

Київ – 2021 р.

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячено розробленню технологічної схеми отримання ітаконової кислоти грибом *Aspergillus terreus*.

Технологічна схема біосинтезу ітаконової кислоти містить допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація титрувальних агентів, приготування підживлюючого розчину глюкози, підготовка та стерилізація піногасника, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес, що включає в себе вирощування посівного матеріалу, виробничий біосинтез, відділення міцелію, упарювання, кристалізацію, відділення кристалів, сушіння, подрібнення, пакування, маркування та відвантаження, а також знешкодження відходів.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, десяти розділів, 12 рисунків, 13 таблиць, списку використаної літератури (85 найменувань) та графічної частини (технологічна схема - формату A1, двох апаратурних схем – формату A1 та A2 та схема автоматизації – формату – A3), а також додатки. Загальний обсяг роботи – 133 сторінки.

Ключові слова: *Aspergillus terreus*, ітаконова кислота, біосинтез, ферментер, виділення.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	8
1.1. Історія відкриття	8
1.2. Фізико-хімічні властивості ітаконової кислоти.....	8
1.3. Застосування ітаконової кислоти	9
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	10
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	10
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	16
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	16
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	20
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	21
3.1. Потреба у цільовому продукті	21
3.1.1. Розрахунок річної потреби	21
3.2. Розрахунок потужності виробництва	26
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	26
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	21
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	30
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	30
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	31
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	33
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	33
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	33
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	36
5.1.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	38

5.1.4. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника	40
5.1.5. Вибір мийних і дезінфікуючих засобів	40
5.2. Обґрунтування стадій виділення та очищення цільового продукту	40
5.2.1. Вибір способу відділення та відповідного обладнання.....	43
5.2.2. Вибір способу упарювання та відповідного обладнання	48
5.2.3. Вибір способу кристалізації та відповідного обладнання	50
5.2.4. Вибір способу відділення кристалів та відповідного обладнання	52
5.2.5. Вибір способу сушіння та відповідного обладнання.....	53
5.2.6. Вибір способу подрібнення та відповідного обладнання	56
5.2.7. Вибір способу пакування, маркування та відвантаження та відповідного обладнання	56
5.3. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	56
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	61
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	66
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	81
8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів	81
8.2. Мікробіологічний контроль	86
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту	87
8.3.1. Концентрація біомаси	87
8.3.2. Концентрація ітаконової кислоти.....	87
8.3.3. Концентрація джерела Карбону та Нітрогену.....	88
8.4. Показники якості гтового продукту	90
8.4.1. Визначення вологовмісту	90
8.4.2. Визначення рН ітаконової кислоти	91
8.4.3. Визначення ступеня подрібнення порошку ітаконової кислоти	92
РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА.....	94

9.1 Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формуванням завдання на розробку системи автоматизації	94
9.2 Опис схеми автоматизації з специфікацією засобів автоматизації.....	98
РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	102
10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердин, рідких та газоподітних відходів	102
10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва	103
10.2.1 Системи знешкодження та утилізації рідких відходів	103
10.2.2 Системи знешкодження та утилізації твердих відходів.....	104
10.2.3. Системи знешкодження та утилізації газоподібних відходів.....	105
10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів	106
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	107

ВСТУП

Біотехнологія є однією з найбільш перспективних і прогресуючих галузей науково-технічної і промислової діяльності. З її розвитком пов'язано вирішення ряду важливих соціальних, сировинних, продовольчих і екологічних проблем. Світовий бізнес в біотехнологічній галузі переживає період підвищення інвестиційної активності в науковій, освітянській та промисловій сферах, стрімко зростає ринок біотехнологічної продукції медичного, сільськогосподарського та харчового призначення [1].

Органічні кислоти, зокрема ітаконова є однією з основних підкислювачів у харчовій промисловості, вона використовується або як кислота, або у вигляді ефірів для поліпшення властивостей вінілових полімерів [1].

Розширюється сфера застосування ітаконової кислоти в технічних цілях – в хімічній, текстильній, шкіряній, металургійній та інших галузях промисловості. Попит на дану органічну кислоту безперервно зростає, але в колишніх соціалістичних країнах він задовольняється вкрай слабо, тому в даний час організовуються нові виробничі потужності з випуску цих цінних продуктів [1].

Ітаконат міститься у складі синтетичного коагулянта БП-40И, що вводиться в латекс перед виділенням з нього каучука СКМС-10РКП. Встановлено, що для отримання 1 т каучука необхідно 0,1 кг синтетичного коагулянта, для приготування 1 л якого необхідно 164 г ітаконової кислоти [1].

Лимонну, оцтову та ітаконову кислоту виробляють головним чином шляхом мікробного синтезу, який є важливою галуззю біотехнології. Актуальними на сьогодні є питання модифікації існуючих та знаходження нових продуцентів ітаконової кислоти, впровадження сучасних досягнень біотехнології в область біосинтезу органічних кислот [1].

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ	Лім.	Арк.	Акрушів	
Розроб.		Шульган Я.В.							
Перевір.		Удимович В.М.					6	133	
Консультант						Кафедра БТМ ⁶			
Н.Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

Саме тому особливої уваги заслуговує штам *Aspergillus terreus* DSM 23081, який є перспективним промисловим продуцентом ітаконової кислоти. Оскільки за відносно низької вартості поживного середовища утворю високі концентрації ітаконової кислоти – 162 г/л, що в 2 рази вище, ніж у більшості вже відомих і застосовуваних продуцентів, які в середньому утворюють ≈ 80 г/л зазначеної кислоти [1].

Новизною роботи є використання високопродуктивного штаму *A. terreus* DSM 23081 для біосинтезу ітаконової кислоти, який синтезує цільовий продукт у високих концентраціях, порівняно з багатьма іншими продуцентами даної кислоти за умови росту на середовищі простому за складом і за мінімальних затрат на процес біосинтезу.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

1.1. Історія відкриття

У 1836 р. Баупом було описано виділення нової органічної кислоти, яку помилково було прийнято за лимонну кислоту, проте через два роки ця кислота отримала свою сучасну назву – ітаконова кислота (ІК). Ітаконова кислота була отримана як побічний продукт піролізу лимонної кислоти. Приблизно через сто років, у 1931 р. японським вченим Кіношита було описано ітаконову кислоту як одним з екзометаболітів *Aspergillus itaconicus*.

Через десять років було з бавовняної пряжі було виділено ще одного продуцента ітаконової кислоти – *A. terreus*. З цього часу *A. terreus* на довгий час став основним продуцентом ІК у промисловості [1].

1.2. Фізико-хімічні властивості ітаконової кислоти

Ітаконова кислота – це ненасичена двохосновна кислота, яка у великих кількостях утворюється пліснявими грибами. Наявність у молекулі двох карбоксильних груп й активної метиленової групи визначає високу активність полімеризації ітаконової кислоти й участь у різних реакціях приєднання (рис. 1.1) [2].

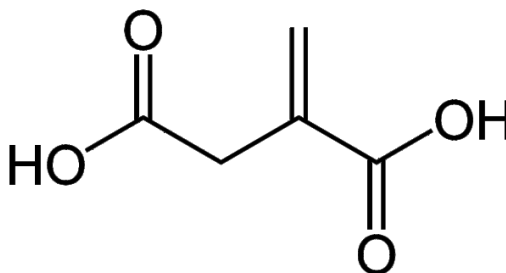


Рис. 1.1. Структурна формула ітаконової кислоти

Ітаконова кислота являє собою кристалічний порошок, який добре розчиняється у воді (8,3 г кислоти на 100 мл води), також розчинна в етанолі, метанолі, диоксані, проте майже не розчиняється в диетиловому ефірі та бензолі.

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шульган Я.В.			РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	Лім.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Удимович В.М.					8	133
Консультант						Кафедра БТМ 8		
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Молекулярна маса ІК становить 130,1 г/моль, щільність – 1,63 г/см³. Температура плавлення кристалів – 167- 168 °С [2].

В готовому до використання, товарному вигляді ітаконова кислота - це кристалічний порошок, де 92% безпосередньо становить сама ІК, а решта – волога (3-6%) та домішки інших кислот (1-3%) [3].

1.3. Застосування ітаконової кислоти

У 2004 році Міністерство енергетики США вибрало ітаконову кислоту як одну з хімічних речовин, які є перспективними для майбутньої біоекономіки. Це сприяло новим активним дослідженням та призвело до відкриття генів, які беруть участь у біосинтезі ітаконової кислоти. Ця кислота була вибрана в якості структурного блоку, оскільки схожа за своєю будовою на нафтохімічно вироблену малеїнову кислоту [2].

Ітаконова кислота може бути перетворена на такі промислово-важливі сполуки: метилбутандіол, бутиролактон або похідні тетрагідрофуранів. Також ІК може бути використана для утворення сополімерів зі стиролбутадієном і використовується для виробництва синтетичного латексу і є третім мономером у синтезі акрилу [4].

В сучасних умовах ітаконова кислота використовується як безпосередня мономерна одиниця утворення полі-ітаконової кислоти, яка є являє собою полімером з високою катіон-зв'язувальною здатністю [2].

Ітаконова кислота має широкий спектр використання у різних галузях промисловості: у технології обробки води, для виробництва високоміцних пластикових армованих скловолокном, миючих та лікарських засобів [4].

Для використання у промисловості ітаконову кислоту одержують переважно біотехнологічним шляхом, проте також існує і хімічний синтез. Проте серед недоліків останнього методу є його дороговартісність та відносно низький вихід ітаконової кислоти.

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

З кожним роком потреба на ітаконову кислоту безперервно зростає. Насамперед це зумовлено з мультифункціональністю цієї сполуки, можливістю її використання в складі поверхнево-активних речовин, миючих засобів, адгезивних засобів, барвників, інсектицидів, полімерних волокон (в тому числі в складі нітроволокна «нітрон»), високоякісних синтетичних смол, а також в складі фармацевтичних препаратів [4].

Станом на 2018 р. лідером у виробництві ІК був Китай, з обсягом виробництва ІК 14000 тон/рік. Проте на думку експертів з кожним роком потреба в ітаконовій кислоті зростає в середньому на 12%. Тому на сьогоднішній день все ще залишається відкритим питання пошуку надпродуцентів ітаконової кислоти [4].

Основним продуцентом ітаконової кислоти є *A. terreus*. Для отримання високих концентрацій цільового продукту застосовуються різні підходи інтенсифікації синтезу: зміна джерел вуглецю/азоту, умов культивування, а також маніпуляції в генетичному матеріалі продуцента.

Здатність до синтезу цієї органічної кислоти виявлена в *Ustilago maydis* [3], рекомбінантних штамів *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*. Проте найвідоміші продуценти ІК відносяться до роду *Aspergillus* [5, 6, 7].

Для порівняння здатності мікроорганізмів до синтезу ітаконової кислоти було обрано штами *A. terreus* DSM 826 [5], *A. terreus* DSM 23081 [6], *A. terreus* CICC40205 [7] та *Ustilago maydis* MB215 [3].

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Лім.	Арк.	Акрушів	
Розроб.		Шульган Я.В.							
Перевір.		Удимович В.М.					10	133	
Консультант						Кафедра БТМ 10			
Н.Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

Існує два способи культивування штамів *A. terreus* для одержання ітаконової кислоти – поверхневий (у кюветах на твердому поживному середовищі) та глибинний (виращування продуцента в рідкому середовищі при постійному перемішуванні та аерації). Обрані нами штами продуцентів виращують на рідкому поживному середовищі з високим вмістом цукрів (джерело вуглецю) і обов’язковою присутністю солей магнію та купруму.

Оскільки сам процес виробництва ітаконової кислоти трудомісткий, а використовувані джерела вуглецю – дороговартісні речовини (глюкоза, сахароза, ксилоза), то особливої уваги заслуговують технології в яких використовуються відносно дешеві субстрати, наприклад, гідролізат пшеничних висівків [7].

Узагальнююча характеристика технологічних особливостей отримання цільового продукту з використанням різних продуцентів наведено у табл. 2.1.

