від ДР 4.2.1). Після

чого підлужнюють (розчином лугу від ДР 3.1.2) до оптимального значення рН (4,5). Крім того, в інокулятор, від ТП 5.3 подається посійний матеріал із засівної колби.

У кожух ферментера подається гаряча та холодна вода, а також виводиться оборотна вода. В інокулятор подається стерильне стиснуте повітря, через індивідуальний фільтр (Ф-23), а виводиться відпрацьоване.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 30 °С, тривалість – 48 год. Швидкість перемішування становить 400 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор ІН – 30.

Кожні 4 години з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, концентрації джерела вуглецю та азоту.

ТП 5.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 630 л

В інокулятор (ІН – 29), що містить композицію Б (ДР 4.3.2) через патрубок відкривши вентиль подають композицію А (від ДР 4.3.1). Після чого підлужнюють (розчином лугу від ДР 3.1.2) до оптимального значення рН (4,5). Крім того, в інокулятор, за допомогою труби перетискання, від ІН-21 подається посійний матеріал.

У кожух ферментера подається гаряча та холодна вода, а також виводиться оборотна вода. В інокулятор подається стерильне стиснуте повітря, через індивідуальний фільтр (Ф-30), а виводиться відпрацьоване.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 30 °С, тривалість – 48 год. Швидкість перемішування становить 400 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор ІН – 37.

Кожні 4 години з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, концентрації джерела вуглецю та азоту.

ТП 5.7. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 5 000 л

В інокулятор (ІН – 37), що містить композицію Б (ДР 4.4.2) подають композицію А (від ДР 4.4.1). Після чого підлужнюють (розчином луку від ДР 3.1.2) до оптимального значення рН (4,5). Крім того, в інокулятор, за допомогою труби перетискання, від ІН- 29 подається посівний матеріал.

У кожух ферментера подається гаряча та холодна вода, а також виводиться оборотна вода. В інокулятор подається стерильне стиснуте повітря, через індивідуальний фільтр (Ф-38), а виводиться відпрацьоване.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 30 °С, тривалість – 48 год. Швидкість перемішування становить 400 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в виробничий ферментер Ф – 54.

Кожні 4 години з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, концентрації джерела вуглецю та азоту.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 50 м³

У ферментер, за допомогою нанососу подають простерилізоване поживне середовище від УБС-53.

Системою трубопроводів за допомогою труби перетискання, за дотриманням умов асептики подають посівний матеріал (від ТП 5.7). Швидкість мішалки в ферментері повинна становити 400 об/хв.

Дезінфекція та стерилізація труб і ємностей забезпечується застосуванням гострої водяної пари.

Біосинтез проводять при $t = 30$ °С, що досягається за допомогою теплообмінного кожуха, протягом 48 год. На 22 годині культивування починають вносити підживлювальний розчин (від ДР 3.2). Підживлення здійснюють через кожні 2 год, до 40 години культивування.

Культивування ведуть до досягнення максимального накопичення цільового продукту (26 г/л). Кожні 5 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 7. Отримання супернатанту

ТП 7.1 Попереднє розведення

У збірник (З-58) об'ємом 135 м³, подається насосом (Н-56) культуральна рідина (26,7 м³) від ферментера (Фр-54). Після чого з метою розведення подається дистильована вода, при температурі 80 °С, у співвідношенні 3:1 (80 м³).

Подача води здійснюється при включеній мішалці, та перемішується протягом 30 хвилин. Після чого насосом (Н-59) перекачується у збірник (З-60).

ТП 7.2 Розведення лугом

У збірник (З-62), що містить попередньо розведену культуральну рідину, подається 3М NaOH (від ДР 3.3) при включеній мішалці, у співвідношенні 1,8:1, після чого перемішується 30 хвилин. Звідки, за допомогою насосу (Н-63) подається на сепаратор (С-64) для відділення біомаси.

ТП 8 Відділення біомаси від культуральної рідини сепаруванням

Вмикаємо сепаратор (С-64), та подаємо розведену культуральну рідину, при швидкості обертання 27 500 об/хв та температурі 20 °С відділяємо біомасу.

Біомасу за допомогою механізму розвантаження викидають у приймач, та передають до ЗВ 12.2 (знешкодження твердих відходів).

Супернантант подається до збірника (З-65) для подальшого осадження склероглюкану.

ТП 9 Осадження склероглюкану

Процес осадження склероглюкану проводять тричі, з метою досягнення вищого рівня чистоти готового продукту, оскільки він використовується у косметичній промисловості.

Також, осаджений склероглюкан тричі промивають дистильованою водою від залишків спирту.

ТП 9.1 Осадження ізопропанолом

До збірника (З-65), що вже містить супернатант від ТП 8, при включеній мішалці, додають 96° ізопропіловий спирт, у співвідношенні 1:1. Після чого витримують 8 годин, при температурі 58 °С.

ТП 9.2 Фільтрування на друк-фільтрі

Розчин, що містить осаджений склероглюкан (від ТП 9.1) зі збірника (З-65) за допомогою насосу (Н-67), при включеній мішалці, перекачують на друк-фільтр (Ф-68).

У будові друк-фільтра передбачено мішалку з різною формою елемента, що зрізає продукт з фільтра, та не дає злежуватись. Для вивантаження продукту передбачений бічний патрубок.

Відфільтрований склероглюкан подають вручну до збірника (З-69) для другого етапу осадження. Фільтрат відкачують на повторну перегонку спирту, для подальшого використання. Внутрішні поверхні друк-фільтра промивають за допомогою СІР-мийки, та стерилізують водяною насиченою парою з тиском $P = 0,28-0,3$ Мпа. При досягненні в апараті температури стерилізації 130–135 °С закривають усю запірну арматуру, крім парової, і витримують заданий час стерилізації.

У збірнику (З-69), завантажений склероглюкан, розчиняють дистильованою водою, та подають 96° ізопропанол, для осадження. Витримують 8 годин, при температурі 58 °С. Після чого за допомогою насосу (Н-71), при включеній мішалці, перекачують на друк-фільтр (Ф-68).

Відфільтрований склероглюкан подають вручну до збірника (З-73) для третього етапу осадження. Фільтрат відкачують на повторну перегонку спирту, для подальшого використання. Друк-фільтр (Ф-68) повторно стерилізують.

У збірнику (З-72), завантажений склероглюкан, розчиняють дистильованою водою, та подають 96° ізопропанол, для осадження. Витримують 8 годин, при температурі 58 °С. Після чого за допомогою насосу (Н-74), при включеній мішалці, перекачують на друк-фільтр (Ф-68).

Відфільтрований склероглюкан подають вручну до збірника (З-75) для промивання від залишків спирту. Фільтрат зі відкачують на повторну перегонку спирту, для подальшого використання.

ТП 9.3 Розчинення

У збірник (З-75), що містить відфільтрований склероглюкан (від ТП 9.2), подають дистильовану воду, для розчинення та промивання склероглюкану, від залишків спирту.

ТП 9.4 Фільтрування на друк-фільтрі

Даний розчин склероглюкану (від ТП 9.3) подають за допомогою насоса (Н-76) на друк-фільтр (Ф-77). Для вивантаження продукту передбачений бічний патрубок.

Відфільтрований склероглюкан подають вручну до збірника (З-78) на другий етап промивання, та промивають при включеній мішалці. Фільтрат відкачують на повторну перегонку спирту, для подальшого використання. Внутрішні поверхні друк-фільтра промивають за допомогою СІР-мийки, та стерилізують водяною насиченою парою з тиском $P = 0,28-0,3$ Мпа. При досягненні в апараті температури стерилізації 130–135 °С закривають усю запірну арматуру, крім парової, і витримують заданий час стерилізації.

У збірник (З-78), що містить відфільтрований склероглюкан, подають дистильовану воду, для другого етапу розчинення та промивання склероглюкану, від залишків спирту.

Даний розчин склероглюкану подають за допомогою насосу (Н-79) на друк-фільтр (Ф-77). Для вивантаження продукту передбачений бічний патрубок.

Відфільтрований склероглюкан подають вручну до збірника (З-80) на третій етап промивання. Фільтрат відкачують на повторну перегонку спирту, для подальшого використання. Друк-фільтр (Ф-77) повторно стерилізують.

У збірник (З-80), що містить відфільтрований склероглюкан, подають дистильовану воду, для третього етапу розчинення та промивання склероглюкану, від залишків спирту.

Даний розчин склероглюкану подають за допомогою насосу (Н-81) на друк-фільтр (Ф-77). Для вивантаження продукту передбачений бічний патрубок.

Відфільтрований склероглюкан вручну відвантажують на переносну тару (Т-82).

ТП 10 Отримання сухого склероглюкану

ТП 10.1 Сушіння осажденного склероглюкану

З тари (Т-82) склероглюкан подається до вакуумної сушильної шафи (СШ-83), рівномірно розділяючи на полицях, та сушиться протягом 2 год при температурі 60 ° С.

Конденсат, що утворюється, відводиться через колектор у каналізацію. Після закінчення процесу матеріал охолоджують і вивантажують із сушарки.

ТП 10.2 Дробіння сухого склероглюкану

Висушений склероглюкан відвантажують зі сушильної шафи (СШ-83) та подають на подрібнення до молоткової дробарки з тангенціальним підводом повітря (ДМ-84)

ТП 10.3 Подрібнення порошку через сито

Після подрібнення на дробарці (ДМ-84) склероглюкан вигружається та просіюється через сито (С-85).

ПМВ 11 Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 11.1 Пакування в первину упаковку

З сита (С-85) склероглюкан подається на фасувальну машину (ФМ-86) повного автоматичного обігу, де проходить фасування полісахариду у мішки по 25 кг та їх автоматичне запаювання. Запакований полісахарид відвантажують на маркування.

