

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**  
**Інститут (факультет ) Біотехнології та екологічного контролю**  
**Кафедра біотехнології і мікробіології**\_\_\_\_\_

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ лютого \_\_\_\_\_ 2024 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ лютого \_\_\_\_\_ 2024 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: «Культивування *Penicillium canescens* для одержання ксиланази»

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1 \_

ТИХОМИРОВ Богдан Михайлович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент \_\_\_\_\_

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Я як здобувач Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав і не одержував недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач \_\_\_\_\_

(підпис)

Київ – 2024 р

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

**Завідувач кафедри**

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

«30» жовтня 2023 року

## **ЗАВДАННЯ**

### **НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

ТИХОМИРОВ Богдан Михайлович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Культивування *Penicillium canescens* для одержання ксиланази»

керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна, доцент.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від «6» листопада 2023 року № 915-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 29.01.2024

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Penicillium canescens*; цільовий продукт: ксиланаза; геометричний об'єм ферментера: 5 м<sup>3</sup>; коефіцієнт заповнення: 0,6

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

Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика

біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу; опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу;

контроль виробництва;

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу ксиланази - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема біосинтезу ксиланази - 2 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика цільового продукту</i>	<i>30.10.2023– 03.11.2023</i>	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>04.11.2023-12.11.2023</i>	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>13.11.2023-25.11.2023</i>	
4.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва</i>	<i>26.11.2023-03.12.2023</i>	
5.	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>04.12.2023-10.12.2023</i>	
6.	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>11.12.2023-24.12.2023</i>	
7.	<i>Контроль виробництва</i>	<i>25.012.2023-01.01.2024</i>	
8.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	<i>02.01.2024-14.01.2024</i>	
9.	<i>Оформлення графічної частини</i>	<i>15.01.2024-22.01.2024</i>	

**Здобувач**

\_\_\_\_\_

(підпис)

**Богдан ТИХОМИРОВ**

(ім'я та прізвище)

**Керівник роботи**

\_\_\_\_\_

(підпис)

**Вікторія КРАСІНЬКО**

(ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено розробці технологічної та апаратурної схеми біосинтезу ксиланази штамом *Penicillium canescens* 10-10с, який синтезує 126 ОД/мл ферменту. Ксиланаза використовується як ферментний препарат у годівлі сільськогосподарських тварин. Потужність виробництва становить 162 м<sup>3</sup> культуральної рідини на рік. Технологічний процес складається із допоміжних (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживного середовища, приготування та стерилізація титруючих розчинів) та основних робіт (вирощування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторі та посівному апараті, виробничого біосинтезу).

Кваліфікаційна робота викладена на 71 сторінках, містить, 6 таблиць, 3 креслення формату А1 (технологічна та апаратурна схеми) і список використаної літератури, який складається із 53 найменувань.

**Ключові слова:** ксиланаза, *Penicillium canescens*, фермент, поживне середовище, біосинтез.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА.....	9
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА .....	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування .....	11
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	12
2.2.1. Морфолого-культуральні ознаки .....	12
2.2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки <i>Penicillium canescens</i> 10-10с.....	14
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	14
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	15
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	15
3.2. Розрахунок потужності виробництва .....	17
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби продукту і геометричного об'єму ферментера .....	17
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу .....	18
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	20
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера .....	20
4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря.....	22
4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища .....	23
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	26
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	40
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА .....	50
7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів та процесу виробничого біосинтезу.....	50
7.2. Мікробіологічний контроль .....	54
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	55
7.3.1. Концентрація цільового продукту.....	55

7.3.2. Концентрація джерела вуглецю та азоту .....	55
<b>7.4. Визначення концентрації біомаси.....</b>	<b>57</b>
<b>РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....</b>	<b>58</b>
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місцях емісії твердих, рідких та газоподібних відходів .....	58
8.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	58
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів .....	59
8.2.2. Система знешкодження та утилізації газоповітряних відходів .....	59
8.2.3. Система знешкодження та утилізації твердих відходів .....	59
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....</b>	<b>60</b>

## ВСТУП

В останні десятиліття, у зв'язку з інтенсифікацією технологічних процесів і з розвитком нових технологій переробки рослинної сировини, з'явилася потреба в отриманні ферментних препаратів із заданими властивостями. У зв'язку з цим підвищився інтерес до міцеліальних грибів, як природних продуцентів гліколітичних ферментів .

Одним з ферментів, що знаходить все більше застосування в сучасній промисловості, є енд-1,4-ксилаза – фермент, який розщеплює головний ланцюг ксилана на ксилоолігосахариди .

Наявність великих ресурсів целюлози і геміцелюлози в рослинній біомасі робить все більш актуальною проблему залучення рослинних відходів сільського господарства і промисловості в процесі мікробної конверсії для отримання харчового і кормового білка і фізіологічно активних речовин [1-3].

Позитивний ефект від використання ксиланаз полягає в економії хімікатів та зменшенні забруднення навколишнього середовища.

Ксиланаза досить розповсюджений фермент, офіційна назва цих ферментів енд-1,4- $\beta$ -ксилази, але зазвичай використовуються синонімічні терміни: ксиланази, ендоксилази, енд-1,4- $\beta$ -D-ксилази,  $\beta$ -1,4-ксилази та ін.

**Актуальність теми.** Інтерес до ксиланаз стрімко зростає завдяки величезному потенціалу їх використання у сільськогосподарському виробництві та ряді галузей промисловості. Ксилани є найбільш поширеними геміцелюлозами, складають більше 30 % сухої ваги рослинної біомаси і займають друге місце за поширеністю після целюлози . В даний час промислове виробництво препаратів ксиланаз в нашій країні майже відсутня. На внутрішньому ринку присутні препарати ксиланази зарубіжних

					НУХТ БТЕК 05.01.17 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Тихомиров Б.М.			ВСТУП	Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив		Красінко В.О.						
Реценз.								
Н. контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
					Кафедра БТМ			

фірм і комплексні целюлолітичні ферментні препарати, в яких ксиланаза є супутнім ферментом. У зв'язку з цим розробка технології високоефективного ферментного препарату ксиланази для різних галузей, і створення виробництва на вітчизняних заводах є своєчасною і актуальною задачею.

**Новизною** роботи є використання в якості продуценту штаму *Penicillium canescens* 10-10с. Штам пропонується культивувати на гідролізаті ячмінної соломи як розчинну джерела поживних речовин і як індуктора виробництва ксиланази. Також зазначено потребу у цільовому продукті та розраховано на основі цього річних об'єм культуральної рідини та потужність виробництва. Здійснено підбір обладнання на основі розрахунків виробничих циклів для отримання річної потреби продукту і геометричного об'єму ферментера та на основі даних опису технологічної схеми із використанням гідролізату ячмінної соломи.

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Ксиланаза - фермент, який підвищує вихід білкових речовин, пігментів, крохмалю, пектину, цукристих і біологічно активних речовин за рахунок руйнування клітинних стінок рослинної сировини. Ксиланази є глікопротеїни з молекулярною масою 6-80 кДа. Ферменти активні в діапазоні температур 40-60°C та рН 4,5-6,5.

Ксилани (геміцелюлози) є одними з основних структурних компонентів клітинної стінки рослин і становлять приблизно третину відновлюваної рослинної біомаси на Землі. Це гетерополімери, які складаються з лінійного ланцюжка з'єднаних  $\beta$ -1,4-глікозидними зв'язками залишків D-ксилози, частково ацетильованих та мають у бічних ланцюгах замісники у вигляді залишків D-глюкуронової кислоти,  $\alpha$ -L-арабінози, ферулової та п-кумарової кислот [4].

Слід зазначити, що структура ксиланів суттєво залежить від виду рослин. Арабіноксилани входять до складу клітинної стінки м'якої (хвойний) деревини та злаків, тоді як глюкуроноксилян є складовою твердих (листяних) порід дерев. Головними компонентами комплексу ферментів, що здійснюють деструкцію ксиланів у природі, є ендо-1,4- $\beta$ -ксиланази, або просто ксиланази що каталізують невпорядкований гідроліз глікозидних зв'язків між залишками D-ксилози в основний ланцюг полімеру.

Основні сфери застосування ксиланази:

1. харчова промисловість: випікання хліба (покращення якості хліба) освітлення соків, отримання овочевих та фруктових пюре, екстракція кави, отримання крохмалю і олії).

2. спиртова та пивоварна промисловість: освітлення вин, покращення якості пива.

					НУХТ БТЕК 05.01.17 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Тихомиров Б.М.			РОЗДІЛ 1. Характеристика кінцевої продукції виробництва	Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив		Красінко В.О.						
Реценз.								
Н. контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
					Кафедра БТМ			

3. текстильна: очищення бавовняного волокна.
4. целюлозно-паперова: відбілюючий агент.
5. сільське господарство: кормові добавки , знищення агровідходів.

Одним із найперспективніших напрямів використання ксиланаз є кормовиробництво. Правильне годування худоби – запорука не тільки високої продуктивності, але і високої якості м'ясо-молочної продукції. Отримання необхідних поживних речовин разом з кормами, відрегульована їх кількість підвищить кількість різноманітної продукції, збільшить живу масу, що в результаті призведе до виробництва якісного молока та м'яса[5-7].

Щоб доросла велика рогата худоба відчувала себе добре і характеризувалася продуктивністю, господарі ферми складають збалансований раціон годівлі. У нього потрібно ввести соковиті і грубі корми, сіно або запаси соломи. Для розвитку і росту молодняку додають мінеральні підгодівлі (сіль), але комбікорм для корів та іншої худоби – це основа меню. Від характеристик такої їжі (відсутність на ній цвілі, отруйних грибів) залежить здоров'я стада. Комбікорм містить всі необхідні коровам речовини і мікроелементи .

Використання комбікорму для худоби дозволяє зробити годування ефективним і повноцінним, оскільки в комбікормі містяться поживні мінеральні речовини і вітаміни, які надають сприятливий вплив на тварин. Постійне застосування комбікорму в годівлі ВРХ підвищує надої на 20-25 %, відсоток жирності молока, тривалість лактації. Комбікорм позитивно впливає на імунітет, роблячи худобу стійкими до різних захворювань [8-10].

Ксиланаза дозволяє підвищити обмінну енергію корму на 5-7 %; підвищує засвоюваність амінокислот на 2-5 %; підвищує збереженість молодняку за рахунок зниження негативного впливу шкідливих речовин в кормах.

## РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Ксиланази синтезуються всіма організмами, включаючи бактерії, гриби, грибоподібні та деякі рослини. Особливо висока активність ксиланаз у всіх мікроорганізмах, що мають природну здатність розкладати рослинні полісахариди, такі як деревина, лушпиння зерна та інші рослинні залишки.

**Бактерії:** багато видів бактерій, зокрема *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces* та інші, можуть синтезувати ксиланази.

**Гриби:** Гриби, такі як *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* та інші, відомі своєю здатністю синтезувати ксиланази [4].

**Грибоподібні:** Деякі грибоподібні організми, такі як *Neurospora crassa*, також виробляють ксиланази.

**Рослини:** У деяких рослин, таких як дерево, ксиланази синтезуються як частина їх фізіологічних процесів, наприклад, під час росту кореневої системи або під час старіння тканини.

Враховуючи широке поширення цих організмів, ксиланази можна отримати шляхом культивування відповідних мікроорганізмів або з використанням рекомбінантної ДНК-технології для виробництва цих ферментів у великій кількості.

*Penicillium* - рід аскоміцетів, що належать до родини *Aspergillaceae* порядку *Eurotiales*. Один із найпоширеніших у світі родів грибів, представники якого зустрічаються в різних місцях — у ґрунті, на рослинах, у повітрі, у приміщенні, на продуктах харчування, у морях. В даний час рід налічує 350 видів [6].

					НУХТ БТЕК 05.01.17 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Тихомиров Б.М.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив		Красінько В.О.						
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

1. Продуктивність: *Penicillium canescens* відомий своєю високою продуктивністю ксиланази. Гриби цього виду виробляють значні кількості цього ферменту, що робить його ефективним джерелом для отримання ксиланази [6].

2. Комерційний потенціал: Ксиланаза, яку виробляє *Penicillium canescens*, має широкі застосування в промисловості. Вона використовується для біопереробки рослинних матеріалів, покращення якості кормів для тварин, виробництва біопалива і багатьох інших біотехнологічних процесів. Тому культивування *Penicillium canescens* для отримання ксиланази може мати значний комерційний потенціал.

3. Дослідницькі можливості: *Penicillium canescens* вивчається в деталях, і відомо багато про його генетичні властивості та метаболічні шляхи. Це робить його привабливим об'єктом для досліджень і у подальшому.

В якості найближчого штаму до обраного *Penicillium canescens* 10-10с розглядається штам гриба *R.canescens* ВКПМ F-832, який є продуцентом секретованої ендо-(1-4)-бета-ксиланази. Цей штам накопичує до 770 одиниць активності секретованої ендо-(1-4)-бета-ксиланази в 1 мл культуральної рідини. Недоліком штаму ВКПМ F-832 є наявність у нього сателітної целюлолітичної активності (1,4 ed/ml), яка підтримує використання ферментного препарату ксиланази на основі цього штаму [8].

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

### **2.2.1. Морфолого-культуральні ознаки**

Мікроорганізм *Penicillium canescens* 10-10с є продуцентом ферменту ксиланази. Штам росте на різних агаризованих та рідких середовищах.

На сусло-агар, що має склад (в мас.%): сусло - 40, агар - 2, вода - інше, штам утворює колонії діаметром 6.5-7.5 см, зворотний бік яких оранжево-темно-коричнева; конідиєносці розміром 430-450×3.0-3.2 мкм, конідії 2.0-2.2 мкм, кулясті, в молодому віці гладкі, в старому - шорсткі, утворюються в ланцюжках, з'єднуються в колонки, що згодом розпадаються [11].

На агаризованому середовищі Роулена-Тома з сахарозою, що має склад (в

мас.%): сахароза - 2, кукурудзяний екстракт - 1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0.2,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  - 0.02,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0.02, агар - 2, суміш мікроелементів  $5\text{H}_2\text{O}$  - 0.008,  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  - 0.04,  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0.0088,  $(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  - 0.01,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0.1,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 0.006,  $(\text{NH}_4)_3\text{Mo}$  - решта, діаметр колоній 3.8-4.8 см, колонії повстяні або слабопухнасті в центрі, слабоопуклі, з радіальними борозенками, білого кольору, по краях пофарбовані в сіро-блакитний тон, краї нерівні, лопатеві, зворотний бік сіро-бежевого тону.