Особливості глибинного культивування *A. terreus* DSM 826, *A. terreus* DSM 23081, *A. terreus* CICC40205 та *Ustilago maydis* MB215 з метою одержання ітаконової кислоти

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація ІК, г/л	Тривалість, год	Особливості технологічного процесу	Використана література
<i>Aspergillus terreus</i> DSM 826	Глюкоза – 140; Кукурудзяний екстракт – 1,2; NH ₄ NO ₃ – 2,9; MgSO ₄ ×7H ₂ O – 1,8;	22,8	144	Культивування здійснювали при 37°C, pH 2,0, перемішування 220 об/хв	<i>Котелев М.С., Кожевникова Е.А., Бочкова Е.А., Барков А.В.</i> Практические аспекты работы с продуцентами итаконовой кислоты // Теоретические и прикладные проблемы АПК. – 2015. – Т. 3. – С. 35-39.
<i>Aspergillus terreus</i> DSM 23081	Глюкоза – 300; KH ₂ PO ₄ – 0,8; NH ₄ NO ₃ – 3; MgSO ₄ ×7H ₂ O – 1; CaCl ₂ ×H ₂ O – 5; FeCl ₃ ×6H ₂ O – 0,00167; ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,008; CuSO ₄ ×5H ₂ O – 0,015;	162,0	168	Культивування здійснювали за температури 35°C, pH 3,4 і перемішуванні 350 об/хв. При зниженні pH до 2,0 вносять NH ₄ OH до pH 3,4. Дробне внесення субстрату, коли глюкоза нижче 70 г/л (початкова конц. 180 г/л)	<i>Krull S., Hevekerl A., Kuenz A., Prüße U.</i> Process development of itaconic acid production by a natural wild type strain of <i>Aspergillus terreus</i> to reach industrially relevant final titers // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – V. 101, N10. – P. 4063–4072. doi:10.1007/s00253-017-8192-x

<i>Aspergillus terreus</i> CICC 40205	Гідролізат пшеничних висівок – 100; Кукурудзяний сироп – 2; NH ₄ NO ₃ – 3; KH ₂ PO ₄ – 0,2; MgSO ₄ ×7H ₂ O – 3; FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,16; ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,15;	49,65	120	Культивування здійснювали при 32°C, pH 2,5, перемішування 300 об/хв	<i>Wu X., Liu Q., Deng Y., et al.</i> Production of itaconic acid by biotransformation of wheat bran hydrolysate with <i>Aspergillus terreus</i> CICC40205 mutant // Bioresour. Technol. – 2017. – V. 241. – P. 25–34. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.080
<i>Ustilago maydis</i> MB215	Глюкоза – 200; NH ₄ Cl – 4; MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,2; FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,01; KH ₂ PO ₄ – 0,5; Дріжджовий екстракт – 1;	63,2	168	Культивування здійснювали за температури 30°C, pH 6,0–6,5, перемішування 700 об/хв. Дробне внесення глюкози з 96 год	<i>Geiser E., Przybilla S.K., Engel M., et al.</i> Genetic and biochemical insights into the itaconate pathway of <i>Ustilago maydis</i> enable enhanced production // Metab. Eng. – 2016. – V. 38. – P. 427–435. doi: 10.1016/j.ymben.2016.10.006

Найвищі показники синтезу ітаконової кислоти показали *A. terreus* DSM 23081 і *U. maydis* MB215 (162,0 і 63,2 г/л відповідно) за 168 год. Дещо нижчі концентрації ІК (49,65 г/л) синтезував *A. terreus* CICC 40205 за 120 год росту.

Найменш продуктивним виявився штам *A. terreus* DSM 826, який утворював тільки 22,8 г/л цільового продукту.

Згідно табл. 2.1 кращими продуцентами ітаконової кислоти є штами *A. terreus* DSM 23081, *U. maydis* MB215 та *A. terreus* CICC 40205, тому саме ці мікроорганізми будуть надалі порівнюватися за іншими критеріями, оскільки порівняння самого технологічного процесу не є недостатнім (табл. 2.1).

З метою вибору найбільш промислово рентабельного продуцента ІК подальший вибір кращого біологічного агента ґрунтуватиметься на вартості поживного середовища (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування
продуцентів ітаконової кислоти**

Біологічний агент	Концентрація кожного компонента середовища, г/л	Ціна компонента поживного середовища, грн/кг	Вартість компонента (грн) для приготування 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Aspergillus terreus</i> DSM 23081	Глюкоза – 300	19,50	6,24	[1]
	KH ₂ PO ₄ – 0,8	55,00	0,044	[2]
	NH ₄ NO ₃ – 3	15,00	0,045	[1]
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 1	50,00	0,05	[3]
	CaCl ₂ ×H ₂ O – 5	45,00	0,225	[1]
	FeCl ₃ ×6H ₂ O – 0,00167	110,00	0,002	[2]
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,008	40,00	0,0003	[4]
	CuSO ₄ ×5H ₂ O – 0,015	125,00	0,002	[2]
Вартість 1 л середовища – 6,61 грн				
<i>Aspergillus terreus</i> CICC 40205	Гідролізат пшеничних висівок – 100;	33,33	3,33	[1]

	Кукурудзяний сироп – 2	80,00	0,16	[1]
	NH ₄ NO ₃ – 3	15,00	0,045	[1]
	KH ₂ PO ₄ – 0,2	55,00	0,011	[2]
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 3	50,00	0,15	[3]
	FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,16	3,50	0,0001	[1]
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,15	40,00	0,006	[4]
	Вартість 1 л середовища – 3,70 грн			
<i>Ustilago maydis</i> MB215	Глюкоза – 200	19,50	3,9	[1]
	NH ₄ Cl – 4	113,40	0,45	[1]
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,2	50,00	0,01	[3]
	FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,01	3,50	0,00004	[1]
	KH ₂ PO ₄ – 0,5	55,00	0,03	[2]
	Дріжджовий екстракт – 1	936,00	0,94	[1]
	Вартість 1 л середовища – 5,33 грн			

Примітка. 1 - <https://prom.ua> ; 2- <https://him-component.com.ua> ; 3 - <https://ecovod.biz> ; 4 - <https://prostorhim.com.ua> ;

З даних, наведених в табл. 2.2, найнижча вартість (3,70 грн) поживного середовища становить у *A. terreus* CICC 40205. Дана ціна значно відрізняється від вартість 1 л поживного середовища для культивування *U. maydis* MB215 (5,33 грн) та *A. terreus* DSM 23081 (6,61 грн). Зазначимо, що останній продуцент є найбільш перспективним, оскільки у високих концентраціях накопичує ІК (162,0 г/л). Тому для остаточного визначення найефективнішого продуцента варто розрахувати умовну вартість 1 г цільового продукту – ітаконової кислоти (табл. 2.3). Адже прибуток всього виробництва певним чином залежить від собівартості продукту. Чим нижча його вартість, тим менші затрати на його виготовлення, відповідно більше ресурсів для випуску нових серій продукції. Саме це примножує прибуток всього виробництва.

Умовна вартість 1 г ітаконової кислоти при культивуванні *A. terreus* DSM 23081, *A. terreus* CICC40205 та *Ustilago maydis* MB215

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація ІК, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утворених ІК за 1 год, г/год
<i>Aspergillus terreus</i> DSM 23081	6,61	162,0	0,04	168	0,96
<i>Aspergillus terreus</i> CICC 40205	3,70	49,65	0,07	120	0,41
<i>Ustilago maydis</i> MB215	5,33	63,2	0,08	168	0,38

Узагальнюючи дані, наведені в табл.2.2 і 2.3, зазначимо, що істотна перевага належить штаму *A. terreus* DSM 23081. Оскільки даний штам є найбільш активним продуцентом ітаконової кислоти, утворюючи 162,0 г/л ІК за 168 год культивування. Окрім того умовна вартість 1 г ІК, синтезованої штамом DSM 23081, є найнижчою і становить 0,05 грн, що в 1,5-2 рази нижче, ніж вартість ІК, утвореної іншими продуцентами.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування – 168 год, концентрація ітаконової кислоти 162 г/л, концентрація біомаси 22 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу ітаконової кислоти. Як джерело вуглецевого живлення для біосинтезу ітаконової кислоти використовується глюкоза.

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 162 г ітаконової кислоти. Молекулярна маса ітаконату $C_5H_6O_4$ становить 130 г/моль. Отже, у 130 г ітаконової кислотиміститься 60 г Карбону, а в 162 г ітаконату $(162 \times 60) / 130 = 74,8$ г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах вуглеводів міститься 74,8 г Карбону. Молекулярна маса глюкози становить 180 г/моль. Отже, у 180 г глюкози міститься 72 г Карбону, а 74,8 г Карбону міститься у $(180 \times 74,8) / 72 = 187$ г глюкози. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на таких вуглеводах як глюкозі близько 40 % субстрату окиснюється до CO_2 , то для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме $(187 \times 0,4) + 187 = 262$ г/л.

Потреба для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 22 г біомаси становить $22 \times 0,5 = 11$ г. Знаючи, що молекулярна маса глюкози становить 180 г/моль. То у 180 г глюкози міститься 72 г Карбону, а 11,0 г Карбону міститься у $(180 \times 11,0) / 72 = 27,5$ г глюкози.

Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 27,5 г/л біомаси у середовище необхідно внести $(27,5 \times 0,4) + 27,5 = 38,5$ г глюкози.

Отже, загальний вміст глюкози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (22 г/л) та ітаконової кислоти (162 г/л), становить $262 + 38,5 = 300,5$ г.

Потрібно мати на увазі, що така кількість субстрату (300 г/л) не може бути внесена у середовище одразу, початкова концентрація глюкози у середовищі культивування становить 180 г/л, а решта субстрату (120 г/л) вноситься у процесі культивування порціями – дробно (так зване підживлення). Розрахунок кількості порцій підживлення та склад підживлювального розчину наведений нижче.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Як джерело азотного живлення для біосинтезу ітаконової кислоти використовується амоній нітрат.

Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 22 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 2,2 г.

Розрахуємо кількість нітрату амонію, необхідну для одержання 22 г/л біомаси. Молекулярна маса NH_4NO_3 становить 80. Отже, у 80 г нітрату амонію

міститься 28 г Нітрогену (N), тоді 2,2 г Нітрогену буде міститись у $(80 \times 2,2)/28 = 6,3$ г солі.

Для одержання 22 г/л біомаси вміст NH_4NO_3 у середовищі культивування повинен становити 6,3 г/л (концентрація солі за прописом 3,0 г/л), проте варто звернути увагу, що приготування додаткового підживлюючого розчину азотного живлення непотрібне, адже в процесі культивування в середовище вноситься амоній гідрооксид для підлучення середовища і разом з тим як додаткове джерело азоту.

Розрахунок складу глюкозного підживлювального розчину

У вигляді підживлювального розчину в середовище необхідно внести у процесі культивування продуцента ітаконової кислоти 120 г/л глюкози. Тривалість культивування становить 168 год. Прийmemo, що підживлення починає додаватися у середовище з 72 год культивування, коли концентрація глюкози падає нижче позначки 50 г/л, тобто підживлення буде проходити упродовж останніх $168 - 72 = 96$ год культивування. Прийmemo, що підживлення буде подаватися кожні 24 год. Тоді кількість порцій підживлення становить $(96 - 24)/24 = 3$. Отже, з кожною порцією підживлення у середовище повинно вноситись $120/3 = 40$ г/л глюкози.

Наведений вище розрахунок складу поживного середовища можна представити у вигляді табл. 2.4.

Таблиця 2.4

Склад поживного середовища для культивування продуцента ітаконової кислоти

Компонент	Вміст, г/л			
	Сумарний	Початковий	У глюкозному підживленні	У одній порції
Глюкоза	300	180	120	40
KH_2PO_4	0,8	0,8	—	—
NH_4NO_3	3,0	3,0	—	—
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,0	1,0	—	—
$\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	5,0	5,0	—	—
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,002	0,002	—	—
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,008	0,008	—	—
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,015	0,015	—	—

Підсумовуючи варто сказати, що по всіх порівнюваних критеріях лідером серед продуцентів ітаконової кислоти є *A. terreus* DSM 23081, тому як біологічний агент для виробничого біосинтезу слід обрати саме його.

Перевірочний розрахунок складу поживного середовища показує необхідність у підживлюючому розчині глюкози, який у процесі біосинтезу буде подаватися тричі порціями по 40 г/л.

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

Aspergillus terreus має конідіальні голівки, компактні, густо стовпчасті, досягаючи діаметра $500 \times 30\text{--}50$ мкм. Конідіофори *A. terreus* гладкі та гіалінові до $100\text{--}250 \times 4\text{--}6$ мкм в діаметрі. Конідії невеликі, діаметром близько 2 мкм, округлої форми, гладкостінної форми і можуть змінюватися від світло-жовтого до гіалінового. Унікальним для цього виду є вироблення безстатевих спор, що утворюються безпосередньо на гіфах, які є більшими за фіалоконідії (наприклад, діаметром 6–7 мкм).