ПМВ 11.2 Маркування

Запакований полісахарид (від ПМВ 11.1) подають на маркувальну автоматизовану машину (ММ-87).

ПМВ 11.3 Пакування в групову тару і відвантаження

Запакований, промаркований склероглюкан (від ПМВ 11.2) подається від маркувальної машини (ММ-87) на пакувальну машину (ПМ-88), де у ящики надходять мішки з склероглюканом.

ЗВ 12 Знешкодження та переробка відходів

Відпрацьовані робочі розчини мийних та мийно-дезінфікуючих засобів, воду та аераційне повітря знешкоджують.

ЗВ 12.1 Знешкодження газоподібних викидів

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

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

Очищене повітря викидається через трубу розсіювання.

ЗВ 12.2 Знешкодження твердих викидів

Для знешкодження та утилізації твердих відходів використовують термічні методи їх обробки на сміттєспалювальних заводах та полігонах.

ЗВ 12.3 Знешкодження рідких відходів

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

РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва

Упродовж культивування на кожній стадії періодично відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного та технологічного контролю, який включає в себе: визначення концентрації біомаси, кінцевого продукту (склероглюкану), побічного продукту – оксалату.

91. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованим середовищем.

Критерієм чистоти культури є однорідність колоній штаму *S. rolfsii* ATCC 201126, та відсутність колоній інших мікроорганізмів. Посіви інкубують декілька діб при температурі 30°C. При виявленні під час мікроскопіювання сторонніх мікроорганізмів культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пентонним агаром для визначення бактерій, з сусло-агаром або глюкозо-каропляним агаром для виявлення дріжджів і грибів [15].

Для мікроскопіювання використовують світловий мікроскоп (мікроскоп Nikon ECLIPSE 80i) з використанням поляризаційних фільтрів і диференціальної інтерференційної контрастності Nomarski (DIC).

Сухі склероглюканові гранули поміщають між скляним предметним скельцем і накривним, додавши невелику кількість води. Для прискорення процесу розчинення додають невелику кількість 1M NaOH. Колонії всіх штамів *S. rolfsii* характеризуються білим або блідо-оливковим кольором, розміром від 0,5 до 2,0 мкм [16].

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акруців
Розроб.		Ярош У. М.					129	147
Перевір.		Тетеріна С. М.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т. П.						

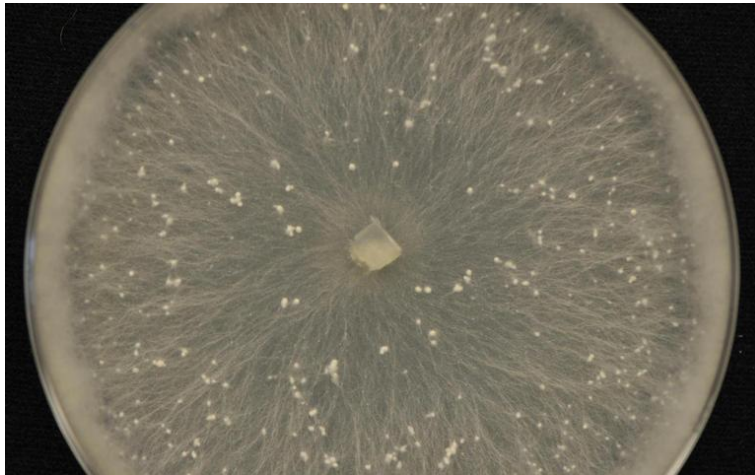


Рис. 5.1 Морфологія *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126

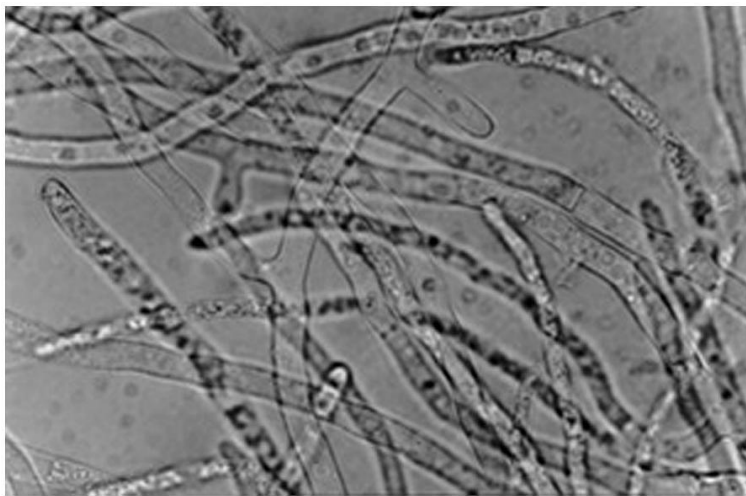


Рис. 5.2 Колонії *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126 (після зростання протягом 3 днів при 30 ° С в рідкому РМ 20).

Технологічний контроль.

Визначення концентрації біомаси

Для того щоб визначити біомасу при культивуванні *S. rolfsii*, відбирають 40 г культурального бульйону, попередньо нагрівши до 56° С і піддають ферментативній деструкції клітинної стінки (1 мг Глюканекс / г культуральної рідини). Після інкубації протягом 30 хв при 56 ° С Глюканекс інактивував тепло (90 ° С, 20 хв) і зразок охолоджували до кімнатної температури.

Початкову масу (40 г) повторно коригували додаванням води. Після чого, відібрали 30 г цього розчину та центрифугували для збирання біомаси.

Біомасу висушували у вакуумі 12 год, , 60 ° С та визначали масу сухої речовини.

Визначення концентрації склероглюкану

Рівні склероглюкана визначали, використовуючи осадження екзополісахариду ізопропанолом. Два об'єми ізопропанолу змішували з одним об'ємом культурального бульйону і отриманий осад склероглюкану фільтрували через сітчастий фільтр розміром 74 мкм. Після випаровування ізопропанолу осад сушили у вакуумі протягом 2 год при 60 ° С і визначали суху масу склероглюкана [2].

$$K_{\text{ЕПС}} = ((\Phi_1 - \Phi_0)/V) * 1000 \quad (5.1)$$

Φ_1 — наважка фільтра з осадом ЕПС, г; Φ_0 — наважка фільтра, г;

V — об'єм культуральної рідини, з якої осаджували ЕПС, (мл).

Визначення джерела вуглецю

Визначення проводять з використанням біосенсорів амперметричним методом. Принцип роботи таких біосенсорів базується на тому, що аналізована речовина дифундує через напівпроникну мембрану тонкого шару біологічного матеріалу, в якому відбувається реакція з утворенням відповідних електрохімічних продуктів, що піддаються окисненню або відновленню на електродах.

Як робочий буфер використовували розчин 20 мМ KH_2PO_4 — Na_2HPO_4 , рН 7,2, оскільки, саме такий рН є оптимальним для функціонування іммобілізованої ГОД.

Вимірювання вмісту сахарози за допомогою амперметричного біосенсора проводили у 20 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,2, при кімнатній, за інтенсивного перемішування. Для проведення аналізу пробу розводили у 250–1 000 разів [26,27].

Визначення азоту нітратів

Джерелом нітогену у середовищі є NaNO_3 . Визначення проводять за методом В. А. Алікаєва.

У фарфорову чашку переносять 10 мг культуральної рідини, розчиняють кристалик бруцину і додають 2 мл концентрованої сірчаної кислоти. При наявності у воді азоту нітратів з'являється рожевий колір який переходить у жовтий. Метод базується на перетворенні нітратів у нітрити з наступним утворенням забарвлених розчинів. На фотоелектроколориметрі визначають інтенсивність забарвлення суміші в обох (1 – культуральна рідина, 2 – вода) пробірках у кюветі 10 або 15 мм при довжині хвилі 460-520 нм. (зелений світлофільтр).

Визначення рівня оксалату

Оскільки при синтезі склероглюкану може утворюватись побічний продукт - оксалат, потрібно проводити контроль його вмісту. Рівні оксалату в супернатанті культури визначали за допомогою ВЕРХ (колона Knauer H +), використовуючи 0,05М H₂SO₄ в якості розчинника і УФ-детектор (210 нм).

Відновлюючі цукри

Відновлюючі цукру визначають колориметричним методом Міллера з глюкозою в якості стандарту. Одну одиницю (U) β-глюканазної активності визначають як кількість ферменту, що вивільняє 1 мкмоль відновлюючих цукрів за хвилину в умовах, що аналізуються [17].