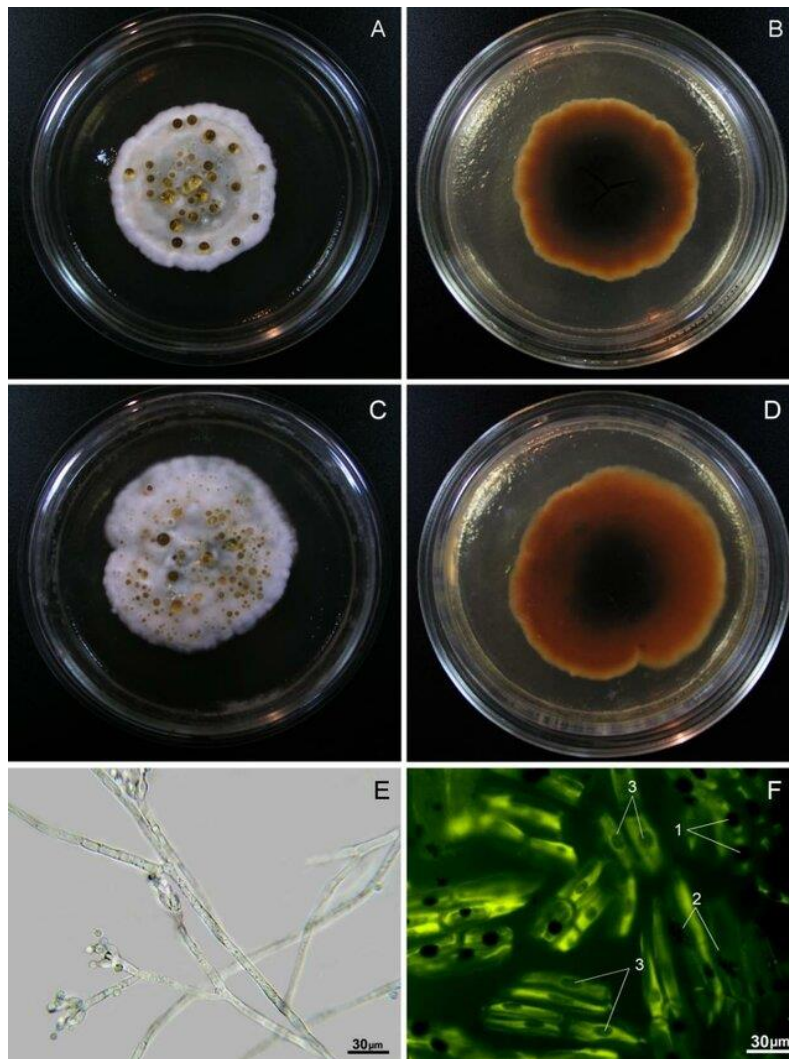


Рис. 2.1. Колонії грибів *Penicillium canescens* на середовищі Чапека (А-В) та на середовищі Чапека з екстрактом листя *Fagus sylvatica* (С-Д), 10 день, температура 25°C, конідієносці гриба (Е), аутофлуоресценція цитоплазми клітин апікальної меристеми цибулі, вирощеної в умовах букових насаджень (F): 1 – поглинання світла хроматином нормального ядра, 2 – деградація хроматину, 3 – серцевина із

залишками хроматину [12].

На агаризованому середовищі Чапека з глюкозою, що має склад (в мас.%):  $\text{NaNO}_3$  - 0.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0.1,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0.05,  $\text{KCl}$  - 0.05,  $\text{FeSO}_4$  - 0.001, глюкоза - 2, агар - 2, вода діаметр колоній 2.8-4.0 см, колонії сірі, складчасті, з рівним краєм, конідіоутворення інтенсивне, колір конідій світло-сірий. Зворотний бік колоній з радіальними складками слабо-кремового тону.

### 2.2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки *Penicillium canescens* 10-10с

Мезофіл росте при 25-37°C, оптимальна температура росту 29°C. Оптимум зростання значення рН середовища 4.1-5.8. Желатину розріджує слабо. Ставлення до джерел вуглецю. Добре засвоює моно-, ді- та полісахариди, за винятком арабінози, яку утилізує слабо [13].

Ставлення до джерел азоту. Добре засвоює амонійний та нітратний азот, пептон, сечовину.

### 2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Рід *Penicillium* мають таке систематичне положення [14]:

Домен	<i>Eukaryota</i>
Царство	<i>Fungi</i>
Відділ	<i>Ascomycota</i>
Клас	<i>Eurotiomycetes</i>
Підклас	<i>Eurotiales</i>
Родина	<i>Aspergillaceae</i>
Рід	<i>Penicillium</i>
Вид	<i>canescens</i>
Штам	10-10с

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1. Потреба у цільовому продукті

Ферменти – це речовини білкової природи, які здатні змінювати швидкість біохімічних процесів в організмі. Іншими словами, це каталізатори біохімічних процесів, що сприяють розщеплюванню, або синтезу речовин в організмі з продуктів розпаду. Перш за все, їх застосування значно здешевлює корми (до 10%) і покращує їх засвоєння організмом.

Застосування ферментних препаратів у годівлі сільськогосподарських тварин має важливе значення. Приблизно 25-30% органічних речовин не перетравлюються, хоча травні залози тварин виробляють достатню кількість пепсину, трипсину, амілаз, ліпаз та інших травних ферментів. Вагому роль відіграє додавання до раціону ферментів молодняку, у якого ферментативні системи травлення недостатньо розвинені.

Ферменти на відміну від гормонів і біостимуляторів мають інший механізм впливу на організм тварин, при цьому вони не накопичуються в організмі й продуктах тваринництва і не входять до складу кінцевих продуктів. У травному каналі тварин і птиці виробляються власні ферменти, за допомогою яких і відбувається перетравлення поживних речовин кормів. Дорослі тварини можуть перетравлювати до 60-70 % поживних речовин корму, хоча травні залози виробляють достатню кількість пепсину, трипсину, амілази, ліпази та інших травних ферментів. Відомо, що молодняк тварин народжується із недорозвиненою ферментною системою травлення.

У ряді випадків більш ефективним вважається застосування кормових ферментних препаратів, що містять целюлазу, ксиланазу у поєднанні з препаратами,

					НУХТ БТЕК 05.01.17 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Тихомиров Б.М.				РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив	Красінько В.О.							
Реценз.								
Н. контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							
					Кафедра БТМ			

що містять фітазу, а-амілазу, протеазу і пектиназу. На відміну від ячменю і вівса, пшениця, тритікале та жито містять невеликі кількості клітковини, а клітинні стінки їх ендосперму складаються на 75-80 % з арабіноксиланів і на 20-25 % – з Р-глюканів, тому в кормові раціони на їх основі необхідно включати кормові ферментні препарати з високим вмістом ксиланази, меншим – целюлази і р-глюканази [15].

За даними Державної служби статистики України у 2020 році в вирощено усіма категоріями господарств 220463,2 тис. голів птиці [16]. Аналізуючи видовий склад птиці, слід зазначити, що у господарствах усіх категорій найбільше утримують курей, їх кількість у 2020 р. становила 183 543,0 тис [17]. Племінних курей крос «Кобб-500» розводять у Київській та Черкаській областях, а крос «Росс-380» поширений у Волинській, Запорізькій та Київській областях. В Київській області розводять також крос «Хай Лайн W 36», поголів'я яких у 2020 році становило 88,9 тис. голів (2,7% від загальної кількості поголів'я в Україні) [18].

Розглянемо використання ферментного препарату кормової добавки «Ронозим WX» [19], основний компонент якого є ксиланаза. Розрахунок буде проводитися для курей крос «Хай Лайн W 36». Оскільки не обов'язково всі господарства можуть користуватися кормовими добавками саме із ксиланазою, буде розрахована потреба на 40% поголів'я «Хай Лайн W 36»:

$$88\ 900 \times 0,75 = 36\ 423 \text{ голів}$$

Згідно дослідженню, яке враховувало різну потребу корму для курчат бройлерів в залежності від періоду вирощування (1–10 доба, 11–22 і 23–42 діб), витрата корму за весь період вирощування на 1 голову складає в середньому 4,67 кг [20]. Сумарна кількість спожитого корму становить:

$$36\ 423 \times 4,67 = 170\ 100 \text{ кг}$$

Загальні рекомендації щодо дозування препарату «Ронозим WX» 100 - 200 г/тонну (0,1 - 0,2 кг) корму, отже, на 170 100 кг потрібно:

$$170\,100 \times 0,1 \text{ кг} = 17\,010 \text{ кг}$$

В 1 грамі (0,001 кг) препарату «Ронозим WX» міститься 1000 одиниць ксиланази, таким чином у 17 010 кг препарату буде міститися:

$$(17\,010 \times 1000) / 0,001 = 1,701 \times 10^{10} \text{ Од ксиланази}$$

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

Оскільки вихід ксиланази становить 126 Од/мл (126 000 Од/л), а потреба в ферменті складає  $1,701 \times 10^{10}$  Од на рік, то розрахуємо об'єм культуральної рідини за рік:

$$V_{\text{к.р. річ}} = 1,701 \times 10^{10} \text{ Од} / 126\,000 \text{ Од/л} = 135 \times 10^3 \text{ л} = 135 \text{ м}^3$$

Окрім цього, нам необхідно врахувати втрати, які можуть виникнути в процесі виробництва, вони становлять 20%, отже, з урахуванням втрат річний об'єм культуральної рідини становитиме:

$$V_{\text{к.р. річ}} = 135 \times 1,2 = 162 \text{ м}^3$$

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

1. Приймаємо кількість робочих днів на рік – 300.

Ефективний фонд робочого часу  $N_{\text{еф}} = 300 \times 24 = 7200 \text{ год}$ .

2. Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{др}} = 14 + 120 = 134 \text{ (год)}, \text{ де}$$

$T_{\text{ф}}$  – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

$T_{\text{др}}$  – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: миття та огляд (4 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (1 год), вивантаження культуральної рідини (1 год)).

3. Кількість циклів за рік становитиме:

$$n_{\text{ц}} = N_{\text{сф}} / T_{\text{цф}} = 7200 / 134 = 53,7 \approx 54$$

4. Об'єм культуральної рідини, який треба одержати за цикл:

$$V_{\text{к.р. цикл}} = V_{\text{к.р. річ}} / n_{\text{ц}} = 162 / 54 = 3 \text{ м}^3$$

Обираємо ферментер об'ємом  $5 \text{ м}^3$  із коефіцієнтом заповнення 0,6.

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробниче культивування *Penicillium canescens* відбувається у ферментері об'ємом  $5,0 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення 0,6. Розрахуємо робочий об'єм ферментера згідно формули:

$$V_{\text{роб}} = 5,0 \cdot 0,6 = 3,0 \text{ м}^3.$$

Доза посівного матеріалу дорівнює 10% саме від об'єму поживного середовища. Таким чином, для отримання  $3,0 \text{ м}^3$  культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб.1}} = 3,0 \cdot 0,1 = 0,3 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту звісно можна отримати під час культивування в інокуляторі об'ємом  $0,5 \text{ м}^3$ .

Для одержання  $0,3 \text{ м}^3$  культуральної рідини необхідно:

$$V_{\text{роб.2}} = 0,3 \cdot 0,1 = 0,03 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Дану кількість посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування бактерій у посівному апараті об'ємом  $0,05 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення 0,6.

$0,03 \text{ м}^3$  (30 л) культуральної рідини можна отримати з використанням

$$V_{\text{роб.3}} = 30 \cdot 0,1 = 3,0 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування даної кількості інокуляту можна отримати шляхом культивування *Penicillium canescens* 10-10с у колбах на качалці.

Таким чином, процес одержання посівного матеріалу необхідного для виробничого біосинтезу ксиланази у ферментері об'ємом  $5,0 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення  $0,6$  та буде відбуватися у 3 етапи.

## РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

При культивуванні аеробних мікроорганізмів необхідно забезпечити велику поверхню контакту між поживним середовищем і киснем повітря, оскільки при глибокому культивуванні (біосинтезі) в рідких середовищах мікроорганізми застосовують розчинений у середовищі кисень. У той же час розчинність кисню у воді низька, необхідно постійно аерувати - подавати кисень у всю товщу рідкого середовища для збільшення росту аеробних мікроорганізмів. В результаті живильне середовище насичується киснем повітря та утворюються для розвитку аеробів сприятливі умови [21-23].

Глибинному культивуванню притаманно ряд переваг по відношенню до поверхневої культивування: покращення санітарно-гігієнічних умов роботи; скорочуються виробничі площі; появляється можливість автоматизації технологічного процесу; легкість одержання ксиланази з культуральної рідини; можливість проведення процесу безперервного культивування.

Глибинне культивування мікроорганізмів буває безперервним та періодичним. При періодичному режимі культивування весь об'єм живильного середовища засівають посівною культурою, а культивування здійснюють в нормальних умовах протягом відведеного часу до скупчення необхідної кількості цільового продукту. При цьому режимі протягом усього періоду культивування безперервно змінюються швидкість вирощування культури, її біохімічні, фізіологічні та морфологічні показники [24].

Періодичне культивування використовують у багатьох галузях промисловості на основі життєдіяльності мікроорганізмів. Основним недоліком на сьогодні даного

					НУХТ БТЕК 05.01.17 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Тихомиров Б.М.				Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив		Красінко В.О.						
Реценз.					РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми			
Н. контр.					Кафедра БТМ			
Затверд.		Стабніков В.П.						

виду культивування є циклічність і постійна зміна умов біосинтезу, який надто ускладнює контроль і регулювання параметрів стадій процесу і призводить до витрат часу на проходження всіх 3-х стадій вирощування культури, а також періоду найбільшої активності. фаза - фаза логарифмічного зростання – займає про те надто невелику частинку виробничого циклу. Цих недоліків позбавлений метод безперервного вирощування [25].

Безперервне вирощування. Метод безперервного культивування мікроорганізмів прогресивніший і набуває все більшого значення в промисловій біотехнології. Суть методу полягає в підтримці постійних умов зовнішнього середовища, а отже, і культури мікроорганізмів у певному, найбільш активному фізіологічному стані.

Так як періодичне культивування являється доволі перевіреним досвідом методом, тому вважаємо, що це є найкращим варіантом для нас. Періодичний процес отримання ксиланази при вирощуванні найбільш продуктивних штамів *Penicillium canescens* 10-10с, обраний в якості прототипу, який використовували для синтезу продукту при вирощуванні *Penicillium canescens* 10-10с, який характеризується тим, що виконується одноразове завантаження середовища в ферментер, інокуляція посівним матеріалом, культивування при аерації і перемішуванні протягом 10 годин до досягнення величини рН 6,5 і нижче [26].