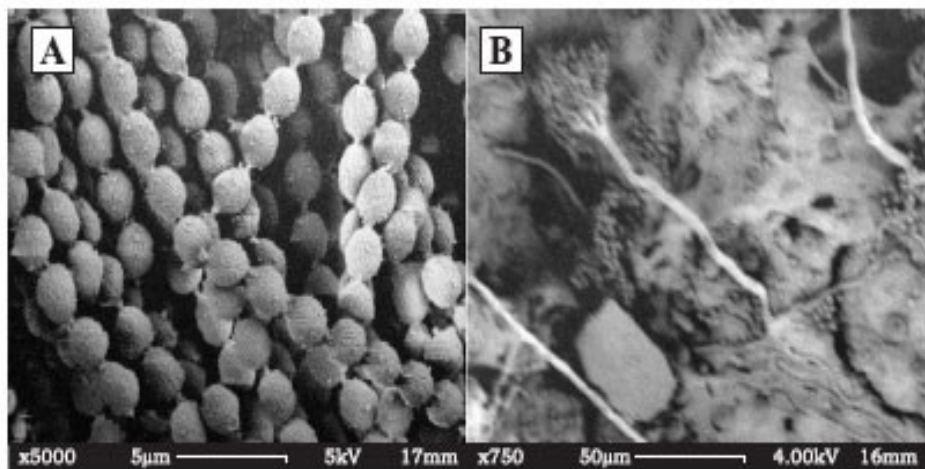


Рис. 3.1 А – форма клітин *A. terreus* при збільшенні x5000

В – форма клітин *A. terreus* при збільшенні x750 [8]

Aspergillus terreus має коричневий колір і стає темнішим у міру старіння на культуральних середовищах. На середовищі Чапека або екстракту солоду з екстрактом солоду (МЕА) при 25°C (77°F) колонії мають умови для швидкого

росту та мають гладкі стінки. У деяких випадках вони здатні перетворюватися на флокозу, досягаючи м'яких пучків, схожих на волосся. Колонії на агарі з екстрактом солоду ростуть швидше і спорюються густіше, ніж на багатьох інших середовищах [8].

A.terreus - має оптимальний ріст температур між 35–40 ° С і максимальний приріст в межах 45–48 ° С [9].

Aspergillus terreus продукує ряд вторинних метаболітів і мікотоксинів, включаючи територіум А, цитреовіридин, цитринін, гліотоксин, патулін, терреїн, терареїнову кислоту та терретонін. Гриб також виробляє вторинний метаболіт, який називається ловастатин, потужний препарат для зниження рівня холестерину в крові у людей і тварин. Це інгібітор одного з ферментів, відповідальних за етапи каталізації біосинтезу холестерину [9,10].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *A. terreus* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій:

- Домен: *Eukaryota*
- Царство: *Fungi*
- Підцарство: *Dikarya*
- Відділ: *Ascomycota*
- Підвідділ: *Pezizomycotina*
- Клас: *Eurotiomycetes*
- Підклас: *Eurotiomycetidae*
- Порядок: *Eurotiales*
- Родина: *Aspergillaceae*
- Рід: *Aspergillus*
- Вид: *Terreus* [9].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

У даному курсовому проекті пропонується використання ітаконової кислоти *Aspergillus terreus* DSM 23081 для виробництва синтетичного коагулянта для виділення каучука емульсійної полімеризації з латексу.

Обґрунтування необхідності підбору синтетичного коагулянта для виділення каучука

Традиційним способом виділення каучуку з латексу, зокрема бутадієн-нітрильних (БНК), є застосування хлориду натрію, витрата якого складає від 1-2 тонни на 1 тонну каучуку в залежності від марки. При цьому весь хлорид натрію скидається в стічні води, забруднюючи їх та погіршуючи екологію. Крім того, при виділенні утворюється багато дрібної, пилоподібної крихти, яка втрачається зі стічними водами [11, 12].

У доступній літературі наведено сучасні методи виділення каучуку, які умовно поділяють на фізичні, механічні та хімічні.

Фізичні способи – це коагуляція нагріванням або виморожуванням. Нагрівання латексу з подальшим виділенням каучуку здійснюється на гарячому барабані, що нагрівається "глухою" парою або в соплах, або в шнекових машинах гострою парою. Однак ці способи промислового застосування не знайшли.

Коагуляція виморожуванням здійснюється на виморожувальних барабанах і використовується при виробництві хлоропренових каучуків.

Відомий спосіб виділення каучуку охолодженням вуглекислотою або рідким бутадієном. Цей спосіб також має суттєві недоліки через високу небезпеку виробництва і труднощі технологічного оформлення [11, 12].

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушів	
Розроб.		Шульган Я.В.							
Перевір.		Удимович В.М.					21	133	
Консультант						Кафедра БТМ 21			
Н.Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

Хімічні варіанти виділення каучуку з латексів включають способи із застосуванням солей одно-, дво- або трьох валентних металів, складних білкових сполук, синтетичних амінних коагулянтів, четвертинних амонієвих солей і полікарбонових кислот [11].

Основні роботи з коагуляції емульсійних каучуків, включаючи БНК, отриманих з використанням в якості емульгаторів мил жирних кислот або їх сумішей з милом каніфолі чи з алкілсульфокислотами, пов'язані з використанням амінних поліелектролітів або четвертинних амонієвих солей, а також білків тваринного/ рослинного походження, але витрата білків досить висока (7,0-15,0 кг / т каучуку).

Механізм дії цих коагулянтів передбачає утворення водонерозчинних комплексів з компонентами латексів (алкілсульфонатом, сульфанолам і лейканолом). Останні практичні повністю залишаються в каучуку, змінюючи його якісні показники. Вміст комплексів сульфовмісних компонентів з синтетичними коагулянтами становить 35 - 40 кг на тонну каучуку [12].

Наявність такої кількості домішок особливо неприйнятно для БНК, що застосовуються у виробках спеціального призначення з підвищеною морозо- і бензостійкістю.

Найбільш близьким технічним рішенням, що дозволяє істотно скоротити витрату хлориду натрію при виділенні каучуків з латексів, стабілізованих емульгаторами, що містять сульфогрупи або мила карбонових кислот, є використання синтетичного коагулянту в кількості 0,005 - 1,0 кг на тонну каучуку з подальшим введенням електроліту (хлориду натрію) і витримуванням латексу без перемішування при температурі 30 - 70 °C протягом 1-40 хв [11, 12].

При його синтезі і застосуванні були виявлені такі недоліки:

- застосування токсичного малеїнового ангідриду і необхідність його переведення в малеїнову кислоту;

- використання в якості розчинника ацетону, що має температуру кипіння 56°C, що створює небажаний надлишковий тиск в реакторі при необхідній температурі полімеризації 70 - 75 ° C;
- відносно невисока ефективність коагулянту.

Наприклад, при виділенні каучуку СКН-18СНТ без синтетичного коагулянту витрата хлориду натрію становить близько 2 т на 1 т каучуку. При додаванні синтетичного коагулянту БП-40 в максимально можливій кількості - 1,0 кг/т каучуку, витрата хлориду натрію знижується до 1,0 т/т каучуку.

Тому нагальною проблемою, яка вимагає рішення, є підвищення ефективності синтетичного коагулянту, спрощення технології його синтезу, зниження витрати хлориду натрію [11].

Дана мета досягається шляхом додавання в латекс синтетичних коагулянтів, що представляють собою лужні або амонійні солі сополімерів α , β -ненасичених кислот з алкілакрилатами/метакрилатами, а також мінеральних солей, кислот або їх сумішей, що відрізняється за наступними критеріями:

- в якості синтетичного коагулянту використовується сіль сополімеру бутилметакрилата з ітаконовою кислотою з вмістом ітаконової кислоти 20-40 мольних відсотків;
- сополімер бутилметакрилата з ітаконовою кислотою використовується у вигляді водного розчину з діетаноламіном, взятих у співвідношенні сополімер: діетаноламін - 1,0: (0,2 - 0,3) мас. частин відповідно;
- витрата синтетичного коагулянту становить 0,1-0,7 кг на тонну каучуку, що міститься в латексі.

Застосування такого рішення забезпечує ефективну коагуляцію при істотному зниженні неорганічних електролітів, наприклад, витрата хлориду натрію може бути знижена до 100 кг на тонну каучуку, тобто в 10 разів менше ніж за прототипом [11, 12].

Ітаконова кислота – нетоксичний продукт, четвертого класу небезпеки, CAS №97-65-4 [13].

Ітаконова кислота (ІтК, метиленбутандіова кислота; метилентантарна кислота, 3-карбокси-3-бутенова кислота, пропілендикарбонова кислота) є однією із перспективних сполук, що відносяться до класу дикарбонових кислот.

Ітаконова кислота– це біла кристалічна речовина, що містить карбоксильну групу, зв'язану подвійним зв'язком (рис. 1).

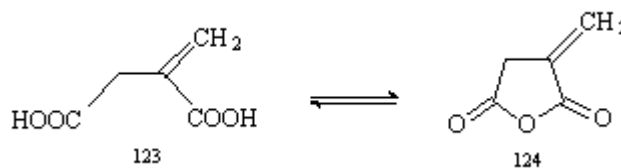


Рис. 3.1. Будова ітаконової кислоти та її ангідриду.

Дана сполука стабільна в кислому, нейтральному і слаболужному середовищах при помірних температурах [13].

Внаслідок наявності двох карбоксильних груп, використання її як сомомера навіть за низьких концентрацій призводить до утворення сополімера з ефективною кислотністю і зумовлює кращу адгезію з підвищеною стабільністю латексу.

Слід згадати і про практичне використання даної речовини. Ітаконова кислота використовується або як кислота, або у вигляді ефірів для поліпшення властивостей вінілових полімерів. Значна частка ітаконової кислоти використовується у вигляді складних ефірів, отримання яких ґрунтується на реакції зі спиртами самої кислоти або її ангідриду в присутності кислотного каталізатора з виходами до 80% [13].

Полімеризовані метилові, етилові або вінілові ефіри використовуються в якості пластиків, адгезивів і покриттів. Акрилові полімери з додаванням ітаконової кислоти використовуються при виробництві нетканих матеріалів. Невеликі кількості (<2%) кислоти, які додають до покриттів на основі

вініліденхлорида, спричиняють покращену адгезію до паперу, целофану, що використовується в якості пакувальних матеріалів.

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

Сполуки на основі моноефірів ітаконової кислоти мають дуже високу твердість, міцність і характеризуються довговічністю, тому вони знайшли застосування і в стоматології. Крім цього, деякі моно- і диефіри ітаконової кислоти мають істотні протизапальні та болезаспокійливі властивості [13].

3.1.1. Розрахунок річної потреби

Ітаконова кислота міститься у складі синтетичного коагулянта БП-40И, що вводиться в латекс перед виділенням з нього каучука СКМС-10РКП. Встановлено, що для отримання 1 т каучука необхідно 0,1 кг синтетичного коагулянта, для приготування 1 л якого необхідно 164 г ітаконової кислоти [14].

Згідно статистичних даних, у другому кварталі 2020 року світове споживання каучуку становить 5,4 млн тонн.

Для подальших розрахунків доцільним буде обрати 10% від загальної світової потреби тоді потреба каучуку складе 540 000 тонн.

Оскільки для отримання 1 тонни каучука необхідно 0,1 кг синтетичного коагулянта із вмістом ітаконової кислоти 16,4 г, то для виділення 540 000 т необхідно 54 000 кг коагулянту, для приготування якого необхідно 885 600 г або 885,6 кг ітаконової кислоти.

Таким чином, для забезпечення виділення 540 000 т каучуку необхідно 885,6 кг ітаконової кислоти.

Дану кількість ІК можна отримати при культивуванні гібридного штаму *Aspergillus terreus* DSM 23081, який продукує 162 г/л цієї речовини за 168 годин. Тому для отримання 885600 г ітаконової кислоти необхідна наступна кількість культуральної рідини:

$$A = \frac{885\,600}{162} = 5466,6 \text{ л}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (40%), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини [14]:

$$B = \frac{5466,6}{1-(0,3+0,1)} = 9111 \text{ л}$$

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Ітаконову кислоту використовують у різних промислових галузях. Однак, наш проєкт націлений на розроблення нової технології, що передбачає використання ітаконату для виробництва автомобільних шин (що є екологічно доцільніше).

В Україні немає підприємств, що використовують дану новітню технологію. Враховуючи все вищесказане, обираємо потужність виробництва у 885,6 кг.