Оцінка міцності гелю

Для оцінки міцності гелю зразок у концентрації 20 г/л (склероглюкан та дистильована вода) витримували на водяній бані при 61 ° С - 1 год для приготування термозворотного гелю та при 95 ° С - 1 год для приготування термонезворотного гелю. Міцність гелів оцінювали у текстометрі, використовуючи 36-мм зонд для аналізу компресії

Реологічний аналіз

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

Карта постадійного контролю виробництва склероглюкану *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх, 1.1.1. Приготування робочого розчину Вімол для миття обладнання	Концентрація робочого розчину вімолу	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 0,5 %
Кх, 1.1.2 Приготування робочого розчину Хлорантоїну для щоденного прибирання	Концентрація робочого розчину Хлорантоїну	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 0,2 %
Кх, 1.1.2 Приготування робочого розчину Гембар для генерального прибирання	Концентрація робочого розчину Гембар	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 0,1%
Кт 1.2.1. Щоденне прибирання	Підлога	Візуальний огляд,	Під час прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кт 1.2.2. Генеральне прибирання	Підлога, стіни, двері та вікна	Візуальний огляд	Під час прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кт 1.3.1. Миття обладнання	Мийний розчин, обладнання, температура робочого розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд після миття	t = 40-50 °C, τ = 30-40 хв, чисте обладнання

1	2	3	4	5
Кт 1.3.3 Перевірка обладнання на герметичність	Герметичність роботи обладнання, температура, тиск, час, перепад тиску	Манометр технічний, термометр, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність, перепад тиску визначають після проведення операції	$P = 0,07$ МПа, $\tau = 20\text{--}30$ хв, $\Delta P < 0,01$ Мпа
Кт 1.3.4. Стерилізація ферментаційного обладнання	Обладнання, час стерилізації, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	$\tau = 1$ год, $P = 0,15$ МПа
Кт 2.1. Забір атмосферного повітря	Висота забору повітря	Альтиметр	При проектуванні приміщень	$h = 10$ м
Кт 2.2. Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 90$ %, тиск згідно паспорту
Кт 2.3. Подача повітря на компресор	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	$P = 0,35\text{--}0,5$ МПа, $t = 120\text{--}150$ °С
Кт 2.4. Охолодження повітря і видалення вологи	Охолоджене повітря, після видалення зайвої вологи температура	Термометр технічний, психометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	$t = 25$ °С, $W = 60$ %
Кт 2.5. Підігрів повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 70\text{--}90$ °С
Кт 2.6. Тонке очищення повітря	Повітря на виході з головного фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	$E = 95$ %, тиск згідно паспорту

1	2	3	4	5
Кт 2.7. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах	Повітря на виході з індивідуального фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря у індивідуальному фільтрі	E = 99,99 %, тиск згідно паспорту
Кх 3.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища в інокуляторах	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C = 6 %
Кх, Кт, Км 3.1.2 Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлучення поживного середовища в інокуляторах	Тиск, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину гідроксиду натрію	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, C = 6 %
Кх, Кт, Км 3.2. Приготування і стерилізація підживлювального розчину сахарози	Тиск, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину глюкози	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти, C = 50 %
Кт, Км 4.1.1., 4.2.1.,4.3.1,4.4.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °С, τ=30 хв, P=0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2., 4.2.2.,4.3.2,4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 40 хв, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, $P = 0,15\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 4.5.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу	Поживне середовище Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, годинник технічний, рН-метр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 0,15\text{ МПа}$ $\tau = 1\text{ год } 35\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1. Підтримання колекційної культури	Культура <i>S. rolfsii</i> , тривалість, температура, мікробіологічна чистота	Холодильник	Мікробіологічний контроль	$t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Км 5.2. Одержання робочої культури	Культура <i>S. rolfsii</i> , Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин	$t = 30 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48\text{ год}$ Відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота.	Термометр технічний, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин, концентрація біомаси в кінці культивування	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 400\text{ об/хв}$, $\tau = 48\text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти,
Кх, Кт, Км 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 л	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури	Датчик рН, годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп, ФЕК	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин та визначення конц. джерела вуглецю та азоту	$t = 30 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48\text{ год}$, $\omega = 400\text{ об/хв}$ відсутність сторонньої мікробіоти

<p>Кх, Кт, Км 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 630 л</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси</p>	<p>Датчик рН, годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп, ФЕК</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин та визначення концентрації джерела вуглецю та азоту</p>	<p>$t = 30 \pm 2$ °С, $\tau = 48$ год, $\omega = 400$ об/хв відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кх, Кт, Км 5.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 000 л</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси</p>	<p>Датчик рН, годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп, ФЕК</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин та визначення концентрації джерела вуглецю та азоту</p>	<p>$t = 30 \pm 2$ °С, $\tau = 48$ год, $\omega = 400$ об/хв відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кх, Кт, Км 6.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 50м3</p>	<p>Культуральна рідина Тривалість культивування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, концентрація вуглецю, азоту, концентрації склероглюкан, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів,</p>	<p>Датчик рН Годинник, термометр технічний, тахометр, манометр, мікроскоп, спектрофотометр</p>	<p>рН визначають в останні години культивування; температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування; мікроскопіювання – кожні 8 годин, концентрація курдлану та біомаси в кінці культивування.</p>	<p>$t = 30 \pm 2$ °С, $\tau = 48$ год, $\omega = 400$ об/хв відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>К_т 7.1 Попереднє розведення</p>	<p>Культуральна рідина, кількість води, температура, час процесу</p>	<p>Датчик Годинник Термометр</p>	<p>Під час процесу</p>	<p>$\tau = 30$ хв, $t = 80$ °С</p>

Закінчення табл. 9.1

К _т 7.1 Попереднє розведення	Культуральна рідина, кількість води, температура, час процесу	Датчик Годинник Термометр	Під час процесу	$\tau = 30$ хв, $t = 80$ °С
К _т , К _х 7.3 Розведення лугом	Культуральна рідина, кількість лугу, температура, час процесу	Датчик Годинник Термометр	Під час процесу	$\tau = 30$ хв, конц. 1,8:1, $t = 80$ °С
К _т 8 Відділення біомаси від культуральної рідини сепаруванням	Культуральна рідина, швидкість обертання, час процесу, температура	Датчик Годинник Термометр	Під час процесу	$n = 27\,500$ хв ⁻¹ $\tau = 30$ хв $t = 15$ °С
К _т , К _х 9.1 Осадження ізопропанолом	Розчин, кількість спирту, час процесу, температура	Датчик Годинник Термометр	Під час процесу	$\tau = 8$ год $t = 58$ °С
К _х 9.3 Розчинення, промивання	Склероглюкан, всіст спирту		Після закінчення процесу	
К _т 10.1 Вакуумна сушильна шафа	Кристалічний полісахарид, Температура, тиск, вологість	Термометр Манометр, аналізатор вологості	Під час процесу	$t = 60$ °С $W = 5\%$ $\tau = 2$ год
К _х К _т 11 Пакування маркування відвантаження	вологість продукту	аналізатор вологості	До початку процесу	$W = 5\%$

РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва

Підвищення ефективності роботи біотехнологічних виробництв можливо не лише завдяки підготовці спеціалістів – біотехнологів, які володіють спеціальними знаннями в області промислової мікробіології, а і шляхом оптимізації процесів виробництв, які реалізуються за допомогою систем автоматичного керування, контролю біотехнологічних параметрів процесу та збалансованому підборі живильних середовищ.

На сьогоднішній день автоматизація вважається головним, найбільш перспективним напрямком в розвитку промислового виробництва.

Завдяки звільненню людини від безпосередньої участі у виробничих процесах, а також високій концентрації основних операцій значно покращуються умови праці і економічні показники виробництва.

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

- система автоматичного управління (САУ);
- система автоматизації проектних робіт (САПР);
- автоматизована система управління технологічним процесом (АСУ ТП).

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва	Літ.	Арк.	Акрощів
Розроб.		Ярош У. М.					139	147
Перевір.		Тетеріна С. М.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т. П.						

Опис апаратурно-технологічної схеми автоматизації

Сушіння - процес видалення вологи з матеріалів (продуктів, препаратів).

При сушіння склероглюкану доцільно використовувати вакуумну сушарку, оскільки при сушінні можуть міститись залишки ізопропанолу (що використовується при осадженні), що є вибухонебезпечним. Вакуумна сушарка, на відміну від інших типів, дає можливість сушіння термічно нестійких речовин в розрідженому повітрі (в вакуумі до 0,01 атм).

Після випаровування ізопропанолу осад сушать у вакуумній сушарці протягом 2 год при 60 ° С.

Склероглюкан подається до вакуумної сушильної шафи, рівномірно розділяючи на полицях, та сушиться пр. заданих вище параметрах.

Конденсат, що утворюється, відводиться через колектор у каналізацію. Після закінчення процесу матеріал охолоджують і вивантажують із сушарки.

Ще один з процесів що піддається автоматизації, є етап промивання від ізопропанолу.

У збірник, що містить відфільтрований склероглюкан, подають дистильовану воду, для трьохетапного розчинення та промивання склероглюкану, від залишків спирту. При цьому необхідно контролювати рівень заповнення збірника, що має становити 75% (+/- 3%). Також, ще одним з параметрів, що піддаються котролю є швикість обертання перемішуючого пристрою (180 об/хв.)

1. Опис функціональної схеми автоматизації

У першому контурі автоматичного контролю і управління, в сушильній шафі необхідно контролювати та регулювати температуру, що має регламентоване значення 60⁰С.

Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (ресстрацією) цих змін в архіві. Для регулювання температури передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок дії нагріваючого присторою.

У другому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати і регулювати тиск пари всередині апарату (вакуум), який має регламентоване значення 0,01 МПа. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в архіві. Регуляція проводиться за рахунок відкачки повітря з апарату за дії насосу.

У третьому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати вологість продукту, щоб знати коли закінчити процес. Вологість кінцевого продукту має регламентоване значення 5%. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві. Коли значення вологості досягне заданого (5%) спрацює сигналізація.

У четвертому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати рівень рідини у збірнику з сигналізацією досягнення верхнього припустимого рівня і управління клапаном подачі рідини у збірник. У схемі буде використаний тільки один електрод, який встановлюється в точці яка відповідає верхньому припустимому рівню. Сигналізація про досягнення верхнього рівня передбачається на АРМі оператора-технолога.

При натисканні кнопки «Пуск» на моторі М2 відбувається перемішування в речовини в апараті із заданою частотою обертів.