Весь процес повинен проводитися в суворо, навіть можна наголосити, що в надто суворих асептичних умовах. З одного боку, являється перевагою методу, але якщо взяти до уваги інший бік, то становить найбільшу технічну складність, найменше порушення асептики через недотримання режим або недосконалість обладнання іноді призводить до повної зупинки утворення ферменту. До того ж кожні дві години біосинтезу з ферментера беруть декілька проб культуральної рідини з метою мікробіологічного контролю та з'ясування концентрації живих клітин [27-28].

Виробниче культивування *Penicillium canescens* відбувається у ферментері об'ємом 5,0 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,6. Для здійснення процесу культивування на цій стадії необхідно підібрати обладнання об'ємом 5 м<sup>3</sup>, яке задовольнить всі необхідні зазначені вимоги – аерування середовища за допомогою барботеру,

гомогенізацію середовища встановленою мішалкою, контроль температури, рН, розчиненого кисню, швидкості обертів відповідними датчиками, якими конструкційно має бути обладнаний ферментер.

Щоб задовольнити ці вимоги, буде використаний ферментер під замовлення за нашими потребами від компанії «Bioengineering AG», оскільки ця компанія реалізує виготовлення біотехнологічного обладнання ємністю від 30 до 25 000 літрів з типовою геометрією відношення висоти до діаметру  $h : d = 2 : 1$  [29].

#### **4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря**

*Penicillium canescens* 10-10с – аеробний мікроорганізм, відповідно, процес культивування необхідно забезпечувати розчиненим киснем. Для відповідності умовам асептичності, повітря, що подається, має бути попередньо обробленим та стерильним. Етапи підготовки повітря наступні:

- Забір атмосферного повітря. Проведення забору атмосферного повітря виконується за допомогою аерозабірника, розташованого на висоті 30 метрів. Забір повітря проводиться в зоні, віддаленій від викидів технологічних шкідливих речовин, в області чистого атмосферного середовища.

- Грубе очищення. Процедура грубого очищення атмосферного газу важлива для ефективного вилучення грубого аерозолі, такого як пил та великі частки, які можуть призвести до підвищення ризику забруднення. Зазвичай використовують фільтри, що виготовлені з волокнистих матеріалів, які утримують частки та пил на своїй поверхні.

- Стабілізація показників повітря. Стабілізація термодинамічних характеристик є обов'язковим етапом для стиснення повітря та пониження вмісту вологи. Після проходження грубого очищення, повітря подається в компресор, де його стискають, що призводить до підвищення температури на вході на 15-25 градусів Цельсія. Температура газу на виході може досягати 250 градусів Цельсія. Потім газ потрапляє в теплообмінник – охолоджувач. Наступним етапом є ресивер, який необхідний для

стабілізації потоку атмосферного газу та може служити як резервуар газу в разі різких змін об'єму потоку.

- Попередня очистка повітря. Попередня обробка атмосферного повітря в основному фільтрі виконується з метою утримання частинок розміром  $>1$  мікромметр за допомогою фільтруючого матеріалу. Заміну матеріалу в таких фільтрах рекомендується проводити двічі на рік.

- Очистка повітря в індивідуальному фільтрі. Обробка атмосферного повітря у індивідуальному фільтрі виконується для утримання частинок розміром  $>0,2$  мікромметра. Індивідуальні фільтри забезпечуючи ефективність очищення на рівні  $E = 99,999\%$ .

#### 4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

З метою збільшення виходу ксиланази при глибинному вирощуванні продуцента *Penicillium canescens* 10-10с на синтетичному середовищі вирощування виробляють на середовищі складу [30]:

- гідролізат ячмінної соломи – 100,0 г/л,
- дріжджовий екстракт – 5,0 г/л;
- гідрофосфату натрію ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) – 10,0 г/л;
- хлорид калію (KCl) – 0,5 г/л;
- сульфат магнію ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) – 0,15 г/л;
- рН 6,5.

Вирощування *Penicillium canescens* 10-10с в ферментері ємністю 5,0 м<sup>3</sup>, коефіцієнт заповнення 0,6. Враховуючи температурні режими стерилізації та можливе утворення фосфатних осадів, поділ на композиції здійснюється наступним чином:

**Композиція I:** гідролізат ячмінної соломи (режим стерилізації: 121 °С (0,075 МПа), 30 хв);

**Композиція II:** дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С (0,05 МПа), 30 хв);

**Композиція III:**  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , KCl (режим стерилізації: 131 °С (0,15 МПа), 40

хв);

**Композиція IV:**  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (режим стерилізації: 131 °С (0,15 МПа), 40 хв).

Окремо здійснюється підготовка гідролізату ячмінної соломи, а саме таким чином: 100 г подрібненої ячмінної соломи обробляють 1000 мл дистильованої води при 100 °С протягом 3 годин і при 121 °С протягом 30 хвилин. Рідку фракцію відокремлюють центрифугуванням і використовують як розчин джерела вуглецю.

Обґрунтуємо послідовність операцій та режими його приготування до проведення біосинтезу.

*Приготування.* Дріжджовий екстракт попередньо розводять питною водою (1:2, але краще 1:1). Для нагрівання середовищ використовують глуху пару (теплообмін відбувається через стінку) або гарячу воду подачею їх у рубашку апарату.

*Стерилізація.* Вибір режиму стерилізації речовини визначається за температурою її розкладання, тому усі компоненти середовища поживного середовища необхідно розподілити на окремі композиції, враховуючи їх термолабільність, а також враховуючи можливість утворення нерозчинних осадів компонентів в процесі нагрівання.

У середовищі є термолабільний компонент (дріжджовий екстракт), то їх готують окремо. Можна всі солі розчиняти разом, але перед стерилізацією довести рН = 4,0–4,5.

Для біосинтезу аеробного мікроорганізму *Penicillium canescens* 10-10с вибрано періодичне глибинне культивування, яке має мати такі умови: час – 120 годин, температура – 28-30 °С, інтенсивність аерації 1 л/л·хв, інтенсивність перемішування – 200 об/хв, рН = 6,0-6,1 (до такого показника доводять 15%-м розчином натрію гідроксиду після завершення стерилізації).

Розглянемо підготовку компонентів по кожному етапу культивування:

- Для вирощування інокуляту в колбах на качалках. Підготовка композицій II, III, IV відбувається у колбах, стерилізація відбувається у автоклаві. Композицію I, гідролізат ячмінної соломи, необхідно попередньо обробити, протягом 3 годин і при

121 °С протягом 30 хвилин у автоклаві. Рідку фракцію відокремлювали центрифугуванням і використовували як розчин джерела вуглецю.

- Для вирощування у посівному апараті об'ємом 50 л.

Композицію I гідролізат ячмінної соломи змішували із водою та обробляли протягом 3 годин і при 121 °С протягом 30 хвилин у реакторі об'ємом 30 л.

Композицію II (дріжджовий екстракт) готують у колбі та стерилізують за режиму 112 °С (0,05 МПа), 30 хв.

Композицію III і IV готують та стерилізують разом у колбі та стерилізують у автоклаві за режиму 131 °С (0,15 МПа), 40 хв. Значення рН композиції доводять до 4,0-4,5 сульфатної кислотою перед стерилізацією.

- Для вирощування у посівному апараті об'ємом 500 л.

Композицію I гідролізат ячмінної соломи змішували із водою та обробляли протягом 3 годин і при 121 °С протягом 30 хвилин у реакторі об'ємом 350 л.

Композицію II (дріжджовий екстракт) готують у колбі та стерилізують за режиму 112 °С (0,05 МПа), 30 хв.

Композицію III і IV готують та стерилізують разом у реакторі об'ємом 10 л та стерилізують за режиму 131 °С (0,15 МПа), 40 хв. Значення рН композиції доводять до 4,0-4,5 сульфатної кислотою перед стерилізацією.

- Для вирощування у посівному апараті об'ємом 5 м<sup>3</sup>.

Композицію I гідролізат ячмінної соломи змішували із водою та обробляли протягом 3 годин і при 121 °С протягом 30 хвилин у реакторі об'ємом 3,5 м<sup>3</sup>.

Композицію II (дріжджовий екстракт) готують у реакторі об'ємом 50 л та стерилізують за режиму 112 °С (0,05 МПа), 30 хв.

Композицію III і IV готують та стерилізують разом у реакторі об'ємом 150 л та стерилізують за режиму 131 °С (0,15 МПа), 40 хв. Значення рН композиції доводять до 4,0-4,5 сульфатної кислотою перед стерилізацією.

## РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, його кількість та коротка характеристика від виробника, наведені у таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

### Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник круглий білий Виробник: «Ravit»; Діаметр: 100 мм Матеріал: нержавіюча сталь та пластик [31]
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	EMW Карманний фільтр G4 Виробник: «EMW»; Продуктивність: 616 м <sup>3</sup> /год; Робочий тиск: 40 Па; Кількість кишень: 3; Габарити, мм: 287×287×300. [32]
К-3	Компресор	1	Frascold R-TSH8-120-360Y Виробник: «Frascold»; Продуктивність: 360 м <sup>3</sup> /год; Максимальний робочий струм: 230 А. [33]

					НУХТ БТЕК 05.01.17 КР ПЗ					
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата						
Розробив		Тихомиров Б.М.			РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання			Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірів		Красінько В.О.								
Реценз.										
Н. контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.						Кафедра БТМ		

Прошовження таблиці 5.1

T-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник WHE 2010 Виробник: «Paskal»; Продуктивність: 40 л/хв; Максимальний тиск: 25 бар; [34]
P-5	Ресивер	1	Ресивер Gardner Denver 8000 л Виробник: «Gardner Denver»; Робочий тиск: 11 бар. [35]
T-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Калорифер ПНЕ-30 Виробник: «УКРВЕТСИСТЕМИ»; Продуктивність: 2300 м <sup>3</sup> /год; Номінальна потужність: 30 кВт; Габарити, мм: 240×720×250. [36]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Карманний фільтр APF 3к F7 Виробник: «VOLZ»; Перепад тиску: 40 Па; Кількість кишень: 3; Габарити, мм: 287×287×360. [37]
ІФ-8	Індивідуальний фільтр	1	Megalam ProSafe MD14-2G10-1PU Виробник: «Camfil»; Продуктивність: до 418 м <sup>3</sup> /год; Робочий тиск: 150 Па; Габарити, мм: 508×508×66. [38]

Проживження таблиці 5.1

I-9	Посівний апарат об'ємом 50 л	1	<p>50 Liter Stainless Steel Bioreactor          Виробник: «Manufacturer/Factory &amp; Trading Company»;          Матеріал корпусу: SS316 і SS304;          Робочий тиск: 0,3 МПа;          Швидкість перемішування:          50~1000 об/хв;          Датчики контролю рН (2,00-12,00±0,1), температури, розчиненого кисню, швидкості обертів.          Габарити, мм: діаметр 500× висоту 500          [39]</p>
P-10	Реактор об'ємом 30 л для підготовки композиції I	1	<p>Хімічний лабораторний реактор s212 обсягом 30 літрів          Виробник: ТОВ "Титан Техникс";          Швидкість обертів: 680 об/хв;          Матеріал: боросилікатне скло 3.3 GG-17.          [40]</p>
ВД-11	Ваговий дозатор для реактору об'ємом 30 л	1	<p>Дозатор шнековий ваговий 1-10 кг ШД-1у          Виробник: «ABC Tech»;          Межі дозування: 1-10 кг;          Потужність: 0,75 кВт;          Об'єм бункера: 250 кг.          [41]</p>

Прошовження таблиці 5.1

Д-12	Дозатор води для реактору об'ємом 30 л	1	Перистальтичний насос ВНЗ-V Виробник: «ETATRON D.S.»; Продуктивність: 100 л/год Робочий тиск: 1,5 бар. [42]
Н-13	Насос від реактору до центрифуги	1	Перистальтичний насос PDP TEC100 100-00 90-260V PHARMED Виробник: «AQUA»; Продуктивність: 100 л/год; Робочий тиск: 2 бар. [43]
Ц-14	Промислова центрифуга	1	Centrifuge AFPX 517 Виробник: «Alfa Laval»; Місткість: 55 л; Швидкість двигуна: 1500/1800 об/хв; Потужність двигуна: 37 кВт; [44]
Н-15	Насос від центрифуги до збірника	1	Перистальтичний насос PDP TEC100 100-00 90-260V PHARMED Виробник: «AQUA»; Продуктивність: 100 л/год; Робочий тиск: 2 бар. [43]
З-16	Збірник для композиції I	1	Ємність 30 л під замовлення Виробник: «Wise Master»; Матеріал: нержавіюча сталь; Оснащена перемішувачем та сорочкою. [45]

Прошовження таблиці 5.1

Н-17	Насос від збірника до посівного апарату об'ємом 50 л	1	<p>Перистальтичний насос PDP TEC100 100-00 90-260V PHARMED Виробник: «AQUA»; Продуктивність: 100 л/год; Робочий тиск: 2 бар. [43]</p>
ІФ-18	Індивідуальний фільтр	1	<p>Megalam ProSafe MD14-2G10-1PU Виробник: «Camfil»; Продуктивність: до 418 м<sup>3</sup>/год; Робочий тиск: 150 Па; Габарити, мм: 508×508×66. [38]</p>
І-19	Посівний апарат об'ємом 500 л	1	<p>Посівний апарат SB2500-Z об'ємом 500 л під замовлення Виробник: «Kuhner»; Матеріал корпусу: SS316 і SS304; Швидкість перемішування: 50~1000 об/хв; Датчики контролю рН, температури, розчиненого кисню, швидкості обертів. Габарити, мм: діаметр 1000× висоту 1000. [46]</p>

Проживження таблиці 5.1

P-20	Реактор об'ємом 350 л для підготовки композиції I	1	Stainless Steel Chemical Reactor 350 L під замовлення Виробник: «Bhavani Engineering Works»; Матеріал: нержавіюча сталь SS316; Оснащений сорочкою та мішалкою. [47]
ВД-21	Ваговий дозатор для реактору об'ємом 350 л	1	Дозатор ваговий FOYER FZ-5000 вібрлотковий прямої дії Виробник: «FOYER» Доз у хвилину: 5-10; Вага однієї дози: до 5 кг; Потужність: 0,2 кВт; Габарити, мм: 680×400×1300. [48]
Д-22	Дозатор води для реактору об'ємом 350 л	1	Мембранний насос-дозатор D-BA 300/5 230/1/50 0,25 Виробник: «ETATRON D.S.»; Продуктивність: 300 л/хв; Робочий тиск: 5 бар. [49]
Н-23	Насос від реактору до центрифуги	1	Перистальтичний насос MP-1124-22 Виробник: «DEBEM»; Продуктивність: 420 л/год; Робочий тиск: 8 бар. [50]