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Розрахуємо кількість культуральної рідини яку необхідно отримати за цикл ферментації, для подальшого розрахунку кількості стадії приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) = 180, тоді кількість продукту на добу (V_d) становитиме:

$$V_d = \frac{C}{T_{рд}} = \frac{9111}{180} = 50,61$$

Кількість продукту за цикл ($V_{пц}$) буде становити:

$$V_{пц} = \frac{K_1 * V_d * T_{цф}}{24} = \frac{1,3 * 50,61 * 175}{24} = 479,74 \text{ л/цикл}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (168 год) та час підготовки ферментера до роботи (7 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій $K_1 = 1,3$. Підготовка ферментера включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

479,74 л культуральної рідини ($V_{\text{цк}}$) можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_{\Gamma} = \frac{V_{\text{пц}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{479,74}{0,6} = 799,56 \text{ л}$$

$K_{\text{зап}} = 0,6$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_{\Gamma} = 1 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення $K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{пц}}}{V_{\Gamma}} = \frac{479,74}{1000} = 0,47$, не перевищує задане значення, отже дане значення залишаємо незмінним.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримуємо $V_{\text{пц}} = 479,74$ л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини враховуємо її втрати в результаті краплєвиносу через колектор відпрацьованого повітря (E_{Φ}), які становлять 15%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{пц}}}{1 - E_{\Phi}} = \frac{479,74}{1 - 0,1} = 533,04 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера (V_{Φ}), що становить:

$$V_{\Phi} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{533,04}{0,6} = 888,4 \text{ л}$$

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

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\Phi}} = \frac{533,04}{1000} = 0,53$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\Phi 1}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + E_{\Phi 1}} = \frac{533,04}{1 + 0,1} = 484,58 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 533,04 - 484,58 = 48,5 \text{ л}$$

Для одержання 48,5 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті крапливиносy через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\text{ф2}}$), які становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{48,5}{1 - 0,1} = 53,8 \text{ л}$$

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

$$V_{\text{ф1}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{53,8}{0,6} = 89,6 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ф1}} = 0,1 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{ф1}}} = \frac{53,8}{100} = 0,53$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\text{ф2}}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + E_{\text{ф2}}} = \frac{53,8}{1 + 0,1} = 48,9 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 53,8 - 48,9 = 4,9 \text{ л}$$

Для одержання 4,9 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті крапливиносy через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\text{ф3}}$), які становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ф3}}} = \frac{4,9}{1 - 0,1} = 5,4 \text{ л}$$

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

$$V_{\text{ф2}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{5,4}{0,6} = 9 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ф2}} = 0,01 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\text{ф2}}} = \frac{5,4}{10} = 0,54$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\text{ф3}}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + E_{\text{ф3}}} = \frac{5,4}{1 + 0,1} = 4,9 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 5,4 - 4,9 = 0,5 \text{ л}$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{пм3}} = 0,5 \text{ л}$ можна одержати культивуванням *A. terreus* DSM 23081 у колбах на качалці. Для цього використовуємо качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становить:

$$N = \frac{V_{\text{пм3}}}{V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}} = \frac{500}{750 * 0,2} = 3,3$$

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

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу ІК у ферментері об'ємом 1 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 відбуватиметься у три етапи.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю та енергії при вирощуванні *Aspergillus terreus* DSM 23081 є глюкоза.

Так як у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes відсутня інформація про шляхи катаболізму ростового субстрату у штаму *Aspergillus terreus* DSM 23081, тому для побудови шляху метаболізму глюкози обираємо серед наявних мікроорганізмів даного роду один з яких *Aspergillus flavus*.

Базуючись на таких припущення та використовуючи як основу для створення катаболічного шляху глюкози катаболізм цукрі – гліколіз (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), що представлений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes для мікроорганізма *A. flavus*, наводимо схему перетворення глюкози (рис 4.1, дод. 5).

Глюкоза за участю гексокінази (КФ 2.7.1.1) перетворюється на глюкозу 6-фосфат, де остання за дії глюкозо-6-фосфат ізомерази (КФ 5.3.1.9) перетворюється на фруктозу-6-фосфат.

Фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11) активує перетворення фруктози-6-фосфат у фруктозу-1,6-дифосфат. Ферментативна дія фруктозодифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на фруктозу-1,6-дифосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід 3-фосфат та діоксіацетонфосфат, який під дією тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід 3-фосфат . До подальшого катаболізму глюкози залучається гліцеральдегід 3-фосфат , під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) він перетворюється на гліцерат 1,3-фосфат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3)

переходить у гліцерат 3-фосфат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на гліцерат 3-фосфат

індукує його перетворення на гліцерат 2-фосфат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) гліцерат 2-фосфат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40) [15].

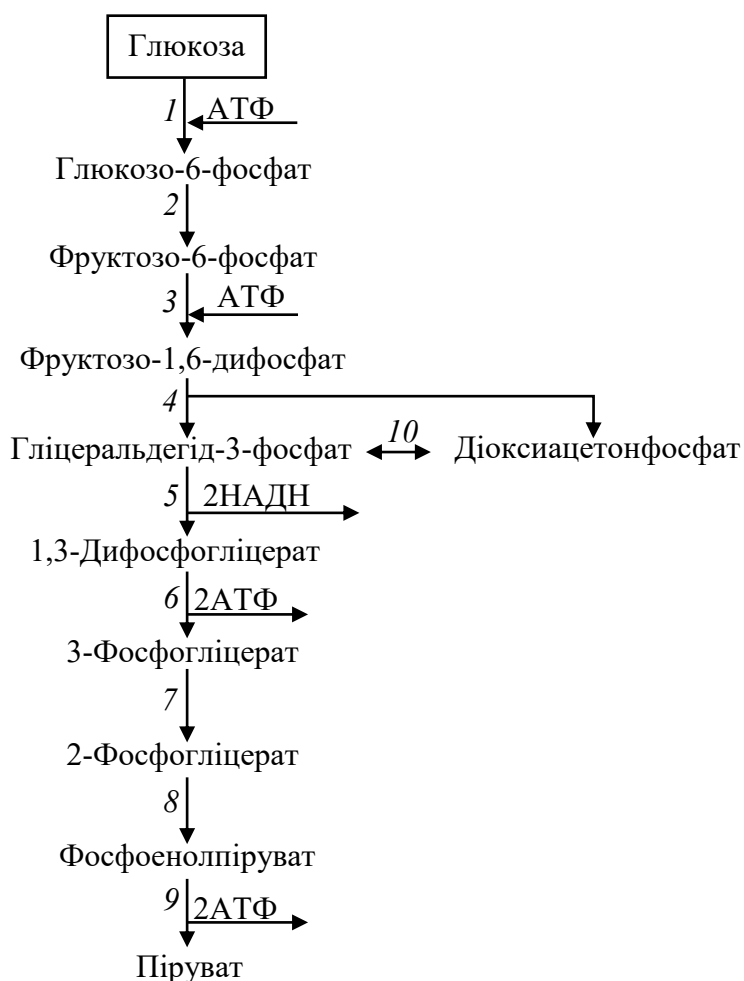


Рис 4.1. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Месейргофа-Парнаса

Ферменти: гексокіназа [КФ 2.7.1.1]; 2- глюкозо-6-фосфатна ізомераза [КФ 5.3.1.9]; 3- Фосфоглюкокіназа (глюкокіназа) [КФ 2.7.1.11]; 4- фруктозодифосфат альдолаза [КФ 4.1.2.13]; гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа [КФ 1.2.1.12]; фосфогліцераткіназа [КФ 2.7.2.3]; 7- фосфогліцератмутаза [КФ 5.4.2.12]; 8- енолаза [КФ 4.2.1.11]; 9- піруваткіназа [КФ 2.7.1.40]

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *A. flavus* з використанням глюкози як джерела вуглецю внаслідок катаболізму глюкози утворюється піруват, який далі за допомогою піруватдегідрогенази перетворюється на ацетил-КоА. Далі ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення втрат інтермедіатів ЦТК – попередників біосинтезу амінокислот, при рості на глюкозі є реакції, які каналізують ферменти фосфоенолпіруват карбоксикіназа [КФ: 4.1.1.49], малатдегідрогеназа [КФ: 1.1.1.39] та піруват карбоксилаза [КФ: 6.4.1.1].

Утворення ітаконової кислоти (ітаконат) відбувається внаслідок дії аконінату декарбоксилази [КФ: 4.1.1.6] на цис-аконітат.

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

A. terreus DSM 23081 – представник роду *Aspergillus*, який може бути використаний як потенціальний продуцент ітаконової кислоти промислових масштабів. Даний штам є мезофільним ацидофілом, оскільки оптимальна температура культивування є 35°C і рН 3,4. Через 48 год після початку культивування, рН знижується до позначки 2,0, тому з цього моменту до ферментера додають у вигляді титрувального розчину NH_4OH . Хоча умови вирощування штаму DSM 23081 є несприятливими для більшості контамінуючої мікрофлори, проте процес культивування пропонується проводити в асептичних умовах.

Оскільки ітаконова кислота є вторинним метболітом, який накопичується в середовищі культивування в стаціонарній фазі, тому для вирощування даного мікроорганізму доцільним є використовувати глибинний спосіб культивування. Він має ряд очевидних переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно скоротити виробничі площі, виключити важку непродуктивну ручну працю, поліпшити гігієну праці, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва. При глибинному способі культивування раціональніше споживаються мікроорганізмами поживні речовини середовищ, що дає можливість значно скоротити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів твердого поживного середовища, отримувати препарати з меншим вмістом домішок і більшою питомою активністю [16]. Також асептичні умови забезпечуються стерилізацією

обладнання і комунікацій, поживного середовища, аераційного повітря. Для запобігання контамінації у ферментері створюється надлишковий тиск.

A. terreus DSM 23081 є облігатним аеробом, тому ферментація проходить в умовах безперервної подачі стерильного повітря через кільцевий барботер, який встановлений в нижній частині ферментатора.

Глибинне культивування мікроорганізмів може бути періодичним або безперервним. Безперервне культивування являє собою тривалу, довгострокову операцію, що займає чималий проміжок часу, в ході якого поживні речовини додають в середовище в міру їх витрачання, а надлишок культури відбирають [17]. При періодичному способі культивування весь об'єм поживного середовища засівають чистою культурою і вирощування ведуть в оптимальних умовах відповідний час до накопичення потрібної кількості цільового продукту. Як вже зазначалося, ітаконова кислота є вторинним метаболітом, який накопичується в стаціонарній фазі росту, тому доцільним є обрати періодичний спосіб культивування.

Отже, для культивування *A. terreus* DSM 23081 з метою отримання високих концентрацій ітаконової кислоти було обрано періодичне культивування глибинним способом при безперервній аерації в асептичних умовах.

При виборі ферментера враховують морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні особливості штаму продуцента, а також економічні аспекти потреби продукції. Враховуючи те, що біосинтез ітаконової кислоти *A. terreus* DSM 23081 відбувається в аеробних умовах, то важливе значення для аеробного процесу має система аерації, необхідним є встановлення барботера, який забезпечить безперервну подачу стерильного повітря, а додаткове перемішування та підвищить показники ефективності культивування продуцента. Барботер встановлюється під мішалкою, яка створює вихрові рухи тим самим розподіляючи аераційне повітря рівномірно у товщі середовища.

Для забезпечення високого значення масообміну в середині ферментера повинен бути встановлений перемішуючий пристрій. При його виборі враховують можливий вплив надлишкових зрізових зусиль на мікроорганізм. Враховуючи, що штам *A. terreus* DSM 23081 утворює міцелій, тому нами було обрано аерліфтний (барботажний) тип перемішування поживного середовища.

Аерліфтні біореактори можуть стати вирішенням проблеми забезпечення інтенсивного масообміну в апаратах великого об'єму. Для ферментерів цього типу об'єм культуральної рідини практично не обмежений і може досягати декількох тисяч кубічних метрів.

Це стає можливим завдяки особливій конструкції ферментерів, яка полягає у використанні аерліфт-довгих труб, укладених у високі дифузори. *Принцип роботи:* повітря або суміш газів подається по трубі в нижню частину дифузора у вигляді маленьких бульбашок. Ці бульбашки піднімаються всередині дифузора в верхню частину реактора, захоплюючи за собою культуральну рідину. Піднявшись по внутрішній поверхні дифузора культуральна рідина потім опускається на його зовнішній стороні, створюючи циклічні потоки в самому реакторі [18].

На *рис. 5.1* схематично зображено біореактори з аерліфтним та барботажним перемішуванням поживного середовища [19].