Таблиця 10.1

Технологічні вимоги до системи автоматизації

п/п	Машина, апарат, агрегат	Параметр, місце відбору імпульсу	Значення параметру, допустимі відхилення	Система автоматизації		
				Вид системи автоматизації	Характер контролю, регулювання, управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
1	Вакуумна сушильна шафа	Температура	60 °С	Контроль Регулювання	Покази, реєстрація, стабілізація	АРМ оператора Вмикання/вимикання нагрівачого пристрою
2		Тиск	0,01 атм	Контроль Регулювання	Покази, реєстрація, стабілізація	АРМ оператора Вплив на відкачування повітря
3		Рівень вологи	5%	Контроль	Покази, реєстрація, сигналізація	АРМ оператора
4	Збірник	Рівень заповнення	75%± 3%	Контроль управління	Покази, запис, сигналізація	АРМ оператора Вплив на подачу води у збірник
5		Оберти перемішуючого пристрою	180 об/хв	Контроль, управління	Покази	Керування двигуном (дискретне)

Специфікація засобів автоматизації

Таблиця 10.2

Специфікація засобів автоматизації

Позиція	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Завод виготовлювач
1	2	3	4	5	6
1a	Температура	В агрегаті	Датчик термоперетворювач опору діапазон (-40 ...+180)°С, з уніф. вих. сигнал 4...20 мА	ТСМ-100	ООО "ФІРМА КОНТРАГЕНТ, Україна
16 26 56	Температура Тиск Рівень	На щиті	Електропневмоперетворювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
2a	Тиск	В агрегаті	Диференційний перетворювач тиску, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, під'єднання – 1/2NPT, клас точності – 0,075, вихідний сигнал аналоговий	PAD	Kobold
3a	Частотний пускач	На щиті	Частотний пускач, робочий струм 7А, управляючий сигнал 220В	MFC	SIEMENS
KM1 KM2	Магнітний пускач	На щиті	Магнітний пускач, робочий струм 7А, потужність двигуна 3кВт, управляючий сигнал 220В	3RT2015-1AP01	SIEMENS
SA1 SA2	Перемикач	На щиті	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний-ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією	3SB3210-2DA11	SIEMENS
SB1 SB2	Перемикач	На щиті	Двоклавішна кнопка станція «Пуск»-«Стоп» 1НО+1НЗ,	8LP2T B7113	Lovato

Закінчення табл. .2

1	2	3	4	5	6
3в	Тиск	По місцю	Регулюючий пневматичний клапан	Dwyer серія Hi-Flow 2001VA3 2-230-L0	СВ Альтера м. Київ
4а	Вологість	по місцю	Ємнісний датчик відносної вологості, діапазон вимірювань 0...100%, клас точності 2, показник інерції 2хв	ДВ УТ-02-НІН	ПАО „Тера”, Україна
5а	Рівень	В агрегаті	Контактний датчик рівня, з вихідним сигналом по напрузі	SITRNS L Pointek CLS 200	ДП «Сименс Україна» м.Київ
5в	Рівень	По місцю	Регулюючий пневматичний клапан	Dwyer серія Hi-Flow 2001VA3 2-230-L0	СВ Альтера м. Київ

Висновок: в результаті впровадження даних способів автоматизації виробництва, передбачається зменшення втрат при виробництві. Також очікується унеможливлення виникнення надзвичайних ситуацій (наприклад за допомогою автоматизації рівня заповнення збірника), економія електроенергії.

Список використаної літератури

1. *Natalia A. Castillo, Alejandra L. Valdez and Julia I. Fariña* Microbial production of scleroglucan and downstream processing // *Frontiers in microbiology*. – 2015. - 10.3389/fmicb.2015.01106.
2. *Jochen Schmid, Dirk Müller-Hagen, Thomas Bekel* Transcriptome sequencing and comparative transcriptome analysis of the scleroglucan producer *Sclerotium rolfsii* // - 2010. - 10.1186/1471-2164-11-329.
3. *T. Coviello, A. Palleschi, M. Grassi, P. Matricardi, G. Bocchinfuso, F. Alhaique*, Scleroglucan A Versatile Polysaccharide for Modified Drug Delivery // *Italy* – 2005. - 10.3390/10010006.
4. Политран (склероглюкан) [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://faq.surnet.ru/biotechnology/85728111.html>
5. *C. Mazzuca, G. Bocchinfuso, A. Palleschi, P. Conflitti* The Influence of pH on the Scleroglucan and Scleroglucan/Borax Systems // - 2017. - PMC6155179
6. *N. Jindal, J. Singh Khattar* Microbial Polysaccharides in Food Industry. – 2018. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/scleroglucan>
7. *Fengmei Zhu, Bin Du, Baojun Xu* A critical review on production and industrial applications of beta-glucans // - 2015. - S0268-005X(15)30012-6.
8. *Пирог Т. П.* Загальна мікробіологія: Підручник. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.:НУХТ.,2010 – 632 с.
9. *Івахнюк М.О., Гриценко Н.А.* Вплив умов культивування на синтез мікробних екзополісахаридів // Національний університет харчових технологій. – 2014. - 579.841: 577.114
10. *Shrikant A. Survase, Parag S. Saudagar, Rekha S. Singhal* Production of scleroglucan from *Sclerotium rolfsii* MTCC 2156 // *Food and Fermentation Technology Department, Institute of Chemical Technology, University of Mumbai, Matunga.* – India, 2005

11. *Schmid J, Meyer V, Sieber V*, Scleroglucan: biosynthesis, production and application of a versatile hydrocolloid // - 2011. - 10.1007/s00253-011-3438-5.
12. *Liamngee Kator, IZakki Yula Hosea and Onah Daniel Oche* Sclerotium rolfsii; Causative organism of southern blight, stem rot, white mold and sclerotia rot disease // *Annals of Biological Research*. – 2015. - 6 (11)
13. Органічна косметика. Інтерв'ю з Анастасією Ле Хак [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.mariannaboyko.com/2017/04/12/-organichna-kosmetyka-interv-yu-z-anastasiyeyu-le-hak/>
14. Соціально-економічне становище України за 2018 рік [Електронний ресурс] Режим доступу: http://www.ukrstat.gov.ua/druk/soc_ek/2018/publ_12_2018_u.html
15. Рост рынка косметики Украины: обзор 2018 года [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://marketing.rbc.ua/news/18.09.2018/10065>
16. Купуй українське: лучшие бренды натуральной косметики made in Ukraine [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://beauty.ua/skincare/body/850-kupuy-ukrainske-luchshie-brendy-naturalnoy-kosmetiki-made-in-ukraine>
17. *José Francisco Díaz-Nájera, Mateo Vargas-Hernández, Jaime Sahagún-Castellanos* Diagnosis and Integrated Management of Fruit Rot in Cucurbita argyrosperma, Caused by Sclerotium rolfsii // 1-11. – 2018. - <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.08.2017.018>
18. Косметика [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://madeinua.org/catalog/kosmetyka/>
19. SIP/CIP промышленные биореакторы 500Л-50М3 [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://ecolabmicrotex.ru/shop/solida-biotech/sip-cip-promyshlennye-bioreaktory-500l-50m3/>
20. *Viñarta S. C., Yossen M. M., Vega J. R., Figueroa L. I., Fariña J. I.* Scleroglucan compatibility with thickeners, alcohols and polyalcohols and

- downstream processing implications. – 2013. - Carbohydr. P. 92 1107–1115. 10.1016/j.carbpol.2012.10.065
21. Апарати мікробіологічної промисловості: навч. посібник / І. П. Данилов, С. І. Самійленко. Харків : НТУ «ХПІ», 2008. -272
22. Фільтри сталі емальовані під тиском [Електронний ресурс] Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/druk_filtr_ua.php
23. Друк-фільтри FitroDryer [Електронний ресурс] Режим доступу: https://tirit.org/reactor_him/nutch_filtrodryer.php
24. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://yos.com.ua/home/news/93-prom-oven.html>
25. *Martinez CO, Ruiz SP, Nogueira MT, Bona E, Portilho M, Matioli G.* Effective immobilization of *Agrobacterium sp.* IFO 13140 cells in loofa sponge for curdlan biosynthesis// *Molecules.*- 2015.- Vol. 20, № 2.-P. 7957–7973
26. *О. Є. Дудченко, В. М. Пешкова, О. О. Солдаткін, С. В. Дзядевич* Біосенсори для визначення деяких найпоширеніших вуглеводів. - *Sensor Electronics and Microsystem Technologies* 2014 – Т. 11, № 4
27. *М. Ф. Стародуб І. Канюк О. М. Шмирева* Мікроелектронні мультипараметричні біосенсори. – *Біотехнологія*, Т. 1, №1, 2008

Схема біосинтезу цільового продукту

Схема біосинтезу склероглюкану *S. rolfsii*, починаючи з реакцій катболізму ростового субстрату