Прошовження таблиці 5.1

Ц-24	Промислова центрифуга	1	<p>Culturefuge 100</p> <p>Виробник: «Alfa Laval»;</p> <p>Місткість: 1 м<sup>3</sup>;</p> <p>Швидкість двигуна: 9650 об/хв;</p> <p>Потужність двигуна: 7,5 кВт;</p> <p>[51]</p>
Н-25	Насос від центрифуги до збірника	1	<p>Перистальтичний насос МР-1124-22</p> <p>Виробник: «DEBEM»;</p> <p>Продуктивність: 420 л/год;</p> <p>Робочий тиск: 8 бар.</p> <p>[52]</p>
З-26	Збірник для композиції І	1	<p>Ємність 350 л під замовлення</p> <p>Виробник: «Wise Master»;</p> <p>Матеріал: нержавіюча сталь;</p> <p>Оснащена перемішуючим пристроєм та сорочкою.</p> <p>[45]</p>
Н-27	Насос від збірника до посівного апарату об'ємом 500 л	1	<p>Перистальтичний насос МР-1124-22</p> <p>Виробник: «DEBEM»;</p> <p>Продуктивність: 420 л/год;</p> <p>Робочий тиск: 8 бар.</p> <p>[50]</p>

Проживження таблиці 5.1

<p>P-28</p>	<p>Реактор об'ємом 10 л для підготування композиції III</p>	<p>1</p>	<p>Реактор miniPilot 10 л          Виробник: «Vuchiglasuster»;          Матеріал: боросилікатне скло 3.3;          Робочий тиск: 1 бар;          Робочі температури: від -90 до 200 °С;          Оберти мішалки: 600 об/хв;          Оснащений датчиками тиску та температури. Конструкційно оснащений сорочкою та мішалкою.          [54]</p>
<p>ВД-29</p>	<p>Ваговий дозатор для реактору об'ємом 10 л</p>	<p>1</p>	<p>Дозатор шнековий ваговий 1-10 кг ШД-1у          Виробник: «ABC Tech»;          Межі дозування: 1-10 кг;          Потужність: 0,75 кВт;          Об'єм бункера: 250 кг.          [43]</p>
<p>ІФ-30</p>	<p>Індивідуальний фільтр</p>	<p>1</p>	<p>Megalam ProSafe MD14-2G10-1PU          Виробник: «Camfil»;          Продуктивність: до 418 м<sup>3</sup>/год;          Робочий тиск: 150 Па;          Габарити, мм: 508×508×66.          [38]</p>

Прошовження таблиці 5.1

Ф-31	Ферментер об'ємом 5 м <sup>3</sup>	1	<p>Ферментер 5 м<sup>3</sup> під замовлення  Виробник: «Bioengineering AG»;  Оснащений сорочкою,  барботером, мішалкою, датчика  розчиненого кисню, швидкості  обертів, тиску, температури, рН.  Швидкість обертів: 500 об/хв;  Потужність приводу: 1,5-37 кВт.  Габарити, мм: діаметр 1400×  висоту 2800.  [29]</p>
Р-32	Реактор об'ємом 3,5 м <sup>3</sup> для підготовки композиції І	1	<p>3500 Litre Stainless Steel Chemical  Reactor  Виробник: «Angel Macheniry»;  Матеріал: нержавіюча сталь  SS316;  Швидкість обертів: 1440 об/хв;  Потужність мотору: 7,5 кВт.  [53]</p>
ВД- 33	Ваговий дозатор для реактору об'ємом 3,5 м <sup>3</sup>	1	<p>Ваговий дозатор сипучих  матеріалів СБ-15  Виробник: «Ваговимірювальні  системи»;  Вага однієї дози: 50 кг;  Продуктивність: 15 000 кг/год;  Габарити, мм: 1050×700×750.  [54]</p>

Прошовження таблиці 5.1

Д-34	Дозатор води для реактору об'ємом 3,5 м <sup>3</sup>	1	Дозатор Mixtron MX.300.P054 Виробник: «WoodHoff»; Продуктивність: 3000 л/год; Робочий тиск: 0,3-6 бар; Матеріал: сталь AISI 316. [55]
Н-35	Насос від реактору до центрифуги	1	Перистальтичний насос U-JET- 120L-24 Виробник: «Vakaqua»; Продуктивність: 3,3 м <sup>3</sup> /год; Потужність: 1,1 кВт. [56]
Ц-36	Промислова центрифуга	1	Centrifuge BTPX 305 Виробник: : «Alfa Laval»; Місткість: 3 м <sup>3</sup> ; Швидкість двигуна: 6000-9650 об/хв; Потужність двигуна: 7,5 кВт; [57]
Н-37	Насос від центрифуги до збірника	1	Перистальтичний насос U-JET- 120L-24 Виробник: «Vakaqua»; Продуктивність: 3,3 м <sup>3</sup> /год; Потужність: 1,1 кВт. [56]
З-38	Збірник для композиції I	1	Ємність 3,5 м <sup>3</sup> під замовлення Виробник: «Wise Master»; Матеріал: нержавіюча сталь; Оснащена перемішуючим пристроєм та сорочкою. [45]

Прошовження таблиці 5.1

Н-39	Насос від збірника до ферментеру об'ємом 5 м <sup>3</sup>	1	Перистальтичний насос U-JET-120L-24 Виробник: «Vakaqua»; Продуктивність: 3,3 м <sup>3</sup> /год; Потужність: 1,1 кВт. [56]
Р-40	Реактор об'ємом 50 л для підготування композиції II	1	Скляний реактор з сорочкою s212 обсяг 50 літрів Виробник: ТОВ «Титан Технікс»; Матеріал: боросилікатне скло 3.3; Робочі температури: від -120 до 300 °С; Оберти мішалки: 680 об/хв; Оснащений датчиками тиску та температури. Конструкційно оснащений сорочкою та мішалкою. [58]
ВД-41	Ваговий дозатор для реактору об'ємом 50 л	1	Дозатор ваговий FOYER FZ-5000 вібрототковий прямої дії Виробник: «FOYER» Доз у хвилину: 5-10; Вага однієї дози: до 5 кг; Потужність: 0,2 кВт; Габарити, мм: 680×400×1300. [48]
Д-42	Дозатор води для реактору об'ємом 50 л	1	Перистальтичний насос ВНЗ-V Виробник: «ETATRON D.S.»; Продуктивність: 100 л/год Робочий тиск: 1,5 бар. [42]

Прошовження таблиці 5.1

Н-43	Насос від реактору на 50 л до ферментера об'ємом 5 м <sup>3</sup>	1	Перистальтичний насос PDP TEC100 100-00 90-260V PHARMED Виробник: «AQUA»; Продуктивність: 100 л/год; Робочий тиск: 2 бар. [43]
Р-44	Реактор об'ємом 150 л для підготування композиції III	1	150L Chemical Lab Jacketed Glass Reactor Виробник: «Lab1st»; Матеріал: боросилікатне скло 3.3; Робочі температури: від -120 до 250 °С; Оснащений датчиками тиску та температури. Конструкційно оснащений сорочкою та мішалкою. [59]
ВД-45	Ваговий дозатор для реактору об'ємом 150 л	1	Дозатор ваговий FOYER FZ-5000 вібрлотковий прямої дії Виробник: «FOYER» Доз у хвилину: 5-10; Вага однієї дози: до 5 кг; Потужність: 0,2 кВт; Габарити, мм: 680×400×1300. [48]
Д-46	Дозатор води для реактору об'ємом 150 л	1	Мембранний насос-дозатор D-BA 300/5 230/1/50 0,25 Виробник: «ETATRON D.S.»; Продуктивність: 300 л/хв; Робочий тиск: 5 бар. [49]

Прошовження таблиці 5.1

H-47	Насос від реактору на 150 л до ферментера об'ємом 5 м <sup>3</sup>	1	Перистальтичний насос MP-1124-22 Виробник: «DEBEM»; Продуктивність: 420 л/год; Робочий тиск: 8 бар. [50]
P-48	Реактор об'ємом 10 л для приготування та стерилізації 6%-го розчину NaOH	1	Реактор miniPilot 10 л Виробник: «Buehiglasuster»; Матеріал: боросилкатне скло 3.3; Робочий тиск: 1 бар; Робочі температури: від -90 до 200 °C; Оберти мішалки: 600 об/хв; Оснащений датчиками тиску та температури. Конструкційно оснащений сорочкою та мішалкою. [52]
H-49	Насос від реактору для приготування 6%-го розчину NaOH	1	Перистальтичний насос PDP TEC100 100-00 90-260V PHARMED Виробник: «AQUA»; Продуктивність: 100 л/год; Робочий тиск: 2 бар. [43]

Завершення таблиці 5.1

<p>P-50</p>	<p>Реактор об'ємом 10 л для приготування та стерилізації 6%-го розчину H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<p>1</p>	<p>Реактор miniPilot 10 л  Виробник: «Vuchiglasuster»;  Матеріал: боросилікатне скло 3.3;  Робочий тиск: 1 бар;  Робочі температури: від -90 до 200 °С;  Оберти мішалки: 600 об/хв;  Оснащений датчиками тиску та температури. Конструкційно оснащений сорочкою та мішалкою.  [52]</p>
<p>H-51</p>	<p>Насос від реактору доя приготування 6%-го розчину H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<p>1</p>	<p>Перистальтичний насос PDP  TEC100 100-00 90-260V  PHARMED  Виробник: «AQUA»;  Продуктивність: 100 л/год;  Робочий тиск: 2 бар.  [43]</p>

## РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема виробництва отримання ксиланази, культивуванням *Penicillium canescens* 10-10с наведена у графічній частині курсового проекту на 1-му аркуші формату А1.

### *ДР 1. Підготовка аераційного повітря*

#### *ДР 1.1. Забір атмосферного повітря*

Повітрозабірник (ПЗ-1) забирає атмосферне повітря на висоті 30 м.

#### *ДР 1.2. Грубе очищення повітря*

Використовують фільтр (Ф-2) із волокнистих матеріалів, який утримує частки та пил на своїй поверхні. Клас фільтру – G4.

#### *ДР 1.3. Компресіонування повітря*

Повітря стискається у компресорі (К-3) із підвищенням температури та тиску.

#### *ДР 1.4. Охолодження повітря*

Стиснене повітря від ДР 1.3. охолоджується у теплообміннику (Т-4) з метою здійснення випадіння зайвої вологи у ресивері (Р-5).

#### *ДР 1.5. Нагрівання повітря*

Повітря нагрівають у теплообміннику (Т-6) для запобігання випадіння конденсату на волокнах фільтрів, які використовуються на подальших етапах.

#### *ДР 1.6. Попереднє очищення повітря*

Виконується з метою утримання частинок розміром  $>1$  мікромметр за допомогою фільтруючого матеріалу. Клас фільтру (Ф-7) – F7.

#### *ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

У індивідуальному фільтрі (ІФ-8, 18, 30) виконується для утримання частинок розміром  $>0,2$  мікромметра. Індивідуальні фільтри забезпечуючи ефективність

					НУХТ БТЕК 05.01.17 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Тихомиров Б.М.			РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми	Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив		Красінько В.О.						
Реценз.								
Н. контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						Кафедра БТМ		

очищення на рівні  $E = 99,999\%$ .

## ***ДР 2. Підготовка титрувальних агентів***

### ***ДР 2.1. Підготовка 6%-го розчину $H_2SO_4$***

*ДР 2.1.1. Приготування 6%-го розчину  $H_2SO_4$  для вирощування інокуляту в інокуляторах об'ємом 50 та 500 л*

Для приготування 660 мл 6%-го розчину  $H_2SO_4$  у колбу об'ємом 2 л додають 553 мл питної води і вносять за допомогою мірного циліндра при постійному перемішуванні 107 мл 37%-ого розчину  $H_2SO_4$  (Кх 1.1.1).

*ДР 2.1.2. Приготування 6%-го розчину  $H_2SO_4$  для виробничого біосинтезу у ферментері на 5 м<sup>3</sup>*

Для приготування 6 л 6%-го розчину  $H_2SO_4$  у реактор-змішувач (Р-48) об'ємом 10 л додають із використанням лічильника 5,03 л питної води і вносять за допомогою лічильника при постійному перемішуванні 0,97 л 37%-ого розчину  $HCl$  (Кх 1.1.2).

### ***ДР 1.2. Підготовка 6%-го розчину натрію гідроксиду***

*ДР 1.2.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду для вирощування інокуляту в інокуляторах об'ємом 50 та 500 л*

Для приготування 660 мл 6%-го розчину  $NaOH$  на технічних вагах зважують 99 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 2 л і додають 660 мл питної води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевым корком. Стерилізація проходить в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Кх, Км 1.2.1).

*ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду для виробничого біосинтезу у ферментері на 5 м<sup>3</sup>*

Для приготування 6 л 6%-го розчину  $NaOH$  на ваговому дозаторі зважують 900 г кристалічного їдкого натру. Наважку переносять у реактор-змішувач (Р-50) об'ємом 10 л і додають при постійному перемішуванні із увімкненим перемішувальним пристроєм за допомогою лічильника 6 л питної води (Кт, Кх, Км 1.2.2).

## ***ДР 3. Підготовка та стерилізація поживного середовища***

### ***ДР 3.1. Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування***

### *інокуляту в колбах на качалках*

Для вирощування інокуляту потрібно зробити 3 л поживного середовища.

Місткість компонентів для приготування 3 л даного середовища показано в табл. 6.1.

*Таблиця 6.1*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3 л середовища**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Концентрація, г/л</b>	<b>Вміст компонента у 3 л середовища, г</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції, мл</b>
гідролізат ячмінної соломи	100	300	I	1453,05
Вода	-	1153,05		
дріжджовий екстракт	5,0	15,0	II	515
Вода	-	500		
гідрофосфат натрію (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	10,0	30,0	III	531,5
хлорид калію (KCl)	0,5	1,5		
Вода	-	500		
сульфат магнію (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0,15	0,45	IV	500,45
Вода	-	500		
Усього: 3000 мл				

#### *ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції I*

300 г подрібненої ячмінної соломи обробляють 1153,05 мл дистильованої води при 100 °С протягом 3 годин і при 121 °С протягом 30 хвилин у автоклаві. Рідку фракцію відокремлюють центрифугуванням і використовують як розчин джерела вуглецю.

#### *ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції II*

На технічних вагах відважують 15,0 г дріжджового екстракту. Наважку переносять у колбу з об'ємом 1 л та додають 0,5 л дистильованої води. Процес

стерилізації проводять при температурі 112°C в автоклаві впродовж 30 хв.

*ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції III*

На вагах технічних відважують 30,0 г гідрофосфат натрію, 1,5 г хлорид калію. Наважки переносять у колбу з об'ємом 1 л та додають 0,5 л дистильованої води. Процес стерилізації проводять при температурі 131 °С в автоклаві впродовж 40 хв.