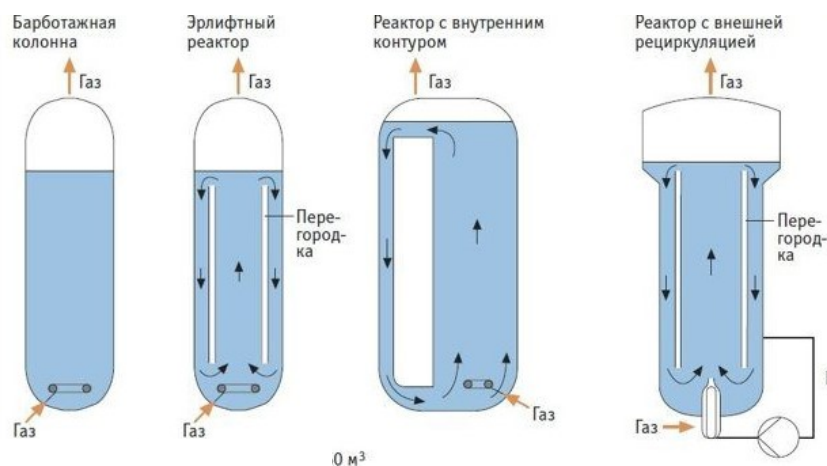


Рис. 5.1.Схема перемішування поживного середовища газом

Вкрай важливим є забезпечення належного рівня теплообміну в біореакторах, оскільки життєдіяльність і метаболічна активність об'єктів залежить значною мірою від коливань температури. Тому необхідна наявність теплової сорочки, яка дозволить встановлювати і тримати певні температурні режими при культивуванні. Це відбувається за рахунок подачі у сорочку нагрітої води.

Враховуючи всі зазначені вище вимоги було обрано аерліфтний ферментер компанії Biorus [20].



Рис. 5.2. Ферментер Biorus, 100 л

Даний ферментер обладнаний сорочкою, може бути мішалкою, а також повністю автоматизованою системою, яка контролює наступні параметри: рівень аерації, температура, додавання підживлення, датчик піни і мутності середовища. Можливість зняття і заміни типу мішалки дозволяє використовувати даний тип ферментера і для інших продуцентів з іншими морфолого-культуральними ознаками.

Отже, вибір ферментаційного обладнання залежить від вимог, встановлених для культивування обраного біологічного агенту.

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

A. terreus DSM 23081 є облигатним аеробом, тому для її культивування потрібна постійна подача аераційного повітря.

Асептичні умови забезпечуються стерилізацією обладнання і комунікацій, поживного середовища, аераційного повітря. Для запобігання контамінації у ферментері створюється надлишковий тиск.

Важливе значення для аеробного процесу має система аерації, необхідним є встановлення барботера, який забезпечить безперервну подачу стерильного повітря, а додаткове перемішування та підвищить показники ефективності культивування продуцента. Барботер встановлюється під мішалкою, яка створює вихрові рухи тим самим розподіляючи аераційне повітря рівномірно у товщі середовища [17].

Для підготовки повітря для глибинного культивування використовують компресори. Потужність компресора підбирають з таким розрахунком, щоб забезпечити подачу повітря через всю систему очищення в ферментерах і щоб в процесі культивування підтримувалося надлишковий тиск 0,01-0,03 МПа. На шляху проходження від компресора до ферментерах повітря долає опір: в системі апаратів і комунікацій (близько 0,03 МПа); в фільтруючому шарі (близько 0,02 МПа); опір стовпа рідини в ферментера (0,04-0,06 МПа); при виході з барботажного устрою в результаті розширення (0,01 - 0,02 МПа).

Для стиснення і нагнітання повітря можна використовувати поршневі компресори або турбокомпресори. Поршневі компресори мають високий ККД.

Стиснення повітря супроводжується його сильним нагріванням, тому після компресорів повітря надходить в теплообмінник. Щоб видалити з повітря зайву вологу, його необхідно охолоджувати до температури нижче точки роси. Перед фільтрами встановлюють одну велику ємність (ресивер) для вирівнювання тиску в системі і забезпечення рівномірної подачі повітря на фільтри. Далі повітря подається на знепліднювання спочатку в головному, а потім в індивідуальні фільтри.

Повітря, що відводиться з ферментера після аерування зростаючої культури, очищується в системі фільтрів і викидається в атмосферу [21]

5.1.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Штам *A. terreus* DSM 23081 найбільший рівень ітаконової кислоти штам продукує на такому середовищі.

Штам *A. terreus* DSM 23081 використовує один тип джерела вуглецю (глюкоза, ксилоза, сахароза, манноза або гліцерин) [22] , тому найбільний рівень ітаконової кислоти продукує на такому середовищі:

- Глюкоза – 320;
- KH_2PO_4 – 0,8;
- NH_4NO_3 – 3;
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1;
- $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ – 5;
- $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,00167;
- $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,008;
- $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,015;

Для оцінки впливу концентрації азоту щодо виробництва ітаконової кислоти з гідролізату целюлози, наступні три різні концентрації оцінювали: 1, 3 та 5 г / л. [23].

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

Для вирощування початкового посівного матеріалу необхідно у колбі на 1 л приготувати 600 мл поживного середовища. Оскільки об'єм поживного середовища невеликий, тому стерилізацію проводимо в автоклаві.

Наведене вище середовище ділимо на наступні композиції залежно від режиму стерилізації окремих його складових.

Композиція А: глюкоза;

Композиція Б: NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$;

Композиція В: KH_2PO_4 ;

Глюкозу (композиція А), яка слугує джерелом вуглецю, стерилізують в автоклаві при 112°C і тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв як термолабільну речовину.

Основні солі (композиція Б) стерилізують при 131°C протягом 40 хв окремо від фосфатних солей (композиція В) з метою уникнення утворення осаду при нагріванні.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 100 л, потрібно приготувати 48,9 л л поживного середовища.

Для засіву даного інокулятора потрібно внести 4,9 л посівного матеріалу, також враховується конденсат (10%), оскільки стерилізація гострою парою проходить у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композиції А, становить 49 л.

Спочатку відбувається розмішування розчину солей в збірнику після чого він подається в ферментер де і буду стерилізуватися (перед стерилізацією до розчину солей додають 6% розчин хлоридної кислоти, що б унеможливити випадання нерозчинних осадів), після стерилізації в ферментер подають приготований і простерилізований раніше розчин глюкози. Після змішування композицій через засівну колбу вносять посівний матеріал. Включають перемішувач, аерацію, в сорочку інокулятора подають пару. В процесі культивування рівень рН знижується до 2, для підтримання оптимального рівня рН (3,4) подають 25% розчин аміаку.

Культивування здійснюють при температурі 35°C упродовж 72 год, витрати повітря 1 л/(л·хв). Кожні 3-4 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль і концентрацію біомаси.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу та час підготовки ферментера до роботи. Підготовка ферментера включає: миття та огляд, перевірка на герметичність, підігрів апарату, стерилізація, охолодження, завантаження середовища, засів, вивантаження культуральної рідини.

Кількість поживного середовища перед виробничим біосинтезом становитиме 484.58 літра.

5.1.4. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Даний штам є мезофільним ацидофілом, оскільки оптимальна температура культивування є 35°C і рН 3,4. Через 48 год після початку культивування, рН знижується до позначки 2,0, тому з цього моменту до ферментера додають у вигляді титрувального розчину NH_4OH . Хоча умови вирощування штаму DSM 23081 є несприятливими для більшості контамінуючої мікрофлори, проте процес культивування пропонується проводити в асептичних умовах.

5.1.5. Вибір мийних і дезінфікуючих засобів

Під час виробництва ітаконату, приміщення, обладнання, устаткування забруднюються різними речовинами, що стає осередком розвитку бактерій та грибків. Щоб уникнути цього необхідно проводити щоденне та генеральне прибирання з миттям та подальшою дезінфекцією. Потрібно пам'ятати про зміну мийних та дезінфікуючих засобів раз на 1-3 місяці, задля запобігання резистентності мікроорганізмів до них.

Для миття приміщень, обладнання, комунікацій, устаткування на виробництвах зазвичай використовують мийний розчин Біомой на заміну використовуємо розчин кальцинованої соди.

Препарат «Біомой» являє собою порошок світлих тонів. Робочі розчини Біомой безбарвні, не ушкоджують оброблювані вироби і мають виражені

емульгуючі і миючі властивості, легко видаляють білково-жирову плівку, добре змиваються, не залишаючи нальоту на оброблюваних поверхнях [24].

Кальцинована сода (натрій вуглекислий, натрію карбонат) - білий порошок, в якого відсутній запах. Має універсальні водопом'якшувальні властивості, добре відчищає і виводить жир. Подразнює шкіру та очі при неправильному застосуванні [25].

Для дезінфекції обладнання після миття використовуємо «Інсімакс ДЕЗ-Н» та на заміну «Інсімакс Т».

«Інсімакс ДЕЗ-Н» («Інсімакс DES-N») (діючі Речовини: надощова кислота - 2,4%, пероксіоктанова кислота - 0,2%). Рідкий кислотний пінний дезінфікуючий засіб. Має високу мікробіологічну ефективність, високу ефективність при низьких температурах (4 ° C) і при низьких, не містить хлор, фосфати і альдегіди [26].

«Інсімакс Т» (діючі речовини: бензалконію хлорид – 5,0%, дидецилдиметиламоній хлорид – 5,0%, глутарал – 9,8%). Дезінфікуючий засіб на основі амонійних сполук. Перевагами продукту є висока мікробіологічна ефективність: проти бактерій, грибків і вірусів. Основний компонент - глутаральдегід. Його ефективність залежить від декількох факторів: рН, поверхневий натяг, якості підсилюють агентів. Унікальна система, яка заснована на алкіллополіглюкозідах в спиртовій фазі (APG-OH), що забезпечує наднизьке поверхневий натяг (I FT), і відповідно максимальне проникнення препарату в пористі поверхні [27].

Щоб дезінфікувати вікна, стіни та двері застосовуємо й «ITS WATER DEZ-330», замінюємо «Divosan Extra VT55».

«ITS WATER DEZ-330» (діюча речовина: 11,0-15,0% гіпохлориту натрію) Включає широкий спектр миючих і дезінфікуючих засобів, що забезпечують повний комплекс рішень в сфері гігієни і санітарії для підприємств. Лужний не пінне дезінфікуючий засіб на основі гіпохлориту натрію 11-15%.

Використовується у вигляді робочого розчину з концентрацією 0.5-1% (50-100мл концентрату на 10 л води) [28].

«Divosan Extra VT55» (діючі речовини: алкілдиметилбензиламоній хлорид 10- 20%; натрій бікарбонат 1-3 %). Сильноконцентрований дезінфектант на основі четвертинних-амонійних сполук (ЧАС). Засіб володіє відмінними дезінфікуючими властивостями проти більшості вегетативних форм мікроорганізмів включаючи грампозитивні і грамнегативні бактерії і дріжджі. Divosan Extra рекомендовано для всіх видів зовнішньої обробки [29].

5.2. Обґрунтування стадій виділення та очищення цільового продукту

Ітаконова кислота $C_5H_6O_4$ - це ненасичена двоосновна кислота. Наявність у молекулі двох карбоксильних груп й активної метиленової групи визначає високу активність полімеризації ітаконової кислоти й участь у різних реакціях приєднання.

Ітаконова кислота являє собою білий кристалічний порошок, добре розчинний у воді й деяких органічних розчинниках, має молекулярну масу 130,1, щільність 1,63 і температуру плавлення 167- 168 °С. Ітаконову кислоту можуть синтезувати деякі штами мікроскопічних грибів роду *Aspergillus* (*Asp. terreus*, *Asp. itaconicus*) [30].

Дану кислоту використовують у хімічному синтезі високоякісних смол, волокон типу «нітрон», детергентів, лікарських речовин, барвників і інших органічних сполук [31].

Також ітаконова кислота використовується або як кислота, або у вигляді ефірів для поліпшення властивостей вінілових полімерів. Значна частка ітаконової кислоти використовується у вигляді складних ефірів, отримання яких ґрунтується на реакції зі спиртами самої кислоти або її ангідриду в присутності кислотного каталізатора з виходами до 80% [32].

Але даний проект сконцентрований саме на виробництво ітаконової кислоти для використання її у виробництві автомобільних шин.

Звичайні автомобільні шини розглядаються як екологічно недружні, оскільки вони переважно виготовляються з викопного палива. Передовим досягненням науки є нові автомобільні шини, які вироблені з біомаси, що включають в себе дерева та трави [33].

Ізопрен – ключова молекула в шинах, яка утворюється шляхом термічного розщеплення молекул у нафтовій промисловості. Ізопрен реагує з собою в довгі ланцюги, щоб зробити твердий полімер, який є основним компонентом у автомобільних шинах. Новітньою технологією є одержування ізопрену з біомаси під час мікробного бродіння цукрів (глюкоза), до проміжного продукту, що називається її кислотою. На другому етапі ітаконова кислота реагує з воднем з утворенням метил-ТГФ (тетрагідрофуран), який далі зневоднюється разом з ізопреном за допомогою каталізатора [33].