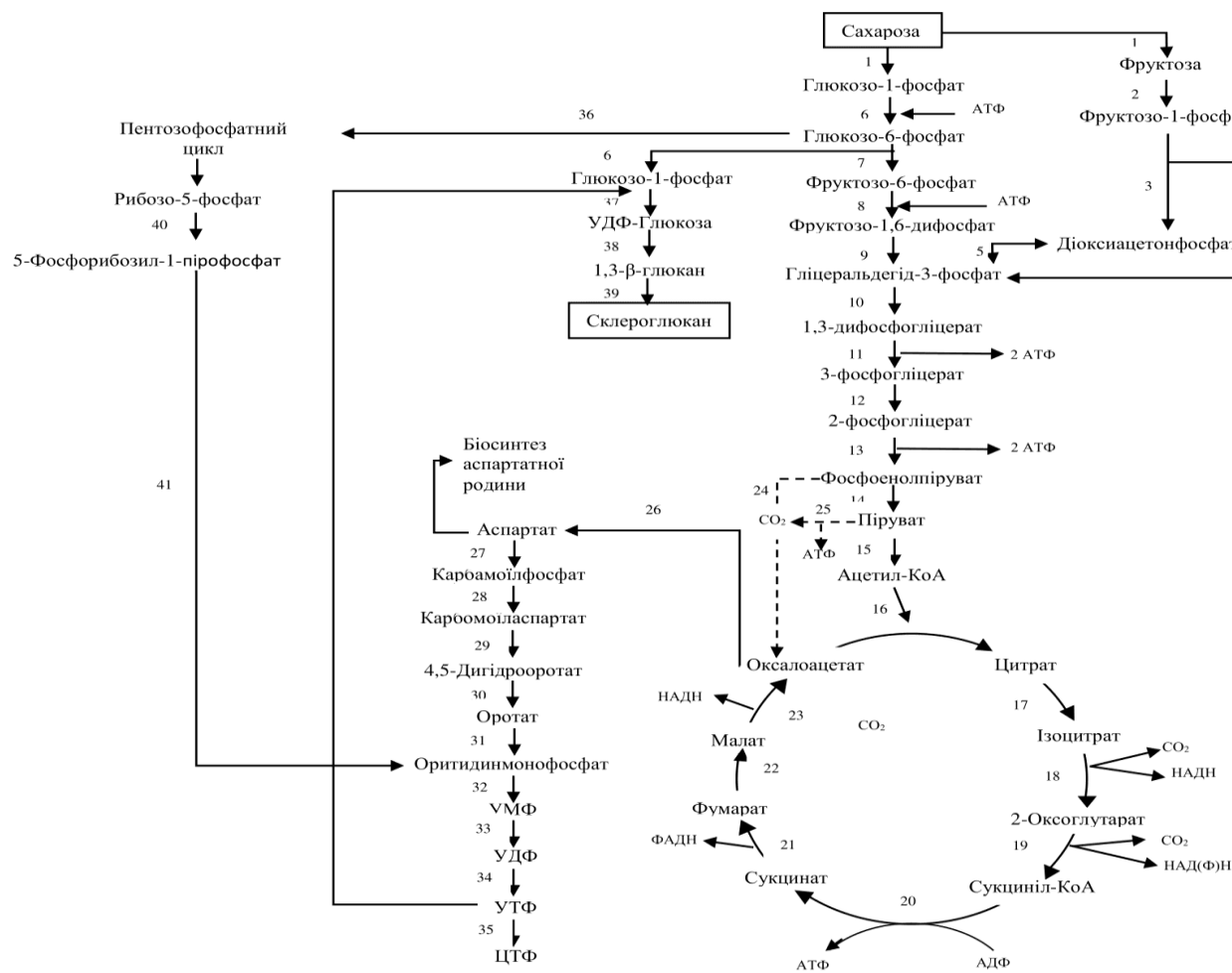


Схема біотрансформації сахарози в склероглюкан
 Умовні позначення: —> основний шлях біосинтезу; анаплеротичні реакції - ->
Ферменти: 1 – Сахарозофосфорилаза; 2 – Фруктокіназа; 3- Фруктозо-1-фосфатальдолаза; 4 - Триозофосфатізомераза; 5 – Триозокіназа; 6 – Фосфоглюкомутаза; 7 – 2-глюкозо- 6-фосфат ізомераза; 8 - 3-6-фосфофруктокіназа ; 9 – Фруктозобіфосфатальдолаза; 10 - Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа; 11 - Триозофосфатізомераза; 12 – Фосфогліцераткіназа; 13 - 2,3-біфосфогліцерат; 14 – Енолаза; 15 – Піруваткіназа; 16 – Цитратсинтаза; 17- Аконітаза; 18 – Ізоцитратдегідрогеназа; 19 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа; 20 – Сукцинаттіокіназа; 21 – Сукцинатдегідрогеназа; 22 - Фумараза; 23 – Малатдегідрогеназа; 24 - Фосфоенолпіруват-карбоксилаза (КФ 4.1.1.31); 25 - Піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1); 26 – Аспараткіназа; 27 - аспарат карбоамойлтрансфераза; 28 - Дегідрооротат дегідрогеназа; 29 - деоксицитидинтрифосфат деаміназа; 30 - Дегідрооротат дегідрогеназа (КФ 1.3.98.1) 31 - оротат фосфорибозилтрансфераза (КФ2.4.2.10); 32 - Оротидин-5-фосфат декарбоксилаза (КФ4.1.1.23); 33 – УМФ-УДФ-трансфераза (КФ2.7.4.14); 34 – Нуклеозиддифосфат кіназа (КФ2.7.4.6); 35 – ЦТФ-ситаза (КФ6.3.4.2); 36 – Глюкозо-6-фосфатізомераза; 37 – Уридилілтрансфераза; 38 – 1,3-β-Глюкозилсинтаза; 39 – Транс-Д-глюкозилсинтаза; 40 - рибозо-фосфат-пірофосфаткіназа; 41 - оротатфосфорибозил трансфераза; деоксицитидинтрифосфат деаміназа (КФ3.5.4.13);

цукрових кондитерських виробів (9,6%), напоїв (3,7%), м'яса та м'ясних продуктів (0,9%). У 2018р. вироблено 53,2 тис.т яловичини і телятини, свіжої чи охолоджені – туш, напівтуш, четвертин необвалених, 200 тис.т свинини свіжої чи охолоджені – туш, напівтуш (уключаючи оброблені сіллю чи консервантами для тимчасового зберігання), 404 тис.т курей, курчат (частин тушок) свіжих чи охолоджених, 242 тис.т виробів ковбасних та подібних продуктів з м'яса, субпродуктів чи крові тварин та подібних виробів і харчових продуктів на їхній основі (крім виробів ковбасних з печінок та страв готових), 27,6 тис.т овочів (крім картоплі), фруктів, горіхів, грибів та частин рослин істівних інших, приготовлених чи консервованих з додаванням оцту чи оцтової кислоти, 4,8 млн.т олії соняшникової нерафінованої та її фракцій (крім хімічно модифікованих), 487 тис.т молока та вершків незгущених й без додання цукру чи інших підсолоджувальних речовин жирністю більше 1%, але не більше 6%, у первинних пакуваннях об'ємом нетто не більше 2 л, 105 тис.т масла вершкового жирністю не більше 85%, 71,9 тис.т сиру свіжого неферментованого (недозрілого і невитриманого; уключаючи сир із молочної сироватки та кисломолочний сир), 96 тис.т сиру тертого, порошкового, голубого та іншого неплавленого, 2,3 млн.дал коньяку, бренді, 12,7 млн.дал горілки з вмістом спирту не більше 45,4%, 181 млн.дал пива солодового (крім пива безалкогольного і пива з вмістом алкоголю не більше 0,5%), 84,2 млн.дал води натуральної мінеральної газованої, 84,1 млрд. сигарет, які містять тютюн або суміші тютюну з заміниками тютюну.

У **текстильному виробництві, виробництві одягу, шкіри, виробів зі шкіри та інших матеріалів** індекс промислової продукції становив 95,4%, у т.ч. у текстильному виробництві – 95,6%, виробництві одягу – 96%, шкіри, виробів зі шкіри та інших матеріалів – 93,2%. За 2018р. вироблено 62,6 млн.м² тканин з ниток синтетичних та штучних комплексних високої міцності та з ниток стрічкових чи подібних, 1,3 млн. жіночих та дівчачих суконь трикотажних машинного або ручного в'язання, 311 тис. чоловічих та хлопчачих костюмів та комплектів (крім трикотажних), 706 тис. чоловічих та хлопчачих піджаків та блейзерів (крім трикотажних), 1,3 млн. жіночих та дівчачих жакетів та блейзерів (крім трикотажних), 52,7 млн. пар панчішно-шкарпеткових виробів інших (уключаючи шкарпетки).

У **виготовленні виробів з деревини, виробництві паперу та поліграфічній діяльності** випуск продукції збільшився на 1,1%, зокрема, в обробленні деревини та виготовленні виробів з деревини та корка – на 5,2%. Поряд із цим у поліграфічній діяльності, тиражуванні записаної інформації обсяг виробництва продукції зменшився на 0,6%, виробництві паперу та паперових виробів – на 1,7%.

На підприємствах із **виробництва коксу та продуктів нафтоперероблення** випуск промислової продукції зріс на 3,3%.

У **виробництві хімічних речовин і хімічної продукції** індекс промислової продукції становив 116,5%, у т.ч. у виробництві основної хімічної продукції, добрив і азотних сполук, пластмас і синтетичного каучуку в первинних формах – 130,3%, **фарб, лаків і подібної продукції, друкарської фарби та мастик – 97,8%**, мила та мийних засобів, засобів для чищення та полірування, парфумних та **косметичних засобів – 102,3%**. У 2018р. виготовлено 7,9 млн.дал спирту етилового неденатурованого із вмістом спирту не менше 80 об. %, 48,7 тис.т фарб та лаків, уключаючи емалі та політури, на основі складних полієфірів, диспергованих чи розчинених у легких органічних розчинниках (крім тих, які з вмістом розчинника більше 50% маси розчину), 10,9 тис.т мила та речовин поверхнево-активних органічних у брусках та подібних формах (крім **для туалетних цілей**), 193 тис.т розфасованих для роздрібно торгівлі засобів мийних та для чищення, які містять або не містять мило, уключаючи допоміжні засоби для миття, **6,7 тис.т засобів косметичних для макіяжу чи догляду за шкірою.**

У **виробництві основних фармацевтичних продуктів і фармацевтичних препаратів** обсяг виробленої продукції збільшився на 0,8%.

На підприємствах із **випуску гумових і пластмасових виробів, іншої неметалевої мінеральної продукції** індекс виробництва становив 98,8%, у т.ч. у виробництві гумових і пластмасових виробів – 102,1%, іншої неметалевої мінеральної продукції – 97,1%.