*ДР 3.1.4. Приготування і стерилізація композиції IV*

На вагах технічних відважують 0,45 г сульфату магнію. Наважку переносять у колбу з об'ємом 1 л та додають 0,5 л дистильованої води. Процес стерилізації проводять при температурі 131 °С в автоклаві впродовж 40 хв.

***ДР 3.2. Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 0,05 м<sup>3</sup>.***

Місткість компонентів для приготування 0,3 м<sup>3</sup> (30 л) середовища показано у табл. 6.2.

Таблиця 6.2

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 30 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 30 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
гідролізат ячмінної соломи	100	3 000	I	26530,5
Вода	-	24 530,5		
дріжджовий екстракт	5,0	150	II	1150
Вода	-	1000		
гідрофосфат натрію (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	10,0	300	III	1319,5
хлорид калію (KCl)	0,5	15		
сульфат магнію (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0,15	4,5		
Вода	-	1000		
Усього: 30 000 мл				

### *ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції I*

Відміряні ваговим дозатором (ВД-11) 3 000 г подрібненої ячмінної соломи обробляють 24 530,5 мл дистильованої води при 100 °С протягом 3 годин і при 121 °С протягом 30 хвилин у реакторі (Р-10) об'ємом 30 л. Рідку фракцію відокремлюють центрифугуванням у центрифугі (Ц-14) і використовують як розчин джерела вуглецю.

### *ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції II*

На технічних вагах відважують 150 г дріжджового екстракту. Наважку переносять у колбу з об'ємом 2 л та додають 1 л дистильованої води. Процес стерилізації проводять при температурі 112°С в автоклаві впродовж 30 хв.

### *ДР 3.2.2. Приготування композиції III.*

На технічних вагах відміряють згідно табл. 4.2 сольові компоненти композиції III переносять у колбу об'ємом 2 л та додають 1000 дистильованої води.. Значення рН композиції доводять до 4,0-4,5 додаванням 6%-го розчину сульфатної кислоти від ДР 1.1.1. Процес стерилізації проводять при температурі 131 °С в автоклаві впродовж 40 хв.

### ***ДР 3.3. Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 0,5 м<sup>3</sup>.***

Місткість компонентів для приготування 0,3 м<sup>3</sup> (300 л) середовища показано у табл. 6.3.

*Таблиця 6.3*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 300 л середовища**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Концентрація, г/л</b>	<b>Вміст компонента у 300 л середовища, г</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції, л</b>
гідролізат ячмінної соломи	100	30 000	I	287, 305
Вода	-	257 305		
дріжджовий екстракт	5,0	1 500	II	3, 500
Вода	-	2 000		

гідрофосфат натрію ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	10,0	3 000	III	9, 195
хлорид калію (KCl)	0,5	150		
сульфат магнію ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,15	45		
Вода	-	6 000		
Усього: 300 000 мл				

*ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції I*

Відміряні ваговим дозатором (ВД-21) 30 000 г подрібненої ячмінної соломи обробляють 257, 305 л дистильованої води при 100 °С протягом 3 годин і при 121 °С протягом 30 хвилин у реакторі об'ємом 350 л. Рідку фракцію відокремлюють центрифугуванням у центрифугі (Ц-24і використовують як розчин джерела вуглецю

*ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції II*

На технічних вагах відважують 1500 г дріжджового екстракту. Наважку переносять у колбу з об'ємом 5 л та додають 2 л дистильованої води. Процес стерилізації проводять при температурі 112°С в автоклаві впродовж 30 хв.

*ДР 3.3.2. Приготування композиції III.*

На технічних вагах відміряють згідно табл. 4.2 сольові компоненти композиції III переносять у реактор-змішувач (Р-28) об'ємом 10 л. Далі відкривають вентиль для подачі води та заливають в апарат 6 л води. Потім вмикають мішалку та здійснюють перемішування протягом 12 хв. Для прискорення процесу розчинення у рубашку апарату подають глуху пару та проводять контроль візуально. Значення рН композиції доводять до 4,0-4,5 додаванням 6%-го розчину сульфатної кислоти від ДР 1.1.1. Процес стерилізації проводять при температурі 131 °С впродовж 40 хв.

***ДР 3.4. Підготовка та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування у ферментері об'ємом 5,0 м<sup>3</sup>***

Склад компонентів для приготування 3000 л середовища наведено в табл. 6.4.

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3000 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 3000 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
гідролізат ячмінної соломи	100	300 000	I	2 823, 050
Вода	-	2 523 050		
дріжджовий екстракт	5,0	15 000	II	45, 000
Вода	-	30 000		
гідрофосфат натрію (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	10,0	30 000	III	131, 950
хлорид калію (KCl)	0,5	1 500		
сульфат магнію (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0,15	450		
Вода	-	100 000		
Усього: 3 000 л				

*ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції I*

Відміряні ваговим дозатором (ВД-33) 300 000 г подрібненої ячмінної соломи обробляють 2 523, 050 л дистильованої води при 100 °С протягом 3 годин і при 121 °С протягом 30 хвилин у реакторі об'ємом 3,5 м<sup>3</sup>. Рідку фракцію відокремлюють центрифугуванням (Ц-36) і використовують як розчин джерела вуглецю.

*ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції II*

За допомогою вагового дозатору (ВД-41) відважують 15 000 г дріжджового екстракту. Наважку переносять у реактор (Р-40) об'ємом 50 л та додають 30 л дистильованої води. Процес стерилізації проводять при температурі 112 °С впродовж 30 хв.

*ДР 3.4.2. Приготування композиції III.*

За допомогою вагового дозатору (ВД-45) відміряють згідно табл. 4.2 сольові компоненти композиції III переносять у реактор-змішувач (Р-44) об'ємом 150 л. Далі відкривають вентиль для подачі води та заливають в апарат 100 л води. Потім

вмикають мішалку та здійснюють перемішування протягом 12 хв. Для прискорення процесу розчинення у рубашку апарату подають глуху пару та проводять контроль візуально. Значення рН композиції доводять до 4,0-4,5 додаванням 6%-го розчину сульфатної кислоти від ДР 1.1.1. Процес стерилізації проводять при температурі 131 °С впродовж 40 хв.

#### ***ТП 4. Підготовка посівного матеріалу***

Посівний матеріал підлягає ретельному мікробіологічному контролю, оскільки виробничий цикл залежить від активності і чистоти.

##### ***ТП 4.1. Підтримання колекційної культури***

Колекційну культуру *Penicillium canescens* 10-10с зберігають у пробірках з скошеним сусло-агаром при 2 – 4 °С. Кожні 2-3 місяці роблять пересіви. Суворо здійснюють все в асептичних умовах (Кт, Км 4.1).

##### ***ТП 4.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах***

Колекційну культуру, яка міститься та зберігається в пробірках з скошеним сусло-агаром петлею розсівають на чашки Петрі із сусло-агаром до ізолюваних колоній та вирощують упродовж 24 год при температурі 30 °С (Кт, Км 4.2).

##### ***ТП 4.3. Вирощування посівного матеріалу в пробірках***

Одержані колонії (від ТП 4.2), які є ізолювані, пересівають в пробірки зі скошеним сусло-агаром (СА) петлею. Далі пересівають в пробірки ізолювані колонії, які повинні знаходитися на відстані не менше 1 см. Потім засіяні пробірки розміщують у термостаті при температурі 30 °С та тримають їх протягом 24 год. Мікроскопіюванням підтверджують чистоту культури (Кт, Км 4.3).

##### ***ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках***

У стерильних умовах у колбу з об'ємом 3 л із простерилізованою композицією II (від ДР 1.3.2) додають стерильні композиції I (від ДР 1.3.1) і III (від ДР 1.3.3), а також попередньо підготовлений розчин гідролізату ячмінної соломи (від ДР 2.1). Далі перемішують та розливають по 100 мл у 20 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

Беруть пробірку із робочою культурою *Penicillium canescens* 10-10с, яка

вирощена на скошеному СА та вносять 5 мл фізіологічного розчину, який повинен біти стерильним, далі суспендують клітини та піпеткою беруть отриману клітинну суспензію та переносять у качалочні колби, які містять поживне середовище. Так вирощування посівного матеріалу саме у колбах на качалках відбувається при наступних умовах: частота обертання – 200 об/хв, температура – 28 °С, час – 24 год. Після завершення процесу визначають концентрацію біомаси і здійснюють мікробіологічний контроль.

Далі вже у стерильну засівну колбу об'ємом 3 л переносять після культуральну рідину з колб (Км, Кт 4.4).

#### ***ТП 4.5. Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 50 л***

В інокулятор (І-9) об'ємом 50 л із 17,0 л охолодженою простерилізованою композицією II (від ДР 3.2.2) асептично передають 3,0 л за температурою 18-25°C розчину композиції I (від ДР 3.2.1), який звісно повинен бути стерильним. Також передають 10 л гідролізату ячмінної соломи від ДР 2.2. Контроль рівня рН поживного середовища здійснюють відповідно до показників рН-метра і, якщо потрібно то доводять до показника рН=6,1 подачею стерильного 15% розчину натрію гідроксиду (від ДР 1.2.1) всередину інокулятора.

Посівний матеріал відповідно правил асептики переносять в інокулятор із засівної колби (від ДР 4.4).

Процес біосинтезу ведуть при наступних умовах:, швидкість перемішування – 200 об/хв, температура – 28-30 °С, час – 60 год, витрати повітря – 1 л/л·хв, під час біосинтезу у інокуляторі стисненим стерильним повітрям підтримується вже надлишковий тиск – 0,02 МПа. (Км, Кт 4.5).

#### ***ТП 4.6. Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 500 л***

В інокулятор (І-19) об'ємом 500 л із 170 л охолодженою простерилізованою композицією II (від ДР 3.3.2) асептично передають 30 л за температурою 18-25°C розчину композиції I (від ДР 3.3.1), який звісно повинен бути стерильним. Також передають 100 л гідролізату ячмінної соломи від ДР 2.2. Контроль рівня рН поживного середовища здійснюють відповідно до показників рН-метра і, якщо потрібно то

доводять до показника рН=6,1 подачею стерильного 15% розчину натрію гідроксиду (від ДР 1.2.1) всередину інокулятора.

Посівний матеріал відповідно правил асептики перекачують в інокулятор із попереднього апарату трубою перетиснення (від ДР 4.5).

Процес біосинтезу ведуть при наступних умовах:, швидкість перемішування – 200 об/хв, температура – 28-30 °С, час – 60 год, витрати повітря – 1 л/л·хв, під час біосинтезу у інокуляторі стисненим стерильним повітрям підтримується вже надлишковий тиск – 0,02 МПа. (Км, Кт 4.6).

### ***ТП 5. Виробниче культивування***

#### ***ТП 5.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 5 м<sup>3</sup>***

У ферментер (Ф-31) об'ємом 5 м<sup>3</sup> із 1,7 м<sup>3</sup> охолодженою простерилізованою композицією II (від ДР 3.4.2) асептично передають 300 л за температурою 18-25°С розчину композиції I (від ДР 3.4.1), який звісно повинен бути стерильним. Також передають 1 м<sup>3</sup> гідролізату ячмінної соломи від ДР 2.3. Контроль рівня рН поживного середовища здійснюють відповідно до показників рН-метра і, якщо потрібно то доводять до показника рН=6,1 подачею стерильного 15% розчину натрію гідроксиду (від ДР 1.2.2) від реактора на 10 л всередину ферментера.

Посівний матеріал відповідно правил асептики перекачують у ферментер із попереднього апарату трубою перетиснення (від ДР 4.6).

Процес біосинтезу ведуть при наступних умовах:, швидкість перемішування – 200 об/хв, температура – 28-30 °С, час – 120 год, витрати повітря – 1 л/л·хв, під час біосинтезу у інокуляторі стисненим стерильним повітрям підтримується вже надлишковий тиск – 0,02 МПа. (Км, Кт 5.1).

Кожні 4 год та по завершенню процесу біосинтезу здійснюють відбір проб для проведення мікробіологічного контролю. Головним показником щодо завершення процесу біосинтезу є активність ксиланази, що повинна становити 126 Од/мл.

## РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### 7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів та процесу виробничого біосинтезу

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1, 1.1.2 <i>Приготування розчину соляної кислоти</i>	<b>Розчин соляної кислоти</b> Концентрація	Фізико-хімічний метод	Після приготування розчину	C = 6%
Кт, Кх, Км 1.2.1 <i>Приготування і стерилізація 15%-го розчину натрію гідроксиду для вирощування інокуляту у посівних апаратах об'ємами 60 і 630 л</i>	<b>Розчин натрію гідроксиду</b> Тиск, час, концентрація, стерильність	Манометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Концентрація визначається після приготування розчину, тривалість, тиск безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, C = 15%, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 1.2.2 <i>Приготування і стерилізація 15%-го розчину натрію гідроксиду для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 5 м<sup>3</sup></i>	<b>Розчин натрію гідроксиду</b> Тиск, температура, час, концентрація, стерильність	Манометр, термометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Концентрація визначається після приготування розчину, тривалість, тиск і температура безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, C = 15%, відсутність мікробіоти

					НУХТ БТЕК 05.01.17 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Тихомиров Б.М.				РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва	Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив	Красінько В.О.							
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Прошовження таблиці 7.1

<p>Кт, Км 2.1 <i>Приготування і стерилізація гідролізату ячмінної соломи для вирощування інокуляту у колбах на качалках</i></p>	<p><b>Гідролізат ячмінної соломи</b> стерильність, тиск, час витримки</p>	<p>манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Безперервно під час стерилізації визначають та після неї здійснюють мікробіологічний контроль</p>	<p>P = 0,1 МПа τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 2.2, 2.3 <i>Приготування і стерилізація гідролізату ячмінної соломи для вирощування інокуляту у посівних апаратах і виробничого біосинтезу у ферментері</i></p>	<p><b>Гідролізат ячмінної соломи</b> стерильність, тиск, температура, час витримки</p>	<p>манометр, датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Безперервно під час стерилізації визначають та після неї здійснюють мікробіологічний контроль</p>	<p>P = 0,1 МПа, t = 121 °C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 3.1.1 <i>Приготування і стерилізація композиції I</i></p>	<p><b>Композиція I</b> стерильність тиск (температура), час витримки</p>	<p>манометр, мікробіологічний контроль, годинник.</p>	<p>Безперервно під час стерилізації визначають та після неї здійснюють мікробіологічний контроль</p>	<p>P = 0,05 МПа τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 3.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції II</i></p>	<p><b>Композиція II</b> стерильність тиск (температура), час витримки.</p>	<p>манометр, мікробіологічний контроль, годинник.</p>	<p>Безперервно під час стерилізації визначають та після неї здійснюють мікробіологічний контроль</p>	<p>P = 0,15 МПа τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>