Тому виробництво ітаконової кислоти допоможе виробляти автомобільні шини, які є нешкідливими для навколишнього середовища.

Технологічна схема виділення та очищення ітаконової кислоти для використання її у буде проходити в такі стадії: відділення міцелію, освітлення фугату, фільтрування, упарювання, кристалізація, відділення кристалів, розчинення та освітлення кристалів, фільтрування, кристалізація, відділення кристалів, сушіння, подрібнення, пакування, маркування та відвантаження.

5.2.1 Вибір способу відділення та відповідного обладнання

Для відділення міцелію або культуральної рідини використовують сепаратори, осаджувальні центрифуги, фільтр – преси, вакуум – барабанні фільтри, ротаційно-вакуумні фільтри, відстійники. Вибір обладнання залежить від масштабу культивування, типу клітин, властивості культуральної рідини.

Для виділення міцелію з великих обсягів культурального середовища (у промислових масштабах) використовують високошвидкісне центрифугування за допомогою відповідних *центрифуг напівбезперервної дії*.

Центрифугування – процес розділення рідких неоднорідних систем в полі відцентрових сил з використанням суцільних або проникних для рідини перегородок. Розрізняють відцентрове осадження і відцентрове фільтрування. У першому випадку центрифугування виконується в роторах з суцільними стінками, у другому – з перфорованими. Суспензії можна розділяти як в суцільних роторах, так і в перфорованих, а емульсії – тільки в роторах, що мають суцільну стінку

Незручності цього способу – необхідність зупинки процесу, ймовірність витоку мікроорганізмів в навколишнє середовище, неможливість повного видалення міцелію і середовища [34].

Сепарування- Процес розділення суспензій на рідку і тверду фази здійснюється під дією відцентрових сил, при цьому суспензія проходить через міжтарілчастий простір сепаратора. Сепаратори дозволяють сконцентрувати осад до вологості 60-90% [35].

Перевагами методу сепарування є: - менші втрати біомаси порівняно з фільтруванням та флотацією; - можливість автоматизувати процес; - більша ефективність порівняно з центрифугуванням [35].

Області застосування центрифугування:

1. Виділення біомаси з культуральної рідини (дріжджі, бактерії, гриби).
2. Відділення різних цільових продуктів мікробіологічного синтезу (антибіотики, ферменти, вітаміни та ін.), переведених попередньо в тверду фазу.
3. Поділ емульсій, що утворюються при екстракції.

Недоліки центрифугування:

1. Складність конструкції, висока енергоємність і вартість.
2. Складність експлуатації (ненадійність, вібрація, шум, необхідність періодичної розбирання і миття).
3. Вплив на клітину відцентрової сили, нагрівання, труднощі герметизації і забезпечення асептичних умов ведення процесу.

Головні переваги центрифугування і сепарування – висока продуктивність і високий ступінь концентрування – дозволяють успішно конкурувати з іншими способами виділення і концентрування як в промислових, так і в лабораторних умовах [35].

Альтернативний метод виділення клітин з культуральної середовища – *фільтрація*.

Фільтрування – процес розділення суспензій за допомогою пористих фільтрувальних перегородок, здатних пропускати рідину або газ, але затримувати завислі в середовищі тверді частинки (осад) [34].

Особливістю процесу фільтрування є також те, що для здійснення цього процесу необхідно забезпечити різницю тисків по обидві сторони від перегородки, яка створює відповідний опір протіканню процесу, тому швидкість процесу фільтрування прямо пропорційна різниці тисків і обернено пропорційна опору пористої перегородки та осаду. Додатковий опір на фільтруючу перегородку зростає при збільшенні товщини осаду або закупорюванні його частинками пористої фільтруючої перегородки, а також при одночасному збільшенні товщини осаду і закупорюванні пор його і перегородки. Наявність тиску також призводить до збільшення опору, який виникає в результаті стиснення осаду і пористої перегородки внаслідок зменшення пор в ній, для проходження фільтрату та зміни їх форми (через стиснення і зсув) [36].

З підвищенням тривалості фільтрування на фільтрувальній перегородці збільшується шар осаду і зростає його опір, в результаті чого уповільнюється процес фільтрування [36].

Фільтри періодичної дії працюють при довгих циклах фільтрування, так як часте повторення допоміжних операцій (вивантаження, складання фільтру, завантаження) різко знижує їх продуктивність. Однак періодично діючі фільтри потрібні на невеликих виробництвах, особливо при різноманітному асортименті

продукції, коли необхідно часто міняти режим фільтрування, а також для відділення важко фільтруючих і потребуючих старанної промивки осадів [37].

Ємнісні фільтри використовують з метою розділення невеликих об'ємів суспензії. Вони можуть працювати під вакуумом (нутч-фільтри) і під надлишковим тиском (друк-фільтри) [37].

Переваги відкритих нутч-фільтрів: можливість добре промити осад; легкість захисту від корозії; простота й надійність конструкції.

Недоліки фільтрів: невелика швидкість фільтрування внаслідок того, що різниця тисків практично не перевищує 0,75 атм; громіздкість установки; ручне вивантаження осаду.

Фільтри безперервної дії працюють при коротких циклах фільтрування з автоматичною промивкою і вивантаженням осаду. Внаслідок швидкої і безперервної зміни окремих операцій швидкість фільтрування в таких фільтрах значно більша ніж у фільтрах періодичної дії. Разом з тим переваги фільтрів безперервної дії можуть бути використані в певній мірі тільки при постійному складі суспензії, яка розділяється і порівняно крупному масштабі виробництва [37].

У фільтрах безперервної дії одночасно проводяться операції: фільтрація, сушка, промивка, розвантаження і регенерація фільтрувальної тканини. Ці операції проходять безперервно і незалежно одна від одної в кожній зоні фільтру, тому процес роботи фільтру протікає безперервно. Фільтри безперервної дії розрізняють за формою фільтрувальної перегородки і підрозділяють на барабанні, дискові і стрічкові, і за робочим тиском на апарати, що працюють під розрядженням і під тиском [37].

До недоліків цих фільтрів відносяться їх відносна складність, висока вартість, необхідність установки допоміжного устаткування і велика витрата енергії головним чином на вакуум насоси і повітродувки [37].

Барабанні вакуум-фільтри являють собою апарати безперервної дії, що працюють під вакуумом і характеризуються протилежними напрямками сили ваги і руху фільтрату. Вакуум-фільтр має горизонтальний перфорований барабан, покритий зовні текстильною фільтрувальною тканиною. Барабан обертається навколо своєї осі і на 0,3 ... 0,4 своєї поверхні занурений в суспензію, що знаходиться в кориті. Поверхня барабана розділена на окремі секції, ізольовані одна від одної. Пристроєм, керуючим роботою фільтра, є розподільна голівка, через яку секції барабана в певній послідовності приєднуються до магістралей вакууму, стисненого повітря і промивної рідини. При цьому секції проходять послідовно зони фільтрації, першого зневоднення (підсушування), промивання, другого зневоднення (підсушування), видалення осаду і регенерації тканини. Фільтрат через трубки і порожнину барабана йде до збірника, а промитий і підсушений осад безперервно зрізається ножом [34].

В той самий час, фільтри мають наступні недоліки: невелика площа фільтрування та порівняно значна вартість; труднощі ретельного промивання та осушування осаду; віддаленість розділювальної головки від поверхні фільтрування, що приводить до затримки фільтрату та промивних вод всередині барабана і ускладнює їх окреме відведення [34].

Рамний фільтрпрес відноситься до періодично діючих фільтрів, що мають розвинену поверхню фільтрування. Він працює в режимі постійної швидкості, оскільки суспензію на фільтр подають насосом постійної робочої продуктивності. Рамний фільтрпрес складається з ряду плит і рам, між якими встановлюють фільтруючу тканину. Суспензію подають по центральному каналу і вона поступає в порожнистий простір рам. Фільтрат проходить через фільтруючу тканину і по каналах в плитах виводиться з фільтру. Осад залишається у середині рам. У міру того як в рамках набирається осад і зростає опір фільтруванню, збільшується перепад тиску, який розвивається насосом, що подає суспензію [38].

Фільтр-прес вимагає великих затрат ручної праці, швидкість фільтрування невелика, відсутня регенерація фільтруючого матеріалу. Незважаючи на перераховані недоліки фільтрпрес застосовується дуже широко, оскільки компактний і дає високу ступінь освітлення суспензій [38].

Друк-фільтр - це путч, який має закриту верхню половину. За рахунок конструкції таких фільтрів з'являється можливість формування в них високого тиску, який буде необхідним для забезпечення максимально високої швидкості фільтрації. Нижня частина пристрою є негерметичною, а необхідний тиск формується за рахунок застосування стисненого повітря [37].

Найбільш поширеним застосування такого обладнання є в тих випадках, коли мова йде про необхідність обробки ефірних, спиртових та інших органічних розчинників, що відрізняються досить низькою температурою кипіння [37].

Такі апарати мають досить велику фільтруючу поверхню, за рахунок чого вони відрізняються вкрай високою продуктивністю [37].

Отже, під час отримання ітаконової кислоти, для відділення міцелію *Aspergillus terreus* обираємо на рамномний фільтр-прес.

5.2.2. Вибір способу упарювання та відповідного обладнання

Наступним завданням є концентрація цільового продукту. Існують два способи концентрування речовин — це фільтрація (до якої відносять ультрафільтрацію, зворотній осмос, тощо) та упарювання розчинів. Фільтрація в даному випадку не є доцільною, через високу вартість процесу, низьку швидкість протікання процесу та відносно низьку ефективність. А от, процес випарювання є доцільним через свою простоту, швидкість, ефективність та легкість випарювання органічного розчинника [39]

Випарювання — це термічний процес, процес концентрування рідких розчинів шляхом часткового видалення випаровуванням вологи при нагріванні рідини. Випарювання буває трьох видів:

- Під надлишковим тиском;

- При атмосферному тиску;
- Під вакуумом.

При випарюванні під тиском вище атмосферного можна використовувати вторинну пару, як для випарювання, так і для інших нестатків. Однак випарювання під надлишковим тиском сполучено з підвищенням температури кипіння розчину. Тому даний спосіб застосовується для випарювання розчинів термічно стійких речовин. Крім того для випарювання під тиском необхідно застосовувати гріючі агенти з більш високою температурою [39].

При концентруванні необхідно враховувати термолабільність продуцента. Так як, гибель міцелію відбувається при 45-50°C, а спор при 70-80°C, то необхідно знизити температуру кипіння, що можливо при випарюванні під вакуумом. Отже, цей спосіб випарювання для розглянутого випадку не є оптимальним.

При випарюванні під атмосферним тиском вторинна пара, що утвориться, не використовується і звичайно викидається в атмосферу. Такий спосіб випарювання є найбільш простим і доступним, але неекономічним, тому застосовувати його в даному проекті недоцільно [39].

При використанні вакуумного способу знижується температура кипіння розчину, що дозволяє ефективно проводити видалення вологи з розчинів термолабільної природи. Також цей спосіб є більш економічним та доцільним в даному випадку.

Перевагою такого випарювання є :

- + Пониження температури кипіння рідини;
- + Збільшується рушійна сила процесу;
- + Можливе використання гріючої пари більш низького тиску.

За режимом проведення процесу розрізняють:

- періодичне;
- безперервне.

За безперервного випарювання процес є встановленим в часі, тобто в установку в постійній кількості надходять початковий розчин і нагрівна пара, а з установки також безперервно і в постійній кількості відводяться концентрований розчин, вторинна пара і конденсат нагрівної пари [39].

За принципом роботи доцільно використання вакуумної установки періодичної дії. Тоді рідина подається в апарат, випарюється до необхідної, більш високої концентрації, потім упарений розчин видаляється з апарату. Порожній апарат знову заповнюється неконцентрованим розчином. Періодичне випарювання застосовується коли необхідно випарувати більшу частину вологи [39].

Зазвичай нагрівання таких апаратів проводять водяною парою, оскільки водяній парі притаманна висока питома теплова конденсація і високий коефіцієнт тепловіддачі. Основним критерієм потужності є випарна спроможність, тобто кількість випареної вологи за годину. Потужність випарювачів залежить від об'єму випарної камери в ньому.

На промислових підприємствах використовують два типи вакуум-випарних апаратів: вертикальні та горизонтальні. Найтиповішим представником є вертикальний апарат з підвісною випарною камерою (рис. 5.3). Він є відносно не дорогим та існують апарати з різними об'ємами. Підвісна випарна камера дозволяє більш ефективно вилучати тверді частинки з пари.