У **металургійному виробництві, виробництві готових металевих виробів, крім машин і устаткування**, випуск продукції залишився на рівні минулорічних обсягів. Поряд із цим у виробництві труб, порожнистих профілів і фітингів зі сталі спостерігалось зростання на 9,2%, готових металевих виробів – на 0,1%. Водночас у виробництві іншої продукції первинного оброблення сталі обсяг виробництва продукції зменшився на 8,2%, чавуну, сталі та феросплавів – на 1,4%, дорогіших та інших кольорових металів – на 1,7%. За 2018р. виплавлено 20,5 млн.т чавуну переробного і дзеркального у чушках, болванках чи формах первинних інших, вироблено 9,3 млн.т напівфабрикатів зі сталі нелегованої плоских, 6,7 млн.т зливків, форм первинних інших, напівфабрикатів для виробництва труб безшовних, зі сталі нелегованої, 11,3 млн.т прокату готового чорних металів, 222 тис.т труб обсадних, насосно-компресорних та бурильних для буріння нафтових і газових свердловин, безшовних, зі сталі іншої, крім неіржавної, 380 тис.т труб і трубок, круглого поперечного перерізу, підданих гарячій обробці, безшовних, зі сталі іншої, крім неіржавної.



CrossMark

Microbial production of scleroglucan and downstream processing

Natalia A. Castillo^{1,2}, Alejandra L. Valdez^{1,2} and Julia I. Fariña^{1,4*}

¹ Laboratorio de Biotecnología Fúngica, Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos-CONICET, San Miguel de Tucumán, Argentina, ² Cátedra de Micología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina, ³ Cátedra de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina, ⁴ Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Catamarca, San Fernando del Valle de Catamarca, Argentina

OPEN ACCESS

Edited by:

Kartik Chandran,
Columbia University in the City
of New York, USA

Reviewed by:

Johannes Schotten,
Synthetic Genomics Inc., USA
Jose M. Bruno-Barcena,
North Carolina State University, USA

*Correspondence:

Julia I. Fariña
jifarina@yahoo.com;
jifarina@proimi.org.ar

Specialty section:

This article was submitted to

Synthetic petroleum-based polymers and natural plant polymers have the disadvantage of restricted sources, in addition to the non-biodegradability of the former ones. In contrast, eco-sustainable microbial polysaccharides, of low-cost and standardized production, represent an alternative to address this situation. With a strong global market, they attracted worldwide attention because of their novel and unique physico-chemical properties as well as varied industrial applications, and many of them are promptly becoming economically competitive. Scleroglucan, a β -1,3- β -1,6-glucan secreted by *Sclerotium* fungi, exhibits high potential for commercialization and may show different branching frequency, side-chain length, and/or molecular weight depending on the producing strain or culture conditions. Water-solubility, viscosifying ability and wide stability over temperature, pH and salinity make scleroglucan useful for different biotechnological (enhanced oil recovery, food additives, drug delivery, cosmetic and pharmaceutical products, biocompatible materials, etc.), and biomedical (immunoceutical, antitumor, etc.) applications. It can be copiously produced at bioreactor scale under standardized conditions, where a high exopolysaccharide concentration normally governs the process optimization. Operative and nutritional conditions, as well as the incidence of scleroglucan downstream processing will be discussed in this chapter. The relevance of using standardized inocula from selected strains and experiences concerning the intricate scleroglucan scaling-up will be also herein outlined.

Keywords: scleroglucan, fermentation, bioreactor, optimization, non-conventional substrates, downstream processing

about some producing strains, the production processes and the methods of purification thereof (Halleck, 1967). Based on Halleck's work, Pillsbury Co. (Minneapolis, MN, USA) began scleroglucan commercialization under the name Polytran®. Since then, different companies entered into the scleroglucan market under different trademarks (Clearogel, Polytetran, Polytran FS, Sclerogum, and Actigum; Coviello et al., 2005).

SCLEROGLUCAN CHEMICAL STRUCTURE AND CONFORMATIONAL FEATURES

Scleroglucan is a high molecular weight (MW), non-ionic branched glucan. It consists in a backbone of (1,3)- β -linked D-glucopyranosyl residues bearing a single (1,6)- β -linked D-glucopyranosyl unit every three sugar residues of the main chain (Rinaudo and Vincendon, 1982; Fariña, 1997). The structure of this repetitive unit determines a degree of branching (DB) around 0.33 (Figure 1). Besides being a common feature among most biologically active β -(1,3)-glucans (Rinaudo and Vincendon, 1982; Bohn and BeMiller, 1995; Kim et al., 2000), this high branching frequency would also be responsible of the great water solubility of this polysaccharide. When dissolved in water at room temperature and low concentrations of alkali, usually below 0.15 M NaOH, it can be assumed that scleroglucan adopts a highly ordered, rigid, triple helical tertiary structure (Figure 1). Under this macromolecular conformation, protruding (1,6)- β -glycosidic side branching prevents the intermolecular approach by extensive H-bonding, which otherwise would lead to aggregated forms and precipitation (Fariña et al., 2001, 2009; Laroche and Michaud, 2007). Meanwhile, interstrand hydrogen bonding at the center of the triplex stabilizes the macromolecular structure (Atkins and Parker, 1968; Bluhm et al., 1982; Sletmoen et al., 2009). However, at higher NaOH concentrations, where drastic changes in viscosity are commonly observed, the triple-strand helices probably undergo the ionization of hydroxyl groups which thus disrupts hydrogen bonds and prompts the subsequent polysaccharide denaturation (Fariña et al., 2001; Viñarta et al., 2013a).

To deepen into the knowledge of this denaturation-renaturation process, Virgili Alemán (2011) monitored, by fluorescence resonance energy transfer (FRET) spectroscopy, the conformational changes of scleroglucan triplexes when exposed to different NaOH concentrations. This study revealed that

association to high intrinsic viscosities ($[\eta] = 9510\text{--}9610$ mL/g, for the triplex in water; Fariña et al., 2001). With reference to the degree of polymerization (DP), the reported values are variable from 110 for *Sclerotium glaucanicum* scleroglucan (Bielecki and Galas, 1991), 800 for a commercial scleroglucan (Bluhm et al., 1982), 500–1600 for related glucans (Sandford, 1979), 2400–2500 for *S. rolfsii* ATCC 201126 scleroglucan (Fariña et al., 2009) and up to 5600 for another cited scleroglucan (Rice et al., 2004).

A tendency to adopt a highly ordered, triple-helical conformation and semi-rigid structure in neutral aqueous solution, in association to high DP and MW ($\sim 5 \times 10^6$ Da) values, may account for the marked viscosifying ability, outstanding rheological behavior and the emerging scleroglucan successful applications (Yanaki et al., 1981; Brigand, 1993; Falch et al., 2000; Fariña et al., 2001; Viñarta et al., 2006, 2007; Giavasis, 2014).

A BRIEF PANE ON SCLEROGLUCAN PROPERTIES AND APPLICATIONS

Scleroglucan exhibits a range of distinctive physico-chemical properties that provide an advantage to itself over other polysaccharides, especially for the development of certain products and processes. Nevertheless, slight to great variations of these properties may be seen depending on the producing strain, the polymer production process and the downstream processing, facts that might modify the MW, DP, DB, conformational parameters, and/or the polymer purity grade, and so will determine its final potential applications. For instance, we reported that low concentrations (e.g., 2 g/L) of pure ($\sim 90\text{--}98\%$ EPS) *S. rolfsii* ATCC 201126 scleroglucan in water are able to yield highly viscous solutions with non-Newtonian, non-thixotropic and pseudoplastic behavior (Fariña et al., 2001, 2009; Viñarta et al., 2007).

Solutions of scleroglucan are notably stable over temperature up to 100–120°C, and within a broad range of pH (1–13). Additionally, the EPS neutral nature allows keeping pseudoplasticity even in the presence of a variety of salts, such as NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, and MnCl₂ (Fariña et al., 2001; Viñarta et al., 2013a). In contrast, slightly refined solutions (2 g/L) of commercial scleroglucans and crude polymer isolates from fermentation broths produce lower viscosity solutions with a lesser ability to retain stable rheological features when exposed to alkali, high temperatures, or salts (Wang and McNeil,

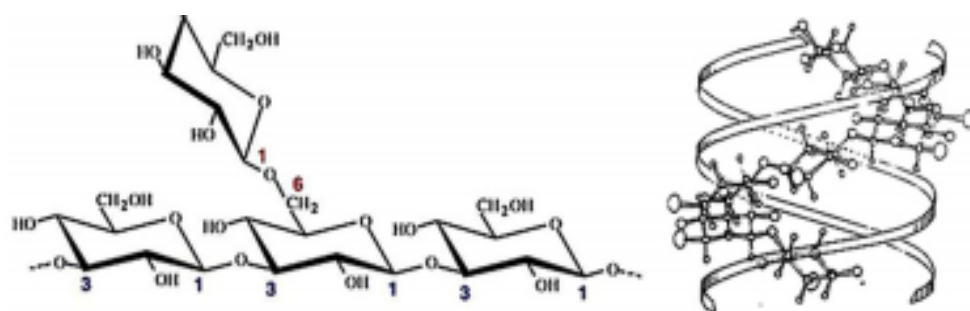


FIGURE 1 | (A) β -(1,3)- β -(1,6) glucan structure exhibiting the (3:1) side branching ratio of scleroglucan (Martin et al., 2007). **(B)** Tridimensional conformation of scleroglucan triple helix. Projection perpendicular to the fiber axis (Crescenzi et al., 1988).