Проживження таблиці 7.1

Кт, Км 3.1.3 <i>Приготування і стерилізація композиції III</i>	<b>Композиція III</b> стерильність тиск (температура), час витримки.	манометр, мікробіологічний контроль, годинник.	Безперервно під час стерилізації визначають та після неї здійснюють мікробіологічний контроль	P = 0,15 МПа τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.1, 3.3.1, 3.4.1 <i>Приготування і стерилізація композиції I</i>	<b>Композиція I</b> стерильність тиск (температура), час витримки.	манометр, годинник мікробіологічний контроль.	Безперервно під час стерилізації визначають та після неї здійснюють мікробіологічний контроль	P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2, 3.3.2, 3.4.2 <i>Приготування і стерилізація композиції II</i>	<b>Композиція II</b> час витримки, стерильність тиск (температура).	мікробіологічний контроль, манометр, годинник.	Безперервно під час стерилізації визначають та після неї здійснюють мікробіологічний контроль	P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	<b>Колекційна культура <i>Penicillium canescens</i> 10-10с</b> температура, мікробіологічна чистота	Холодильник, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожні 3-4 місяці	t = 2 – 4 °С, τ = 3 – 4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.2 <i>Одержання робочої культури на агаризованих середовищах</i>	<b>Робоча культура <i>Penicillium canescens</i> 10-10с на чашках Петрі</b> температура, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 30 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти

<p>Кт, Км 4.3 Вирощування посівного матеріалу в пробірках</p>	<p><b>Робоча культура <i>Penicillium canescens</i> 10-10с у пробірках</b> температура, мік-робиологічна чистота</p>	<p>Термостат, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування</p>	<p><math>t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 24</math> год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках</p>	<p><b>Посівний матеріал,</b> мікробіологічна чистота культури, температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки</p>	<p>мікробіологічний контроль, годинник технічний, тахометр, термометр</p>	<p>Контролюють та підтримують автоматично температуру та швидкість обертання весь час біосинтезу. Мікроскопіювання – після вирощування культури в колбах</p>	<p><math>t = 28\text{-}30^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 24</math> год, <math>\omega = 220</math> об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кх, Кт, Км 4.5, 4.6 Вирощування культури у посівних апаратах об'ємом 60 і 630 л</p>	<p><b>Поживне середовище в інокуляторі рН</b> <b>Посівний матеріал,</b> кратність подачі повітря, частота обертів мішалки, температура, тривалість вирощування, морфологічна відповідність організмів. надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури.</p>	<p>датчик рН термометр технічний, тахометр, манометр, мікроскоп, годинник.</p>	<p>рН визначають після змішування в інокуляторі всіх компонентів поживного середовища, контролюють та підтримують автоматично температуру та швидкість обертання під час біосинтезу. Мікроскопіювання здійснюється в кінці процесу біосинтезу культури в інокуляторі</p>	<p><math>\text{pH}=6,0\text{-}6,5</math> <math>t = 28\text{-}30^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 60</math> год, <math>\omega = 200</math> об/хв, 1 л·л/хв, Рнадл.= 0,02 МПа.. відсутність сторонньої мікробіоти</p>

<p>Кх, Кт, Км 5.1 Виробничий біосинтез у ферментері на 5 м<sup>3</sup></p>	<p><b>Поживне середовище в інокуляторі рН</b> <b>Посівний матеріал,</b> кратність подачі повітря, частота обертів мішалки, температура, тривалість вирощування, морфологічна відповідність організмів. надлишковий тиск, активність ксиланази, мікробіологічна чистота культури.</p>	<p>датчик рН термометр технічний, тахометр, манометр, мікроскоп, годинник, спектрофотометр</p>	<p>рН визначають після змішування в інокуляторі всіх компонентів поживного середовища, контролюють та підтримують автоматично температуру та швидкість обертання під час біосинтезу. Мікроскопіювання та визначення активності ксиланази здійснюється в кінці процесу біосинтезу культури в інокуляторі</p>	<p>рН=6,0-6,5 t = 28-30°C, τ = 60 год, ω = 200 об/хв, 1 л·л/хв, Рнадл.= 0,02 МПа, А = 126 Од/мл відсутність сторонньої мікробіоти</p>
--	--	--	---	---

## 7.2. Мікробіологічний контроль

Контроль за відсутністю чужорідних мікроорганізмів здійснюється:

Мікробіологічний контроль поживних середовищ та якість посівного матеріалу проводиться методом висіву на чашки Петрі з агаризованим середовищем. Проби поживного середовища розсівають на чашки Петрі із м'ясо-пептонним агаром (для виявлення сторонніх бактерій) і сусло-агаром (для грибів і дріжджів). Результатом являється відсутність мікробних контамінацій на чашках Петрі. При наявності мікробіоти в поживному середовищі не використовують його для засіву.

Методом прямого мікроскопіювання, так і висівом на чашки Петрі визначають якість посівного матеріалу.

Посівну культуру розсівають петлею на чашки Петрі до ізольованих колоній із сусло-агаром (СА) – для виявлення грибів та МПА – для бактерій.

Результатом мікроскопіювання посівного матеріалу являється відсутність в полі

зору препарату сторонньої мікробіоти та на чашках Петрі сторонніх мікробних контамінацій. Не використовують для засіву, в посівному матеріалі при наявності сторонньої мікробіоти, що не відповідає за морфолого-культуральними ознаками його.

Культуральні ознаки продуцента, які мають бути: штрих на агаризованому середовищі слизувий, блискучий, рясний, колонії - однотипні, білуваті, круглі, блискучі з чіткими краями до 5 мм в діаметрі.

### **7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту**

#### **7.3.1. Концентрація цільового продукту**

Активність ксиланази визначали з використанням 1,0% ксилану берези в 0,05 М цитратному буфері (рН 5) як субстрат [61]. Розчин ксилану та фермент у відповідних розведеннях інкубували при 55 °С протягом 5 хвилин, а відновлюючі цукри визначали методом динітросаліцилової кислоти з ксилозою як стандартом. Вивільнену ксилозу вимірювали спектрофотометрично при 550 нм. Одна одиниця ксиланази визначається як кількість ферменту, необхідного для вивільнення 1 мікромоля відновлюючого цукру як еквівалента ксилози за хвилину за наведених вище умов аналізу. Кількість загального білка визначали за методом Лоурі, використовуючи бичачий сироватковий альбумін (BSA) як стандарт концентрації білка [27].

#### **7.3.2. Концентрація джерела вуглецю та азоту**

*Визначення азоту в культуральному середовищі.* В основу методу покладено блокування при рН=7,0 формальдегідом вільних аміногруп та титрування лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп. Визначають початок та кінець титрування потенціометрично. Наливають 2 мл дослідного розчину поживного середовища в стакан об'ємом 50 мл та доводять водою очищеною об'єм до 20 мл. Потенціометрично коригують за допомогою розчину NaOH 0,1М або HCl 0,1М рН до значення 7,0. Додають 2,0 мл нейтрального формаліну до нейтрального розчину (рН доводять до 7,0 10 %-им розчином NaOH), перемішують та потенціометрично титрують за допомогою розчину NaOH 0,1М до рН 9,1.

У зразку (в мг%) визначають вміст амінного азоту за формулою:

$$X = V \cdot K \cdot 1.4 \cdot 100 / 2$$

де,  $V$  – кількість розчину 0,1М NaOH, яка йде на титрування проби;

$K$  – поправка до титру розчину 0,1М NaOH, який застосовувався;

1.4 – кількість амінного азоту в мг, еквівалентна 1 мл розчину 0,1М NaOH;

2 – об'єм зразка, мл.

*Визначення концентрації джерела вуглецю.* Джерелом вуглецю в обраному поживному середовищі виступають редуруючі речовини. Такі речовини пропонується визначати методом Бертрана, що заснований на відновлювальній дії цукру на лужний розчин комплексу тартарату з іоном міді; утворений оксид міді розчиняють у теплому кислому розчині залізних галунів. Залізні галуни відновлюють до FeSO<sub>4</sub>, який титрують проти стандартизованого KMnO<sub>4</sub>; Еквівалентність Cu співвідноситься з таблицею, щоб отримати кількість відновлюючого цукру. Він заснований на лужному розчині тартаратного комплексу іонів міді [62].

Для гідролізу сахарози або інших нередукуючих цукрів до 20 мл супернататну (який одержують шляхом центрифугування відібраної проби культуральної рідини) додають 2 мл 5% розчину HCl та ставлять на киплячу водяну баню на 30 хв. Для аналізу відбирають 0,1-2 мл отриманої рідини. Для визначення концентрації редукуючих цукрів, які отримані в результаті гідролізу, у конічну колбу на 200-300 мл вносять 0,1-2 мл досліджуваної рідини та дистильованої води, так щоб загальний об'єм дорівнював 20 мл, 20 мл реактиву Фелінга I і 20 мл реактиву Фелінга II. Колбу нагрівають до кипіння на нагрівальному елементі електричної плити. Кип'ятять 3 хвилини, рахуючи з моменту появи бульбашок. Червоний осад оксиду міді (I), що випав, переносять кількісно у центрифужну пробірку та центрифугують при 5000 об./хв. протягом 3 хвилин. Фугат обережно зливають, осад у пробірці промивають 20 мл гарячої дистильованої води, центрифугуючи за тих же умов.

Промитий осад кількісно переносять у конічну термостійку колбу на 250 мл незначною кількістю води, додають 15-20 мл кислого розчину сульфату заліза (III) та розчиняють, нагріваючи на водяній бані. Отриманий розчин титрують

перманганатом калію до появи слаборожевого забарвлення, стійкого протягом 1 хв. Паралельно з основним аналізом проводять контрольне титрування для визначення поправки на реактиви. Визначення ведуть так само, але замість досліджуваного розчину для аналізу беруть 2 мл дистильованої води. Поправку виражають у мл розчину перманганату калію, і для розрахунку віднімають з кількості перманганату калію, що пішла на титрування досліджуваного розчину. Концентрацію цукрів розраховують за формулою:

$$\% \text{цукрів} = \frac{A \times 100}{B \times 1000} = \frac{A}{10B}, \text{ де}$$

$B$  – кількість досліджуваної рідини (мл), взята для визначення;

$A$  – визначена за таблицею кількість глюкози (мг), що відповідає кількості відновленої міді  $M(\text{Cu})$  (мг).

$M(\text{Cu}) = (a-b) \cdot K$ , де  $(a-b)$  – різниця (мл) розчину перманганату калію, що витрачено на титрування дослідної та контрольної проб;  $K$  – титр розчину перманганату калію (10 мг) [63].

#### **7.4. Визначення концентрації біомаси**

Сушу масу міцелію визначали фільтруванням культурального середовища через попередньо зважений фільтрувальний папір Ватман № 44, двічі промиваючи дистильованою водою і, нарешті, висушуючи до постійної маси при 80 °С і повторно зважуючи. Різниця у вазі означала ріст міцелію гриба [26].

## РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

### 8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місцях емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Відповідно до технологічної схеми, під час виробництва ксиланази і контролю утворюються такі основні відходи:

- ✓ тверді: бруд на очисних фільтрах (ДР 1.2, ДР 1.6 та ДР 1.7), біомаса *Penicillium canescens* 10-10с (після біосинтезу, так як вона не є цільовим продуктом), хімічні реактиви, термін придатності яких збіг (ДР 3, а також реактиви, що застосовують для проведення контролю), пакувальні матеріали (склотара, папір, картон, пластик), використані засоби індивідуального захисту.
- ✓ рідкі: відпрацьовані мийні та дезінфікувальні розчини, а також відпрацьована вода для ополіскування виробничого обладнання (на схемі не показано), хімічні реактиви, термін придатності яких збіг (ДР 2, а також реактиви, що застосовують для проведення контролю).
- ✓ газоподібні: під час отримання посівного матеріалу в посівних апаратах (ТП 4.5, ТП 4.6) та під час процесу виробничого біосинтезу (ТП 5.1).

### 8.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

В Україні на даний момент більшість підприємств не утилізують відходи самостійно, а передають їх спеціальним організаціям, уклавши попереньо відповідні договори. Це пов'язано в основному з високою вартістю закупівлі і обслуговування очисних споруд та переробних станцій. Проте, необхідно дбати про навколишнє середовище та відповідати вимогам чинного законодавства. Тому пропонуємо розглянути можливі варіанти поводження з утворюваними відходами (див. пункти 8.2.1-8.2.3).

					НУХТ БТЕК 05.01.17 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Тихомиров Б.М.			РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля	Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив		Красінько В.О.						
Реценз.								
Н. контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
					Кафедра БТМ			

### **8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів**

Щодо відпрацьованих мийних та дезінфікувальних розчинів, а також води для ополіскування обладнання – можна або підібрати очисну установку з активним аеробним та/або анаеробним мулом, або розводити стічні води до гранично допустимої концентрації і зливати у міську каналізацію.

Непридатні рідкі хімічні реактиви слід зберігати окремо в герметичних контейнерах в спеціальній шафі, а потім передавати спеціальним організаціям з метою подальшої утилізації.

### **8.2.2. Система знешкодження та утилізації газоповітряних відходів**

Перед випуском відпрацьованого повітря з аерозолем клітин продуцента в атмосферу слід встановити спеціальні головні фільтри для його очищення.

Фільтри можна встановити безпосередньо на виробничому обладнанні – посівних апаратах та ферментері.

### **8.2.3. Система знешкодження та утилізації твердих відходів**

Біомасу та брудні фільтри спочатку варто пропустити через убойний автоклав. Далі інактивовану біомасу передаємо спеціальним організаціям по виробництву добрив. Оброблені фільтри передаємо організаціям, які їх приймають на утилізацію.

Тверді хімічні реактиви, так само як і рідкі, зберігаємо окремо і передаємо організаціям, які займаються їх утилізацією.

Скло, папір та картон, пластик попередньо сортуємо у різні сміттєві баки всередині підприємства, а далі відповідно передаємо спеціальним організаціям на переробку.