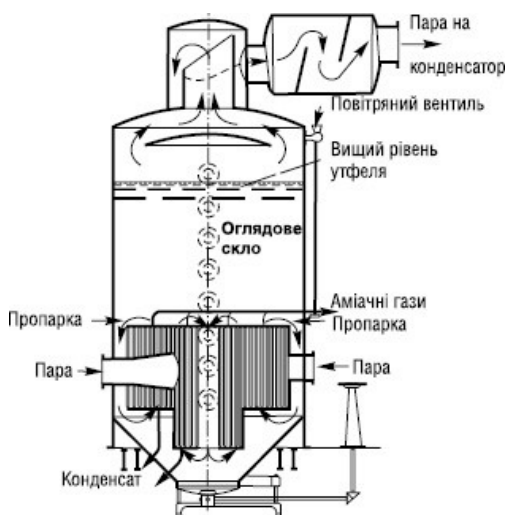


Рис. 5.3. Вакуум-випарний апарат з підвісною випарною камерою.

5.2.3. Вибір способу кристалізації та відповідного обладнання

Після упарювання утворюється субстанція, яка має в своєму складі окрім основного продукту залишки культуральної рідини та компоненти поживного середовища. Найбільш доцільним для виділення цільового продукту (ітаконова кислота) з цієї маси є кристалізація.

Процес утворення і росту кристалів із розчинів і газової фази називають *кристалізацією*. Зазвичай речовини мають кристалічні ґратки строго визначеної конфігурації, за винятком поліморфних речовин. Ряд речовин утворюють кристалогідрати, причому кількість включених молекул води залежить від температури. Для утворення кристалів із розчинів необхідне пересичення, зумовлене різницею вихідної концентрації a_n і рівноважної концентрації насичення (граничної розчинності A_n). Кристалізація відбувається, коли перехід речовини з рідкого у твердий стан супроводжується зменшенням вільної енергії системи [40].

Для одержання крупнокристалічного порошку кристалізацію ведуть при малому пересиченні, у розчин вводять кристали для затравки, дрібні кристали видаляють у процесі кристалізації, кристалічний продукт повторно обробляють у насиченому розчині (при цьому дрібні кристали розчиняються), вводять у розчин сторонні домішки, підвищують температуру (обмежено) [40].

Методи кристалізації:

- випарювання розчинника (ізотермічний);
- охолодження гарячих розчинів (ізогідричний);
- одночасне охолодження і випарювання (комбінований);
- додавання в розчин інших речовин, які знімають розчинність (висолювання);
- виморожування.

Схеми кристалізації:

- одноразова (з повним поверненням маточного розчину і періодично повним зливанням, із частковим його поверненням, із частковим поверненням після додаткового упарювання і кристалізації);
- дворазова з такими ж маніпуляціями маточним розчином, причому на злив подають маточний розчин після першого кристалізатора, а після другого — насичений маточний розчин повертають у перший кристалізатор.

Доцільність використання даного методу пов'язана з урахування фізико-хімічних властивостей продукту, низькою вартістю процесу, простотою методу та відсутністю складної апаратури, можливістю застосування одного апарату декілька разів для перекристалізації [40].

Застосування вакуумного кристалізатора дозволяє зменшити витрати води для охолодження продукту. Вибір ємнісного кристалізатора а не поверхневого дозволяє створювати точки кристалізатори з меншою ефективністю але у всьому об'ємі розчину [40].

5.2.4. Вибір способу відділення кристалів та відповідного обладнання

Після кристалізації необхідно відділити отримані кристали ітаконової кислоти. Відділяють кристали такими ж способами, що і для відділення біомаси від культуральної рідини. А саме: фільтруванням, центрифугуванням, сепарацією, флотацією. Переваги та недоліки кожного з методів описано у підрозділі 5.1.1., взявши їх до уваги, для відділення кристалів ітаконату, використовуємо підвісну центрифугу.

Центрифуги підвісні - це центрифуги автоматизовані, з програмним управлінням. Осад зрізається ножом при зниженій частоті обертання ротора, внаслідок чого практично виключається подрібнення кристалів осаду [41].

Центрифуги оснащені пристроєм для пропарювання внутрішньої порожнини кожуха і зовнішньої поверхні ротора. При роботі фільтруючих центрифуг суспензія подається зверху при зниженій (в порівнянні з робочою) частоті обертання ротора. Потім частота обертання доводиться до максимальної,

при якій осад віджимають, промивають і повторно віджимають. Осад вивантажують ножом при малій частоті обертання ротора [41].

Після процесу кристалізації у вакуум-кристалізаторі, маточний розчин разом з кристалами подається до підвісної центрифуги з нижнім ручним вивантаженням осаду. Центрифугу вмикаємо спочатку при 300 об/хв, та під час процесу оберт збільшують до 1000 об/хв. Відбувається відділення маточного розчину від кристалів ітаконвої кислоти, через 1-1,5 хвилини від початку роботи.

Кристали після центрифугування потрібно промити водою для повного освітлення рідини. Остаточна вологість кристалів 2-3%.

5.2.5. Вибір способу сушіння та відповідного обладнання

Після випарювання ми одержуємо концентрат ітаконвої кислоти. Наступною метою є одержання сухого порошку з вмістом води до 5%. Основним раціональним способом досягнення даної мети є використання методу сушіння. Існує цілий ряд методів сушіння речовин, такий як конвективне сушіння, контактне сушіння, сублімаційне сушіння та інші. Розглянемо деякі з них.

При використанні *ліофільного висушування* не порушується нативна (початкова) структура білків. В процесі ліофілізації вода випаровується, міняючи рідкий стан. Процес ліофільного сушіння проводять в глибокому вакуумі. Проте цей вид сушки є дорогівартісним і не підходить для виробництва ітаконату [42].

Розпилювальна сушка, як спосіб зневоднення рідких матеріалів, набула широкого поширення в харчовій галузі та при виробництві нестерильних препаратів. Принцип дії даного обладнання заснований на тому, що висушуваний матеріал розбивається на сукупність крапель за допомогою спеціальних пристроїв - форсунок. Краплі при контакті з потоком сушильного агента висихають з утворенням частинок або гранул. На виході з сушильної камери суміш газу і частинок розділяється за допомогою циклонів, рукавних фільтрів, електричних фільтрів. Потік відпрацьованого повітря додатково може очищатися від пиловидної фракції за допомогою мокрих скрубєрів [42].

Розпилювальні сушарки працюють в безперервному режимі, при цьому час перебування матеріалу навіть в промислових апаратах не перевищує декількох хвилин. Сушка протікає інтенсивно і матеріал, навіть при високих температурах сушильного агента, при правильно обраних режимах не встигає перегріватися [42].

Її основними перевагами є висока продуктивність, помірні питомі енерговитрати та мінімальний час контакту висушуючого продукту з сушильним агентом.

Наступним видом сушарки є **контактна сушка**. При контактному сушінні все тепло, необхідне для випаровування вологи, передається матеріалу через стінку, що відокремлює матеріал від теплоносія. В якості теплоносія при контактної сушінні зазвичай використовують насичену водяну пару. Перевага контактних сушарок в тому, що відсутній сушильний агент - не потрібно очищення від пилу великих кількостей повітря або іншого теплоносія, що використовується зазвичай при конвективному сушінні. При контактному сушінні висушуваний матеріал не забруднюється продуктами згоряння палива або іншими домішками, що містяться в повітрі. Однак контактні сушарки в більшості своїй більш матеріаломісткісні і відповідно мають велику вартість. Найбільш підходять контактні сушарки для сушіння під вакуумом при невисоких температурах. Тому найбільше поширення вони одержали в харчовій промисловості [42].

Вальцьові сушарки - інший тип сушарок, який застосовують для зневоднення рідких матеріалів. У даних установках рідкий матеріал розподіляють тонким шаром по поверхні обертових вальців, на яких матеріал висихає. Для підвищення швидкості випаровування розчинника часто вальцьові сушарки працюють під вакуумом [42].

Продукт за допомогою спеціальних валків наноситься тонким шаром на зовнішню стінку барабана. Барабан сушарки обігрівается зсередини за допомогою насиченої пари. Зазвичай барабан виготовлений зі спеціального сплаву

чавуну, що забезпечує одночасно оптимальну теплопередачу, високу стійкість форми при високому тиску і відмінні параметри поверхні, необхідні для найкращого зняття продукту з поверхні. У деяких випадках барабан покривається спеціальним покриттям зазвичай хромом. Після одного оберту барабана вже висušений продукт у вигляді плівки знімається за допомогою спеціального ножа.

Вакуумні вальцові сушарки працюють за тим же принципом, що і описані вище, атмосферні, але в них всі робочі частини знаходяться всередині герметичного кожуха, з'єднаного з установкою для створення вакууму.

До недоліків вальцових сушарок відносять складність в обслуговуванні, пов'язану з необхідністю регулярної заміни ножів і точності настройки зазору між ножем і валком, до переваг - короткочасний контакт матеріалу нагрітою поверхнею валків і високу продуктивність по випаруваній волозі [42].

Барабанні роторно-вакуумні сушарки можуть застосовуватися як для сушки рідких матеріалів, так і для сушіння паст і сипучих матеріалів.

Обігрів матеріалу відбувається через поверхню барабана. Установка працює під вакуумом. Матеріал переміщається уздовж барабана за допомогою обертового ротора з встановленими на ньому валками. Швидкість обертання ротора задається виходячи з властивостей зневоднюється матеріалу, початкової вологості і необхідної кінцевої вологості продукту.

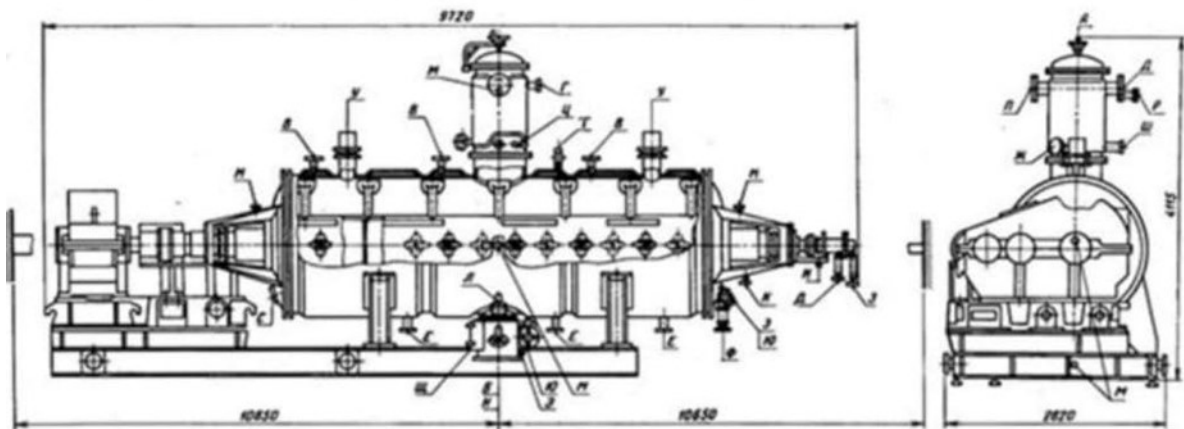


Рис. 5.4. Загальна схема барабанної роторно-вакуумної сушарки

Перевагами данного методу є те, що вони як і інші вакуум-сушарки, придатні для сушіння легко окислюючих, вибухонебезпечних і виділяючих шкідливі або цінні пари речовин. Пробігання процесу в вакуумі дає змогу сушіння при низьких температурах, що забезпечує низькі витрати живих клітин та цільового продукту. Однак, вони малопродуктивні, мають велику тривалість процесу сушіння та великі енерговитрати [42].

Дані методи мають свої переваги та недоліки, орієнтовані на специфічні речовини та технологічні процеси, однак, при виборі способу сушіння слід керуватися, насамперед, властивостями цільового продукту та можливістю використання того чи іншого типу сушіння. Найбільш ефективною для даного виробництва є використання вакуум-вальцевої сушарки, адже вона має високу продуктивність по випаровуваній волозі, відповідає всім вимогам та забезпечує зберігання всіх необхідних властивостей цільового продукту.

5.2.6. Вибір способу подрібнення та відповідного обладнання

Подрібнення це процес зменшення розміру часточок твердих частинок за допомогою механічної взаємодії. Подрібнення необхідне для данного продукту в зв'язку з тим, що при висушуванні у вакуумній сушарці отримуємо твердий шар матеріалу. Для придання товарного вигляду, зручності дозування фасування та застосування використовується подрібнення продукту.

Для подрібнення ітаконової кислоти до розміру часток 0,25 мм можна використовувати молоткову дробарку, яка є найефективнішою та найдешевшою дробаркою для даного виду подрібнення [43].

На виробництвах також використовують роторну дробарку, її використовують для більш твердих матеріалів і вона є занадто потужною, тобто її використання не буде доцільним [43].