1996; Viñarta et al., 2007, 2013a). Differences depending on the EPS purity grade were also found between Biopolymer CS6 (60–70% scleroglucan) and Biopolymer CS11 (85–90%; Survase et al., 2007a). Based on these and other outstanding scleroglucan properties, a wide spectrum of biotechnological and industrial applications has been proposed and evaluated up to date (Table 1).

Scleroglucan as triple helix exhibits the tendency to form thermo-reversible gels at low temperatures (close to 7°C), due to a weakly interacting triple-helix cross-linking mechanism (Bluhm et al., 1982; Biver et al., 1986). On the other hand, mimicking the behavior of other closely related β -(1-3)-D-glucans, scleroglucan triple helices can also be affected by denaturing conditions (e.g., pH \geq 13), where destabilization of the interstrand H-bonding leads to the dissociation into single stranded random coils (Deslandes et al., 1980; Norisuye et al., 1980; Bluhm et al., 1982; Yanaki and Norisuye, 1983; Ensley et al., 1994). Denaturation of triplexes may occur in alkaline solutions (\geq 0.25 M NaOH), in dimethylsulfoxide (DMSO; water weight fraction, WH < 0.13), or by increasing the temperature above the triple helix melting temperature ($T_m \cong 135^\circ\text{C}$; Fariña et al., 2001; Sletmoen et al., 2009; Viñarta et al., 2013a). Typically, denatured solutions show much lower or nil viscosity as compared to the triple helix-containing solutions. Nevertheless, under certain conditions, if denatured samples are taken to conditions that favor the restoration of the triple helical structure, circular structures might be observed by ultramicroscopy techniques among the “renatured triplexes” (Stokke et al., 1991, 1993; Sletmoen et al., 2009).

With regard to the scleroglucan biological properties, it was reported that its administration by diverse routes in rats and dogs did not induce toxicity, tissue pathology, or blood abnormalities. Neither eye nor skin irritation was detected in pigs, rabbits, and humans. Furthermore, scleroglucan role as an immune stimulant and a non-digestible dietary fiber for humans has been reported (Rodgers, 1973; Rapp, 1989; Giavasis, 2014). A wide range of physico-chemical, nutritional, and biological properties have been extensively described in the literature, and certainly are worth to mention. Relevant activities for health involve hypocholesterolemic, hypoglycemic, health-promoting

(Giavasis, 2014). A general overview of relevant polymer features and their actual or potential implications are depicted in Table 1.

REVIEWING THE KNOWLEDGE AND ADVANCES ON SCLEROTRUCAN PRODUCTION

To date, all scleroglucan production processes take place with a selected producing strain and under submerged aerobic conditions. This process is generally carried out in stirred-tank reactors using a sterile medium under aseptic management of the culture. Scleroglucan synthesis proceeds along with mycelial growth, so that the culture broth develops with time a gel-like consistency (Rodgers, 1973). A sharp drop in pH (\sim 2–2.5) is normally observed during the first 12–24 h of cultivation, mainly due to the accumulation of oxalic acid (Maxwell and Bateman, 1968; Fariña et al., 1998; Lee, 1998).

As aforementioned, changes in culture medium composition, process parameters or even the downstream processing may lead to dissimilar scleroglucan recovery and quality, with eventual variations in its chemical, physical, and/or biological properties. Therefore, in order to obtain high yields of a consistent polymer, it becomes essential to standardize a large-scale production process with a given strain under controlled conditions (Fariña et al., 1998; Survase et al., 2007a; Fazenda et al., 2008; Seviour et al., 2011a). A quite relevant step consists in selecting an appropriate producing strain, whose preservation procedure should be assessed and standardized, and its production ability must be monitored over time (Fariña et al., 1996; Survase et al., 2006; Schmid, 2008).

The nutritional requirements and culture conditions are commonly evaluated at minor scale (i.e., shake flasks) at the beginning of optimization, in order to maximize scleroglucan production and simultaneously reduce the accumulation of unwanted by-products, such as oxalic acid (Fariña et al., 1998; Schilling et al., 2000; Valdez, 2013). Following these essential studies, the scaling-up to bioreactor becomes a critical but difficult step, and this issue will be discussed later.

1998, 2009; see Effect of Other Factors). In addition, previous reports on fungal glucan synthetase activity demonstrated that the concentration of sucrose proved to be crucial for enzyme stability at 30°C (Leal et al., 1984; Finkelman and Vardanis, 1986).

Culture media with concentrations of glucose or sucrose (30–35 g/L) lower than that one (150 g/L) being optimal for *S. rolfii* ATCC 201126 have been reported by different authors, with a maximum production of 8.5–10 g EPS/L (Wang and McNeil, 1995d; Schilling et al., 2000). Nevertheless, the C-source requirements seem to be strain-specific. In this sense, it has been found for example that growth of *S. glaucanicum* is completely inhibited by sucrose concentrations above 45 g/L, which further limits the scleroglucan production (Wang and McNeil, 1994). On the other hand, similar to the effects of high sucrose concentrations in *S. rolfii* ATCC 201126 (Fariña et al., 1998), Survase et al. (2006) reported a maximum production of 16.5 g EPS/L with a sucrose concentration of 80 g/L.

in Figure 4.

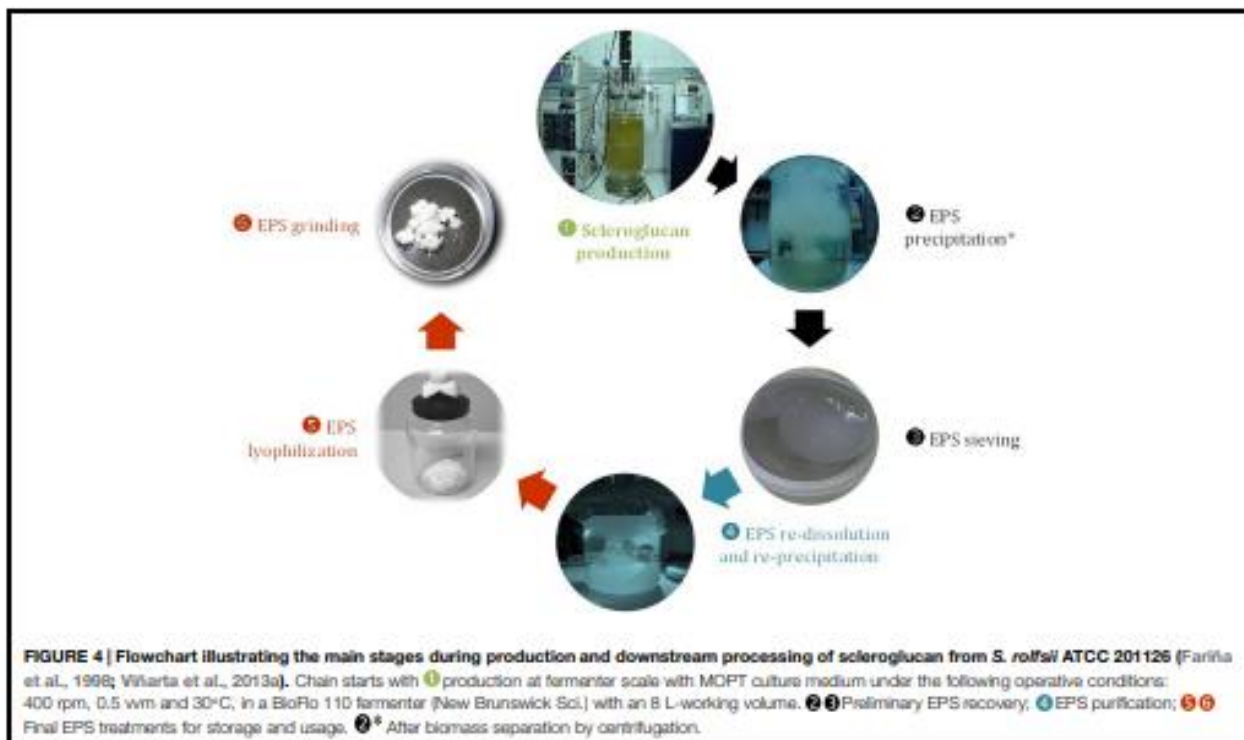
Concerning scleroglucan production optimization, our first studies in this field were performed by using the one-factor-at-a-time method, which consists in changing one variable (nutrients, pH, temperature, etc.) while fixing the others at certain arbitrary levels (Fariña et al., 1998). This technique was also successfully applied to other EPSs (Xu et al., 2003). Nevertheless, because of the great number of factors that are involved in the process, this method usually implies a large number of experiments, and thus results very laborious and time consuming, and not always guarantees the disclosure of optimal conditions (Survase et al., 2006). Different methods have been proposed in the literature

Effect of temperature

This parameter typically affects both culture growth and polysaccharide production. However, it has been reported that in batch cultures, maximum EPS biosynthesis is achieved at temperatures somewhat lower than the one for optimal growth rate. When the organism growth rate is decreased by reducing cultivation temperature, this may increase the availability of isoprenoid lipid carrier for non-growth functions, thus stimulating polysaccharide production (Wang and McNeil, 1996; Fosmer and Gibbons, 2011). Optimal biomass production usually occurs at temperatures above 28°C, while "optimum" temperature for scleroglucan formation was found to be ~28°C (Giavasis et al., 2005). Instead, below 28°C, by-product (oxalic acid) formation is gradually increased, so that at 20°C acid production may exceed biomass and EPS biosynthesis (Wang and McNeil, 1995b). In the case of *S. rolfii* ATCC 201126, the production process is commonly carried out at 30°C, obtaining optimal EPS yields.