Використані ЗІЗ (засоби індивідуального захисту) та ганчірки, також передаємо організаціям, що займаються їх утилізацією.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Маруненко І. М. Біотехнологія: перспективи розвитку // Відкриття і гіпотези. – 1997. – №7. – С. 32-34.
2. Герасименко В. Г., Герасименко М. О., Цвіліховський М. І. Біотехнологія: Підручник / В.Г. Герасименка. — К.: Фірма «ІНКОС», 2006. – 647 с.
3. Кляченко О. Л., Бородай В. В., Коломієць Ю. В. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник / М.Д. Мельничук, – Київ: ФОП Корзун Д. Ю., 2014. – 252 с.
4. Воронкова О.О. Біотехнологія : навч. посіб. / О. О. Воронкова, – Дніпро : Ліра, 2018. Т. 1. – 200 с.
5. Mendonça M., Barroca M., Collins T. Endo-1, 4- $\beta$ -xylanase-containing glycoside hydrolase families: Characteristics, singularities and similarities. *Biotechnology Advances*. 2023, 108148. doi: 10.1016/j.biotechadv.2023.108148.
6. Hui C. Y., Lee K. C., Chang Y. P. Cellulase-xylanase-treated Guava Purée by-products as Prebiotics Ingredients in Yogurt. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2022, 77 (2): 299-306. doi: 10.1007/s11130-022-00981-4.
7. Polizeli M. L. T. M., Rizzatti A. C. S., Monti R., Terenzi H. F., Jorge J. A., Amorim D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, 67 (5): 577–591. doi: 10.1007/s00253-005-1904-7.
8. Haltrich D., Nidetzky B., Kulbe K. D., Steiner W., Župančič S. Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology*. 1996, 58 (2): 137–161. doi: 10.1016/S0960-8524(96)00094-6.
9. Alokika, Singh B. Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. *Applied microbiology and biotechnology*. 2019, 103: 8763-8784. doi: 10.1007/s00253-019-10108-6.

10. Subramaniyan S., Prema P. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. *Crit Rev Biotechnol*. 2002, 22 (1): 33–64. doi: 10.1080/07388550290789450.
11. Kulkarni N., Shendye A., Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 1999, 23 (4): 411–456. doi: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x
12. Melnychuk M., Likhanov A., Kliuvadenko A., Voloshchuk N. Producers of phytotoxins in beech stands biocenoses. *Nature's Sustainable Development*. 2012, 2: 1–14.
13. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В. Карлаш - К: НУХТ, 2013. – 143 с.
14. Collins T., Gerday C., Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, 29 (1): 3–23. doi: 10.1016/j.femsre.2004.06.005.
15. Р.А. Чудак, Ю. М. Побережець, І. М. Купчук, В.С. Вугляр. Використання кормових добавок і комбикормів нового покоління у годівлі свиней та птиці: Монографія. Вінниця: ТВОРИ, 2022. С. 38-41. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://socrates.vsau.org/repository/getfile.php/31977.pdf>
16. Родіна О.В. Аналіз ринку м'яса птиці в Україні: сучасний вектор у контексті продовольчої безпеки. Підприємництво та інновації. -2022. -23: 91-96. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://ei-journal.in.ua/index.php/journal/article/view/501/488>
17. В.В. Мельник, Н.П. Прокопенко, С.М. Базиволяк. Птахівництво України у 2020 році: поголів'я птиці та виробництво яєць і м'яса. Сучасне птахівництво. -2021. -5-6: 222-223.
18. Скляренко О.В. Виробництво яєць та м'яса курей в Україні. Розвиток галузі тваринництва, інновації та перспективи. -2023. –с. 64-66. [Електронний ресурс].

[https://repo.btu.kharkov.ua/bitstream/123456789/41197/3/VNPK\\_%20Rozvytok\\_haluzi\\_tvarynnytstva\\_innovatsii%2C%20problemy%2C%20perspektyvy\\_2023-64-66.pdf](https://repo.btu.kharkov.ua/bitstream/123456789/41197/3/VNPK_%20Rozvytok_haluzi_tvarynnytstva_innovatsii%2C%20problemy%2C%20perspektyvy_2023-64-66.pdf)

19. Ронозим WX. Vyor. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vybor.in.ua/produkcziya/ronozim-wx/>

20. І. Ібатуллін, М. Кривенок, І. Ільчук. Використання триптофану у кормах для курчат-бройлерів. Тваринництво України. – 2013. -С. 18-22.

21. Bakri Y., Akeed Y., Thonart P. Comparison between continuous and batch processing to produce xylanase by *Penicillium canescens* 10-10c. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2012, 29 (3): 441–448. doi: 10.1590/S0104-66322012000300001.

22. Collins T., Gerday C., Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, 29 (1): 3–23. doi: 10.1016/j.femsre.2004.06.005.

23. Kulkarni N., Shendye A., Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 1999, 23 (4): 411–456. doi: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x

24. Melnychuk M., Likhanov A., Kliuvadenko A., Voloshchuk N. Producers of phytotoxins in beech stands biocenoses. *Nature's Sustainable Development*. 2012, 2: 1–14.

25. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В. Карлаш - К: НУХТ, 2013. – 143 с.

26. Буцяк В.І., Колотницький А.Г. Основи біотехнології: підручник / Буцяк В.І., Колотницький А. Г. – Львів: Тріада плюс, 2010. – 396 с.

27. Bakri Y., Jacques P., Thonart P. Xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2003, 105 – 108: 737-748. doi: 10.1385/abab:108:1-3:737.

28. Bakri Y., Jacques P., Shi L. K., Thonart P. Influence of a new axial impeller on KLa and xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002, 98 – 100: 1037-1048. doi: 10.1385/abab:98-100:1-9:1037.
29. Assamoi A. A., Delvigne F., Aldric J. M., Destain J., Thonart P. Improvement of xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid state fermentation. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 2008, 12: 111-118. doi: 10.1007/s12010-007-8077-z.
30. Bioreactors - Bioengineering AG. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bioengineering.ch/plants/bio-reactor>
31. Bakri Y., Akeed Y., Thonart P. Comparison between continuous and batch processing to produce xylanase by *Penicillium canescens* 10-10c. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2012, 29 (3): 441–448. doi: 10.1590/S0104-66322012000300001.
32. Повітрязабірник. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ravit.com.ua/vozduhozabornyk-kruglyj-o100-belyj/>
33. Карманный фильтр для вентиляции (G4). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tehno-parts.com.ua/karmannyi-filtr-dlia-ventiliatsii-g4>
34. Frascold R-TSH8-120-360Y. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://e-holod.com.ua/ru/kompressor/-kompressory-kholodilnye-/-kompressory-frascold/p11703n008>
35. Теплообмінник WHE 2010. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.paskal.ua/ua/product/teploobmennik-whe-2010\\_612.html](https://www.paskal.ua/ua/product/teploobmennik-whe-2010_612.html)
36. Ресивер Gardner Denver 8000 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://compressors.ua/resyvery/resivery\\_50\\_10000](https://compressors.ua/resyvery/resivery_50_10000)
37. Калорифер ПНЕ-30. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ukrvent.com/sfo-30-html/>
38. Карманный фильтр APF 3к F7. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://aff.com.ua/karmannyi-filtr-apf-287287360-3k-f7>

39. Megalam ProSafe MD14-2G10-1PU. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.camfil.com/en/products/epa-hepa-and-ulpa-filters/cleanroom-panels/megalam/megalam-prosafe-56266>
40. 50 Liter Stainless Steel Bioreactor. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bailunbio.en.made-in-china.com/product/COkfxoUDXaeW/China-50-Liter-Stainless-Steel-Bacteria-Bioreactor.html>
41. Хімічний лабораторний реактор s212 обсягом 30 літрів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://hms-ua.com/p1445436167-himicheskij-laboratornyj-reaktor.html?source=merchant\\_center&utm\\_source=a5o5\\_adwords&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=cid\\_20813693912\\_search&utm\\_term=&gclid=CjwKCAiAmsurBhBvEiwAbe-](https://hms-ua.com/p1445436167-himicheskij-laboratornyj-reaktor.html?source=merchant_center&utm_source=a5o5_adwords&utm_medium=cpc&utm_campaign=cid_20813693912_search&utm_term=&gclid=CjwKCAiAmsurBhBvEiwAbe-WPJGksfPvIxjrist2tVp2fuxgn0qBMoZ2dbgtRwz3FBISjpEC3yz1RxoCeXAQAvD_BwE)
42. Дозатор шнековий ваговий 1-10 кг ШД-1у. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://abctech.com.ua/ua/p1268259104-dozator-shnekovuj-vesovoj.html>
43. Насос-дозатор PDE eONE PLUS 30-05 100/250V. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.etatron.com.ua/ru/pumps/peristaltic\\_pumps/bh3-v/](https://www.etatron.com.ua/ru/pumps/peristaltic_pumps/bh3-v/)
44. Перистальтичний насос PDP TEC100 100-00 90-260V PHARMED. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/peristaltic\\_pumps/peristaltichniy-nasos-pdp-tec100-100-00-90-260v-pharmed/](https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/peristaltic_pumps/peristaltichniy-nasos-pdp-tec100-100-00-90-260v-pharmed/)
45. Centrifuge AFPX 517. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.alfalaval.com/globalassets/documents/products/separation/centrifugal-separators/disc-stack-separators/afpx517.pdf>
46. Ємність 30 л під замовлення. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://agrovektor.com.ua/physical\\_product/1004852-emkost-iz-nerzhaveyuschey-stali-30-l.html](https://agrovektor.com.ua/physical_product/1004852-emkost-iz-nerzhaveyuschey-stali-30-l.html)
47. Посівний апарат SB2500-Z об'ємом 500 л під замовлення. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kuhner.com/en/kuhner-technology/scale-up.php>

48. Stainless Steel Chemical Reactor 350 L під замовлення. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.indiamart.com/proddetail/stainless-steel-chemical-reactor-24668554512.html>
49. Дозатор ваговий FOYER FZ-5000 вібрлотковий прямої дії. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/fz-5000?pk\\_campaign=GoogleMerchant&gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiAmsurBhBvEiwA6e-WPB6\\_Ae4tPznLBBWFSduXdY0lpwo9q7H-\\_-zMuuvtkCKb32LErcfWuxoCcAEQAvD\\_BwE](https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/fz-5000?pk_campaign=GoogleMerchant&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAmsurBhBvEiwA6e-WPB6_Ae4tPznLBBWFSduXdY0lpwo9q7H-_-zMuuvtkCKb32LErcfWuxoCcAEQAvD_BwE)
50. Мембранний насос-дозатор D-BA 300/5 230/1/50 0,25. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/motor-diaphragm/membranniy-nasos-dozator-pdm-d-ba-300-5-400-3-50-0-25-2/>
51. Перистальтичний насос MP-1124-22. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/peristaltic\\_pumps/peristaltichniy-nasos-mp-1124-22/?gclid=CjwKCAiAmsurBhBvEiwA6e-WPDvrUPzTvjWTdeAvnT2zbIvZeteP2LQHEnmodmOzBxUirByDc3\\_olRoCDOgQAvD\\_BwE](https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/peristaltic_pumps/peristaltichniy-nasos-mp-1124-22/?gclid=CjwKCAiAmsurBhBvEiwA6e-WPDvrUPzTvjWTdeAvnT2zbIvZeteP2LQHEnmodmOzBxUirByDc3_olRoCDOgQAvD_BwE)
52. Culturefuge 100. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.alfalaval.com/globalassets/documents/products/separation/centrifugal-separators/disc-stack-separators/culturefuge-100.pdf>
53. Реактор miniPilot 10 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dlu.com.ua/Реактор-miniPilot>
54. 3500 Litre Stainless Steel Chemical Reactor. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.indiamart.com/proddetail/3500-litre-stainless-steel-chemical-reactor-tank-24971651488.html>
55. Ваговий дозатор сипучих матеріалів СБ-15. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vis.ua/product/bunkernyi-dozator-sypuchikh/>

56. Дозатор Mixtron MX. 300.P054. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://woodhoff.com/ptitsa/dozator-mixtron-mx-150-p054>
57. Перистальтический насос U-JET-120L-24. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.vicaqua.com.ua/industrial\\_pumps/pumping\\_stations/au-jet-120l/](https://www.vicaqua.com.ua/industrial_pumps/pumping_stations/au-jet-120l/)
58. Centrifuge ВТРХ 305. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.alfalaval.com/globalassets/documents/products/separation/centrifugal-separators/disc-stack-separators/btpx-series-btpx-305-s.pdf>
59. Скляний реактор з сорочкою s212 обсяг 50 літрів. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://hms-ua.com/p1445434727-steklyannyj-reaktor-rubashkoj.html?source=merchant\\_center&utm\\_source=a5o5\\_adwords&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=cid\\_20813693912\\_search&utm\\_term=&gclid=CjwKCAiAmsurBhBvEiwA6e-WPBESlxwUir5a\\_3s3\\_uFG9JJqdCi9yV8MomrJjE7NbZzrPknLPH0S1RoCRhkQAvD\\_BwE](https://hms-ua.com/p1445434727-steklyannyj-reaktor-rubashkoj.html?source=merchant_center&utm_source=a5o5_adwords&utm_medium=cpc&utm_campaign=cid_20813693912_search&utm_term=&gclid=CjwKCAiAmsurBhBvEiwA6e-WPBESlxwUir5a_3s3_uFG9JJqdCi9yV8MomrJjE7NbZzrPknLPH0S1RoCRhkQAvD_BwE)
60. 150L Chemical Lab Jacketed Glass Reactor. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://eshop.lab1st.com/products/150l-chemical-lab-jacketed-glass-reactor-vessel-with-digital-display-for-laboratory-reaction-distillation?variant=44940124193063&currency=USD&utm\\_medium=product\\_sync&utm\\_source=google&utm\\_content=sag\\_organic&utm\\_campaign=sag\\_organic&gclid=CjwKCAiAmsurBhBvEiwA6e-WPKw8QkeZFOggA1\\_OQkjPvflYV16b576mtUPRvwBGM-FIWCLRguD9ghoCoAQQAvD\\_BwE](https://eshop.lab1st.com/products/150l-chemical-lab-jacketed-glass-reactor-vessel-with-digital-display-for-laboratory-reaction-distillation?variant=44940124193063&currency=USD&utm_medium=product_sync&utm_source=google&utm_content=sag_organic&utm_campaign=sag_organic&gclid=CjwKCAiAmsurBhBvEiwA6e-WPKw8QkeZFOggA1_OQkjPvflYV16b576mtUPRvwBGM-FIWCLRguD9ghoCoAQQAvD_BwE)
61. Bailey M. J., Biely P., Poutanen K., Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*. 1992, 23 (3): 257-270.
62. Chandraju S., Kumar C. C., Venkatesh R. Estimation of reducing sugar by acid hydrolysis of black grape (*Vitis vinifera* L.) peels by standard methods. *J. Chem. Pharm. Res.* 2014, 6: 862-866.

63. Орябінська Л. Б., Дзигун Л. П., Поліщук В.Ю. Технологія продуктів мікробного синтезу: методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія / Уклад. Л.Б. Орябінська, Л.П. Дзигун, В.Ю. Поліщук. - К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. – 40 с.

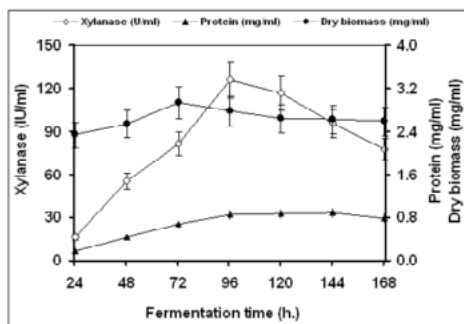
## Концентрація цільового продукту:

444

Y. Bakri, Y. Akeed<sup>1</sup> and P. Thonart

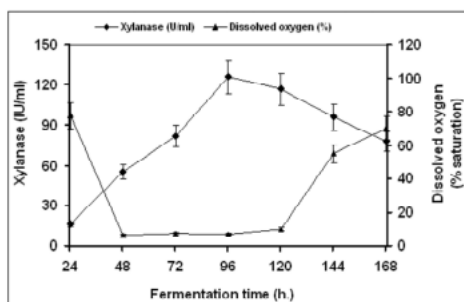
## Batch Culture

The cultivation of *P. canescens* was carried out on barley straw hydrolysate in batch bioreactor. The results obtained from the batch culture are presented in Fig. 1.



**Figure 1:** Xylanase production (U/mL) from *P. canescens* in batch culture in the 3 L bioreactor using barley straw hydrolysate obtained by treatment with water at 100 °C for 3 hours. The error bars are the lower and higher ranges of the data.

Initially, the fungus produced low concentrations of the studied enzyme, but with the passage of time there was gradual increase in xylanase synthesis up to 96 h. At the fourth day of incubation, the fungus efficiently synthesized the enzyme and gave 126 U/mL of xylanase, which decreased to 78 U/mL after six days of incubation. The dissolved oxygen change during cultivation of *P. canescens* is shown in Fig. 2.



**Figure 2:** Evolution of xylanase production (U/mL) and dissolved oxygen (%) during growth of *P. canescens* in batch culture in the 3 L bioreactor using barley straw hydrolysate obtained by treatment with water at 100 °C for 3 hours.

The DO decreased to about 7% of saturation after about 48 hours of cultivation. Previous studies

demonstrated that the decrease in DO can be attributed to biomass progressively increasing during the growth phase. In the second phase, the substrate, which contains enzyme inducers, was progressively depleted and shear rates can cause morphological as well as physiological changes in filamentous fungi, resulting in decreased biomass and xylanase production (Gaspar *et al.*, 1997; Gaspar *et al.*, 1998; Bakri *et al.*, 2002).

## Continuous Culture

One of the main drawbacks in industrial applications of enzyme catalysis is the relatively high cost of the biocatalyst. Therefore, the production of high amounts of biocatalyst at a low cost is critical. Thus, it would be extremely interesting to develop the technology for continuous production (Dominguez *et al.*, 2009). However, there are no reports dealing with xylanase enzyme production by *P. canescens* in continuous mode. With this aim, an experiment in continuous mode was carried out in a bioreactor with a barley straw hydrolysate medium. The continuous feeding was started 48 h after inoculation and xylanase production was determined during the culture process. Figure 3 shows the profiles of extracellular xylanase, soluble protein and biomass obtained during growth of *Penicillium canescens* in a continuous culture. Moreover, the feeding enabled a continuous xylanase production and the stability of enzyme activity obtained after 60 hours of culture. Xylanase production during the steady state was about 69 U/mL using a dilution rate of 0.05 h<sup>-1</sup>, as shown in Figure 3. The measured extracellular protein content showed a linear relationship to xylanase activity, indicating that the amount of xylanases in proportion to the total extracellular protein remained unchanged. The comparison between batch and continuous processing to produce xylanase from *P. canescens* is shown in Figure 4. The experiment in continuous culture confirmed the benefit of this type of culture for xylanase production. Although the xylanase concentration in the batch culture (126 U/ml) after 96 h of culture was higher than that in continuous culture (69 U/ml), the enzyme productivity obtained in continuous culture (3.46 U/ml/h) was approximately 2.64 and 7.47 times higher than that in batch culture (1.31 and 0.46 U/ml/h) after 96 and 168 h. of fermentation, respectively. This benefit of continuous culture in increasing enzyme productivity as a result of the more efficient use of the substrate has been reported by many investigators (Fencel and Pazlarová, 1982;

continuous production of xylanases with bacteria and fungi, mainly because of the problems associated with media containing insoluble xylan substrates (Tangnu *et al.*, 1981; Röthlisberger *et al.*, 1992). Lignocellulosic materials have often been used as carbon sources for xylanase production in submerged and solid fermentation processes (Gaspar *et al.*, 1997; Bakri *et al.*, 2003; Assamoi *et al.*, 2008). Solid substrates are, however, hard to handle, particularly if continuous or periodic feeding and broth removal are desired. To overcome these problems, natural solid raw materials are replaced by soluble substrates that promote good growth and induction of enzyme production. Several examples of the extraction of xylooligosaccharides by thermal treatment or with the aid of acidic or alkaline solutions have been reported (Pessoa Jr. *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2000; Lavarack *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Abril *et al.*, 2012). Therefore, in this study, barley straw hydrolysate was utilized as a soluble inducer for xylanase production from *Penicillium canescens* in batch and continuous culture.

## MATERIALS AND METHODS

### Microorganism

The *Penicillium canescens* 10-10c strain was supplied by G.I. Kvesidatse, Institute of Plant Biotechnology, Academy of Science, Tbilisi, Georgia. The strain was chosen for its ability to produce high cellulase-free xylanase activity (Gaspar *et al.*, 1997; Bakri *et al.*, 2003).

### Culture Medium

The culture medium used for xylanase production was composed of barley straw hydrolysate, mineral salts and yeast extract. The mineral salt medium contains (g/L): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 10, KCl 0.5, Yeast extract 5, and Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15. The pH was adjusted to 6.5 before sterilization. Barley straw hydrolysate was prepared as follows, 100 g of milled barley straw were treated with 1000 mL of distilled water or a solution of 1 M NaOH at 25, 60, 80, 100 °C for 3 hours and at 121 °C for 30 minutes. The liquid fraction was separated by centrifugation and used as the carbon source solution.

### Shake Flask Culture

The experiments were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of culture

medium. The flasks were sterilized at 121 °C for 20 min. 0.5 mL fresh spore suspension (containing around 10<sup>8</sup> spores/mL) was added to the sterilized medium. Fresh fungal spores were used as inocula and the flasks were incubated in an orbital shaker at 30 °C and 150 rpm for 5 days.

### Bioreactor Cultivation Conditions

A 3-L Electro-lab fermenter (Electro-lab limited, UK) was used as the base mechanical vessel for xylanase production from *Penicillium canescens* 10-10c in batch and continuous culture. The agitation system is made of two Rushton DT6 turbines. The diameter of these turbines was  $d = 50$  mm. The clearance above the base of the bioreactor and the distance between the two impellers were equal to the turbine diameter ( $d$ ). Fermentation was carried out on barley straw hydrolysate obtained from milled barley straw treated with 1000 mL of distilled water at 100 °C for 3 hours and the medium was supplemented with mineral salts and yeast extract as described above.

In batch culture, the bioreactor was filled with 1.5 L of culture medium and then sterilized at 121 °C for 20 min. After sterilization, the bioreactor was inoculated with a spore suspension to give a spore concentration of 10<sup>6</sup> spores/mL. A regulation system was used to control the temperature at 30 °C throughout the experiment. The sterile air flow rate was kept at 1 vvm. The impeller speed was maintained at 200 rpm for batch and continuous cultures. Foaming was controlled by the addition of 0.05% (v/v) Tego KS911 antifoam (Goldschmidt, Essen, Germany).

In continuous culture, the medium was pumped into the bioreactor by a peristaltic pump. The pump speed was regulated to pump 75 ml/hour of culture medium in order to reach a dilution rate of  $D=0.05$  h<sup>-1</sup>. The effluent was continuously discharged through a pump which had the same speed to allow the retention of 1.5 liter of culture medium in the bioreactor.

### Enzyme Activity and Protein Determination

Xylanase activity was determined according to Bailey *et al.* (1992) using 1.0% birchwood xylan in 0.05 M citrate buffer (pH 5) as substrate. Xylan solution and the enzyme at appropriate dilutions were incubated at 55 °C for 5 min and the reducing sugars were determined by the dinitrosalicylic acid method, with xylose as a standard (Miller, 1959). The released xylose was measured spectrophotometrically

## Визначення концентрації цільового продукту:

Biotechnology, Academy of Science, Tbilisi, Georgia. The strain was chosen for its ability to produce high cellulase-free xylanase activity (Gaspar *et al.*, 1997; Bakri *et al.*, 2003).

### Culture Medium

The culture medium used for xylanase production was composed of barley straw hydrolysate, mineral salts and yeast extract. The mineral salt medium contains (g/L): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 10, KCl 0.5, Yeast extract 5, and Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15. The pH was adjusted to 6.5 before sterilization. Barley straw hydrolysate was prepared as follows, 100 g of milled barley straw were treated with 1000 mL of distilled water or a solution of 1 M NaOH at 25, 60, 80, 100 °C for 3 hours and at 121 °C for 30 minutes. The liquid fraction was separated by centrifugation and used as the carbon source solution.

### Shake Flask Culture

The experiments were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of culture

was kept at 1 vvm. The impeller speed was maintained at 200 rpm for batch and continuous cultures. Foaming was controlled by the addition of 0.05% (v/v) Tego KS911 antifoam (Goldschmidt, Essen, Germany).

In continuous culture, the medium was pumped into the bioreactor by a peristaltic pump. The pump speed was regulated to pump 75 ml/hour of culture medium in order to reach a dilution rate of  $D=0.05\text{ h}^{-1}$ . The effluent was continuously discharged through a pump which had the same speed to allow the retention of 1.5 liter of culture medium in the bioreactor.

### Enzyme Activity and Protein Determination

Xylanase activity was determined according to Bailey *et al.* (1992) using 1.0% birchwood xylan in 0.05 M citrate buffer (pH 5) as substrate. Xylan solution and the enzyme at appropriate dilutions were incubated at 55 °C for 5 min and the reducing sugars were determined by the dinitrosalicylic acid method, with xylose as a standard (Miller, 1959). The released xylose was measured spectrophotometrically

*Brazilian Journal of Chemical Engineering*

at 550 nm. One unit of xylanase is defined as the amount of enzyme required to release 1 micromole of reducing sugar as xylose equivalent per min under the above assay conditions. The amount of total protein was determined according to the method of Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin (BSA) as a protein concentration standard.

### Biomass

Mycelial dry weight was determined by filtering the culture medium through pre-weighed Whatman No. 44 filter paper, washing twice with distilled water, and finally drying to constant weight at 80 °C and reweighing. The difference in weight denoted the mycelial growth of fungus.

## RESULTS AND DISCUSSION

The best xylanase production (54 U/ml) obtained in an Erlenmeyer flask was after treatment with warm distilled water at 100 °C for 3 hours. Thus, this condition was selected for subsequent batch and continuous cultures in a bioreactor. The NaOH treatment led to higher biomass formation compared to the treatment with water. However, this was not followed by an increased xylanase production. Many researchers have used lignocellulosic hydrolysates for enzyme production and have indicated that the oligosaccharides formed during the lignocellulose hydrolysis are believed to play important roles in enzyme induction (Palma *et al.*, 1996; Xiong *et al.*, 2005; Lo *et al.*, 2010). Deejing and Ketkorn (2009) found that hydrolysates obtained from pretreatment of lignocellulosic materials with 1.0 M NaOH showed high reducing sugar concentration. Results obtained from preliminary studies on xylanase production by *P. canescens* showed that xylanase expression

## Визначення концентрації вуглецю:

S. Chandraju *et al*

*J. Chem. Pharm. Res., 2014, 6(5):862-866*

Black grapes contain flavonoids that are very powerful antioxidants, which can reduce the damage caused by free radicals and slacken ageing. Good blood and body builder, it is also a quick source of energy [4].

The great advantage of wine as a matrix for polyphenols in the diet is that in wines they are present in soluble state and are hence more biologically available, in contrast with plant foods that contain their polyphenol compounds in polymeric, insoluble or strongly bonded forms and are thus less available for absorption. Most of the past research dealing with the analysis of polyphenols [5]

The black grape peels suppress the immune system [6], it upsets the mineral relationship in the body [7] sugar can increase fasting levels of glucose [8], and also sugar contribute to the reduction in defense against bacterial infection [9].

The importance of estimation of reducing sugar from black grape peel was various kinds of sugars and compound sugars are involved in bodily functions and as source of energy. Sugars are used as raw materials in food processing and pharmaceutical industries. More over utilization of the agro-industrial wastes for sugar production will be of immense benefit at preventing the pollution hazards associated with these waste.

### EXPERIMENTAL SECTION

#### REAGENTS USED

- Fehling A,
- Fehling B,
- Methylene Blue indicator,
- Benedict's quantitative reagent
- Ferric Alum:  $\text{KMnO}_4$
- Oxalic acid (AR)

The hydrolysis of black grape peels was carried out with constant stirring using 50 ml of 0.2N sulphuric acid in a hot plate, equipped with a temperature controller, and continuously shaken during the operation. Initially, 50mL of 0.2 N sulphuric acid solution (20 mesh) black grape peels were put into a beaker and kept on hot plate and the temperature of the mixture was maintained to about 65-70°C. The reaction was expected to be at constant temperature (isothermal), but before that temperature was achieved, reaction has occurred. It was neutralized to bring the pH to 7 by the addition of calcium carbonate and activated carbon, followed by filtration. The concentration of reducing sugar was analyzed by the following standard procedures (i, ii and iii).

(i) Bertrand's method [10] is based on the reducing action of sugar on alkaline solution of tartarate complex with cupric ion; the cuprous oxide formed is dissolved in warm acid solution of ferric alum. The ferric alum is reduced to  $\text{FeSO}_4$  which is titrated against standardized  $\text{KMnO}_4$ ; Cu equivalence is correlated with the table to get the amount of reducing sugar. This is based on the alkaline solution of tartarate complex of cupric ion.

(ii) In Lane-Eynon method [11] sugar solution is taken in a burette and known volume of Fehling solution is taken in conical flask. This is titrated at a temperature 65-70°C. Titration is continued till it acquires a very faint blue color. At this stage 3 drops of methylene blue indicator is added. The dye is reduced to a colorless compound immediately and the end point is changing of blue to red. In this method it is susceptible for interference from other type of molecules that act as reducing agent.

(iii) In Benedict's method pipette out benedict's quantitative reagent in to a clean conical flask. The contents were heated to a temperature of 60-70°C. Then it is titrated against unknown sample solution till the appearance of chalky white precipitate. a visual clear end point which turns blue to white by using potassium thiocyanate which converts the red cuprous oxide to white crystals of cuprous thiocyanate; it helps in visual view [12].

#### CHEMICAL REACTIONS

$\text{Cu}^+$  (Red precipitate)  $\rightarrow$   $\text{CuSCN}$  (White precipitate)