Fermenter Configuration

Relatively little information is available on the influence of fermenter configuration on α - or β -glucan yields in fungi (McNeil and Harvey, 1993; Gibbs and Seviour, 1996; Wang and McNeil, 1996). Bioreactor architecture is mainly involved in the efficient homogeneous mixing of the culture, especially promoting heat, oxygen and other substrates mass transfer to the cells (Rau et al., 1992; McNeil and Harvey, 1993). STRs are the workhorse in the fermentation industry, and they are the most utilized at both research and industrial scale (Lawford and Rousseau, 1989; Kang et al., 2000).



Two configurations are the most commonly used for fungal fermentations: the continuous STR and the ALR, whose different principles of mixing represent a high- and low-shear regime, respectively (Seviour et al., 1992; Gibbs et al., 2000; Papagianni, 2004). Even though data are available in the public domain, it is difficult to separate the complex individual effects of shear/mixing/mass transfer or DO levels and biomass morphology on β -glucan production, mainly, because of the performed experiments were not conceived to differentiate between each effect.

A stirrer system that imparts a high shear stress upon the medium normally uses Rushton turbine impellers, which pump out the medium radially from the turbine (McNeil and Harvey, 1993; Wang and McNeil, 1996; Gibbs et al., 2000; Papagianni, 2004; Fazenda et al., 2008). Radial flow (turbine) impellers are efficient at achieving oxygen transfer by virtue of their ability to increase turbulence. Their efficiency is, however, counteracted by the negative effect of this shear intensive system on the "quality" of the isolated exopolymer. Product quality is a relative term that can only be properly defined in terms of the end-use application (Lawford and Rousseau, 1991). As stirrer speed augments in a high-shear configuration, oxygen and heat mass transfer rates increase whilst the mixing times decrease (McNeil and Kristiansen, 1987). Fungal morphology is often quite different from that seen in low-shear systems (Gibbs et al., 2000; Papagianni, 2004; Fazenda et al., 2008; García-Ochoa and Gómez, 2009).

In smaller laboratory fermenters, and particularly for polysaccharide fermentations, wall effects become significant. It is not unusual to see impellers turning at high rpm and stagnant broth a few inches away. Poor mixing, particularly near the walls, is worsened by the presence of excessive baffling, cooling devices, pH and dissolved oxygen probes, and sampling lines (Wernau, 1985). These difficulties have been frequently observed during scleroglucan production by *S. rolfii* ATCC 201126 (see below, Figures 5A,B).

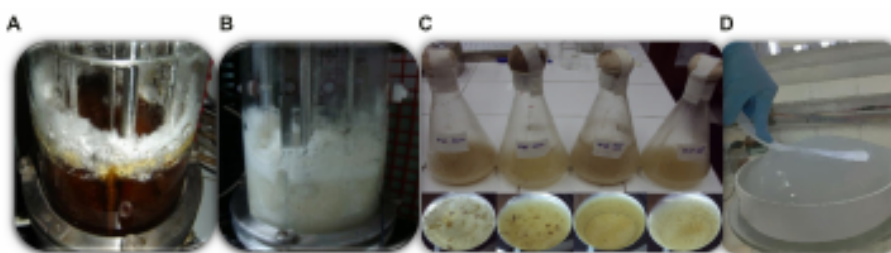
The most common configuration to work under low-shear conditions is the ALR, which uses differences in hydrostatic pressure or density in order to achieve a fluid mixing. Air is injected through a sparger into the bottom of a riser tube, decreasing the effective density of the medium there. As bubbles rise to the top, they are released into the headspace; the medium

becomes denser and it then descends to the vessel bottom via a downcomer or an external loop (McNeil and Harvey, 1993; Gibbs et al., 2000; Chisti and Jauregui-Haza, 2002; Papagianni, 2004; García-Ochoa and Gómez, 2009).

On the other hand, although less used, low-shear configurations in continuous STRs rely on modifications of the stirring systems and the impellers. Available low-shear impellers include axial flow and helical ribbon stirrers. The operation in both cases implies the pumping of the fluid from the top to the bottom of the fermenter at reduced liquid stress and against the airflow (Rau et al., 1992; McNeil and Harvey, 1993). For schizophyllan, a β -glucan similar to scleroglucan, EPS production reached higher values in fermenters with axial flow impellers than with helical ribbon stirrers (Rau et al., 1992).

The use of ALRs is being increasingly considered in fermentation industries instead of the traditional mechanically agitated bioreactor. Their design is mechanically simpler than the observed in STRs, and because of the absence of mechanical stirring, they are also less expensive to operate. Main advantages include low power inputs, relatively low shear, simple construction, and no moving mechanical parts, which additionally reduces contamination risks. Despite this, the comparatively low shear regime and lower oxygen transfer rates may represent difficulties at the time of cultivating filamentous fungi (Barker and Worgan, 1981; Blenk, 1985; Merchuk and Siegel, 1988; Allen and Robinson, 1989). These difficulties can be satisfactorily solved by the introduction of internal or external loops (Seviour et al., 2011b).

Higher EPS scleroglucan concentrations could be achieved with *S. glaucanicum* NRRL 3006 (Wang and McNeil, 1995d) in a 120-L ALR with an external loop in comparison with the classical STRs, probably by satisfying a low oxygen demand when using the ALR fermenter architecture. Similarly, Kang et al. (2000), investigated scleroglucan production in an ALR with an internal loop. They found that scleroglucan productivity obtained in this system was comparable to those achieved in ALRs with an external loop or in stirred-tank reactors, presenting the additional advantage of low equipment investment and operational costs (Kang et al., 2000). Despite the clear economic advantages that ALRs offer for scleroglucan industrial or lab-scale production, these systems are not commonly used, perhaps because the lack of knowledge in this bioreactor configuration of



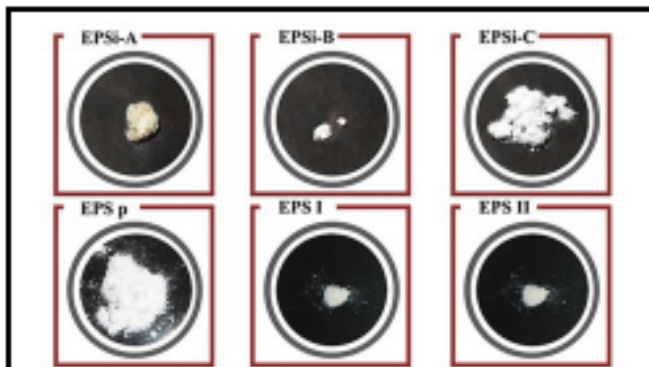


FIGURE 6 | Appearance of EPSs produced by *S. roffsii* ATCC 201126 at fermenter scale in MOPT culture medium and subsequently downstream processed. EPSi corresponds to scleroglucan precipitated with isopropanol after 1 (A), 2 (B), or 3 (C) re-dissolution/re-precipitation steps. EPSp illustrates the EPS precipitated with PEG. EPS I and EPS II correspond to ethanol-precipitated scleroglucans after 48 or 72 h of cultivation (Fariña et al., 1998; Viñarta et al., 2013b).

a high recovery of pure scleroglucan from diluted supernatants of *S. roffsii* ATCC 201126, from ~30% (with sucrose or molasses media) up to 50% (with corn starch medium), attenuates this disadvantage. Concerning the precipitation step for EPS recovery, different alcohols (ethanol 96°, isopropanol, and PEG) were tested (Johal, 1991; Fariña, 1997; Fariña et al., 2001; Viñarta et al., 2013b). Among them, we found that ethanol 96° and isopropanol allowed obtaining the highest recovery, high purity degree, finest appearance, optimal water solubility and remarkable rheological properties of EPS (Figure 6). In addition to the first precipitation step at the end of centrifugation, the inclusion of a three-step re-precipitation/re-dissolution cycle (Figure 4) with either ethanol or isopropanol, was the best methodology to achieve a refined-grade scleroglucan, suitable for example for biomedical testing (Fariña et al., 2001; Viñarta et al., 2013b).

hand, the *continuous culture* strategy, which consists in the uninterrupted addition of fresh culture medium whilst spent broth (containing part of the biomass and the product of interest) is simultaneously harvested, is not frequently used for EPS production (Rosalam and England, 2006). Nevertheless, this latter methodology has been eventually employed to study biochemical and physiological aspects related to some polysaccharide-production processes (Sutherland, 1982). In the case of scleroglucan, an alternative continuous culture process at lab and industrial-scale has been patented years ago (Maier, 2004).

Unfortunately, in contrast to batch-wise cultivation, continuous culture resulted not feasible under non-aseptic conditions, being less effective with regard to yield and product quality, as compared to batch cultures (Schilling, 2000). It may also be worthwhile to highlight that for some microorganisms such as the xanthan-producer *Xanthomonas campestris*, the continuous culture strategy might lead to the undesirable selection of poorly EPS-producing strains (Sandford, 1979).

In order to improve scleroglucan production by *S. glaucanicum* NRRL 3006, some researchers developed a *bi-staged process*. During the first phase of cultivation, pH was controlled at 3.5 with the aim of promoting optimal growth, and thereafter pH was raised up to 4.5 to favor polysaccharide biosynthesis. The second stage allowed achieving a 10% reduction of by-product (oxalic acid) formation, simultaneously with an increased scleroglucan concentration. This fact may reflect that pH levels (i.e., 4.5) higher than those for optimal growth prompt the carbon flux toward biopolymer synthesis (Wang and McNeil, 1995c). In a similar way, the chosen process temperature is often a compromise between the optimal temperature for growth and the one for EPS production. A bi-staged process of temperature could also be adopted for the improvement of polysaccharide synthesis at a second stage (Wu et al., 2010). The use of dual-stage production processes have been also successfully applied to other microbial polysaccharides in order to achieve different optimal conditions, either for growth or biopolymer synthesis (Zheng et al., 2013).