Валкова дробарка що може застосовуватись, але утворює продукт дрібного подрібнення, а також відрізняється значно нижчою продуктивністю. Вібраційні

млини потребують додаткового завантаження, мало продуктивні та застосовуються для мілкового подрібнення [43].

Отже, проаналізувавши різні види подрібнювачів, можна зробити висновок, що найбільш доцільними є використання молоткової дробарки для подрібнення порошку ітаконової кислоти.

5.2.7. Вибір способу пакування, маркування та відвантаження та відповідного обладнання

Кінцевим етапом одержання готового продукту ітаконової кислоти є її пакування, маркування та відвантаження на склад. Щоб зберегти якість продукту необхідно детально підібрати первинну упаковку, враховуючи фізико-хімічні характеристики ітаконату. Ітаконова кислота являє собою білий кристалічний порошок, добре розчинний у воді й деяких органічних розчинниках, з остаточною вологістю 5%.

Найважливішою вимогою щодо пакування та вибору пакувальних матеріалів є належний захист від дії зовнішніх факторів (вологи, кисню повітря, мікробного забруднення).

Для пакування порошків, залежно від їх фізико-хімічних властивостей, використовують різні пакувальні матеріали: письмовий, парафіновий папір, целофан, поліетиленову плівку [44].

Найпоширенішим пакувальним матеріалом є поліетиленові пакети. Вони добре зберігають якість товару, вони міцні та надійні. Поліетиленові пакети стійкі до температурних коливань та добре зберігають вологість матеріалу [44].

Ітаконову кислоту для кращого зберігання та транспортування пакуємо у пакети по 2 кг за допомогою автоматичної фасувально-пакувальної машини. Наповнені пакети маркують етикеткою де вказують назву продукту, виробника та дату виготовлення з терміном придатності. Упакована продукція зберігається в захищеному від світла та вологи місці.

5.3. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

Обґрунтовано вибір таких післяферментаційних стадій:

ТП 8. Відділення міцелію

ТП 8.1 Відділення міцелію на рамному фільтр-прес

ТП 9. Упарювання

ТП 9.1 Упарювання на вакуум-апараті

ТП 10. Кристалізація

ТП 10.1 Кристалізація на вакуум-кристалізаторі

ТП 11. Відділення кристалів

ТП 11.1 Відділення кристалів центрифугуванням

ТП 12. Сушіння

ТП 12.1 Сушіння на вакуум-сушарці

ТП 13. Подрібнення

ТП 13.1 Подрібнення на молотковій дробарці

ПМВ 14. Пакування, маркування та відвантаження

ПМВ 14.1 Пакування, маркування та відвантаження

Таблиця 5.1.

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 20 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 8. Відділення міцелію						
1	ТП 8.1 Відділення міцелію на рамному фільтр-пресі (КР об'ємом 484 л)	Біомаса	23 кг	-	23 кг	-
		Фугат	461 л (484 л -23 кг)	5% (23 л)	438 л	Рамний фільтр-прес з 21 кількістю рамок та площею фільтрування 5 м ²
		Активоване вугілля	2,2 кг	-		
ТП 9. Упарювання						
5	ТП 9.1 Упарювання на вакуум-апараті	Фільтрат	438 л	-	-	Вакуум-упарювач Робоча місткість – 1000л
		Упарений розчин (0,25% від первісного обсягу)	¼ від 438 л – 110 л	2% (2 л)	110 л – 2 л = 108 л	
ТП 10. Кристалізація						
6	ТП 10.1 Кристалізація на вакуум- кристалізаторі	Упарений розчин	108 л	-	-	Вакуум-кристалізатор Робочий об'єм – 0,5 м ³
		Кристалізована ітаконова кислота	-	2% (2 л)	108 л – 2 л = 106 л	
ТП 11. Відділення кристалів						
7	ТП 11.1 Відділення кристалів центрифугуванням	Кристалізована ітаконова кислота	106 л	-	53 л	Центрифуга 1 000 об/хв
		Кристали ітаконової кислоти	53 кг	2% (1 кг)	53 кг – 1 кг = 52 кг	

ТП 12. Сушіння						
13	ТП 12.1 Сушіння на вакуум-сушарці	Кристали ітаконової кислоти (вологість 70%)	52 кг (у перерахунку на АСР- 15 кг, з урахуванням 5% вологи- 16 кг)	-	-	Вакуум-сушарка Продуктивність – 500 кг/год
		Висушена ітаконова кислота	-	3% (0,5 кг)	16 кг – 0,5 кг = 15,5 кг	
ТП 13. Подрібнення						
14	ТП 13.1 Подрібнення на молотковій дробарці	Висушена ітаконова кислота	15,5 кг	-	-	Молоткова дробарка Продуктивність подрібнювача – 30 кг/год
		Подрібнена ітаконова кислота	-	1% (0,2 кг)	15,5- 0,2 кг = 15,3 кг	
ПМВ 14. Пакування, маркування та відвантаження						
15	ПМВ 14.1 Пакування, маркування та відвантаження	Подрібнена ітаконова кислота	15,3 кг	-	-	Автомат для наповнення пакетів по 3 кг Продуктивність – 50 пакетів за год
		Готовий продукт	-	1% (0,2)	15,1/3= 5 пакетів	

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу, стадій виділення

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень [45]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтруючий матеріал – волокнистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, Е = 80 % [46]
К-3	Компресор	1	Компресор гвинтовий Remeza BK10T-10-270 (Білорусь), потужність 1000 л/мин, робочий тиск 10 Атм [47]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря Omi RA 10 (Італія), продуктивність 60 м³/год [48]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер фірми «Компресормаш-Сервіс» (Україна), об'єм 200 л, робочий тиск 12 атм [49]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний повітрянагрівач VBC (Україна) Макс. робоча температура 150 °С. Макс. робочий тиск 1,6 МПа [505]
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтруючий матеріал – фторопласт, Е = 99,996 %, швидкість фільтрування 0,01 м/с [51]
ФІ-8 ФІ-17 ФІ-28	Індивідуальний фільтр	3	Фільтр індивідуальний НЕРА класу очищення Н14, ефективність 99,995%, площа фільтрації від 2,7 до 20 м², пропускна здатність 270-2000 м³ відповідно. Тестовано згідно EN 1822; стійкість до вологості до 100%; витримує температуру повітря до 70 °С; не містить силікон. Виробник: «NEW FILTER» (Україна) [52]
ПА-9	Посівний апарат	1	Об'єм апарату – 10 л; матеріал – нержавіюча сталь; перемішування здійснюється за допомогою турбінної мішалки закритого типу– 20-1000 об/хв; витримує тиск – 0,3 МПа, виробник – BIORUS [53]

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання				Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Шульган Я.В.										
Перевір.	Удимович В.М.									61	133
Консультант									Кафедра БТМ		
Н.Контр.											
Затверд.	Пирог Т.П.										

Н-10	Насос перистальтичний для перекачування розчину від ПА-9 у інокулятор ПА-18	1	Перистальтичний насос F / F-T Максимальний тиск – до 3 бар, продуктивність 6 л/год (4,9 л за 49 хв) [54]
ДЗ-11 ДЗ-13 ДЗ-15 ДЗ-19 ДЗ-22	Об'ємно-ваговий дозатор	5	Дозатор ваговий автоматичний. Мінімальне дозування – 0,2 кг, максимальне – 50 кг. Дискретність відліку 0.005 г. [55]
РЗ-12 РЗ-14	Реактор-змішувач для розчину глюкози Реактор-змішувач для розчину солей	2	Об'єм апарату – 10 л; матеріал – нержавіюча сталь; перемішування здійснюється за допомогою магнітної муфти за швидкості – 300 об/хв; діаметр – 219 мм, висота – 380 мм; витримує тиск – 0,39 МПа, виробник – МашХим [56]
РЗ-16	Реактор-змішувач для підживлювального розчину глюкози	1	Об'єм апарату – 25 л; матеріал – нержавіюча сталь; перемішування здійснюється за допомогою трюхлопатевої мішалки; діаметр – 300 мм, висота – 1495 мм; витримує тиск – 0,6 МПа, виробник – ГазовикНефть [57]
ПА-18	Посівний апарат	1	Об'єм апарату – 100 л; матеріал – нержавіюча сталь; перемішування здійснюється за допомогою турбінної мішалки закритого типу – 20-1000 об/хв; витримує тиск – 0,3 МПа, виробник – BIORUS [58]
РЗ-20 РЗ-23	Реактор-змішувач для приготування розчину глюкози Реактор-змішувач для приготування розчину солей	2	Об'єм апарату – 100 л; матеріал – нержавіюча сталь; перемішування здійснюється за допомогою магнітної муфти за швидкості – 200 об/хв; витримує тиск – 0,39 МПа; діаметр – 450 мм, висота – 970 мм; виробник – МашХим [56]
Н-21 Н-24	Насос перистальтичний для перекачування: розчину від РЗ-20 у ферментер Ф-29; розчину від РЗ-23 у ферментер Ф-29.	2	Перистальтичний насос МР-3086.9 Максимальний тиск – до 1,4 бар, продуктивність 78 л/год (48,5 л за 37 хв) [59]
ДЗ-25	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор ваговий автоматичний АД-200- БЖ. Мінімальне дозування – 60 кг, максимальне – 200 кг. Дискретність відліку 0.1 кг. [60]

РЗ-26	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації підживлювального розчину глюкози	1	Об'єм апарату – 200 л; матеріал – нержавіюча сталь; перемішування здійснюється за допомогою якорної мішалки – 50-1000 об/хв; витримує тиск – 1,5 МПа, виробник – Тирит [61]
Н-27	Насос перистальтичний для перекачування розчину від РЗ-26 у інокулятор Ф-29	1	Перистальтичний насос МР-6118.12 Максимальний тиск – до 1.4 бар, продуктивність 226 л/год (170 л за 45 хв) [62]
Ф-29	Ферментер	1	Об'єм апарату – 1 000 л; матеріал – нержавіюча сталь; перемішування здійснюється за допомогою турбінної мішалки закритого типу – 50-300 об/хв; витримує тиск – 0,6 МПа, виробник – BIORUS [63]
Н-30 Н-33 Н-35 Н- 37	Відцентровий насос	4	Відцентровий Насос Sprut JSP 100A (Україна). Об'ємна подача: 0,6-2,4 м3/год (10-40 л/хв); напір: 32-11 м; споживана потужність 610 Вт [64]
З-31	Збірник культуральної рідини та реактор-змішувач	2	Збірник культуральної рідини та реактор-змішувач об'ємом 700 л Матеріал - AISI 316L та AISI 304 Тиск в корпусі, бар - від - 0,9 до 3,0 Тиск в теплообмінній сорочці, бар 4,0. Теплообменная сорочка обладнана регулюючими клапанами гети з пневмопозіціонером гети для управління подачею пара і води. Якість обробки поверхонь: - внутрішніх - $Ra \leq 0,4$ - полірована, - зовнішніх - $Ra \leq 0,8$ - шліфувана. Перемішуючий пристрій - магнітна мішалка NovAseptic з регульованою швидкістю [65]
ФП-32	Рамний фільтр-прес	1	Рамний фільтр-прес серії 250 Модель Р1-0.5/250-1У-42-42 Площа фільтрування, м ² : 0,5 Кількість камер – 7 Товщина осаду – 15 мм Камерний об'єм – 4 дм ³ Габарити: 950x400x900 мм Маса: 150 кг[66]

BBA-34	Вакуум-випарний апарат	1	Вакуум-випарний апарат МЗС-320 Витрата електроенергії: 2,2 кВт /год Габаритні розміри: 1750x1275x2840 мм Маса устаткування: 900 кг Місткість робоча: 1000 л Місткість повна: 2000 л Вакуум в вручений камері: 0,08-0,085 МПа Робочий тиск: 0,25 МПа [67]
BK-36	Вакуум-кристалізатор	1	Вакуум кристалізатор ємнісного типу Робочий об'єм 0,5 м ³ Матеріал – сталь Обладнаний сорочкою, насосом, мішалкою датчиками тиску, температури та рН Виробник : «Ebner», Германія [68]
Ц-38	Центрифуга	1	Центрифуга підвісна ФПН-1251Л-07 Внутр. наиб. діам. -1250 мм Частота обертання ротора - 1000 об / хв Фактор поділу – 700 Маса завантажений. прод. -1000 кг Робоча тиск. в пневмосистеме- 6-8 кгс / см ² Робочий об'єм ротора -700 дм ³ Габаритні розміри (висота) -5130мм Маса - 4900 кг [69]
ПЄ-39 ПЄ-41 ПЄ-43	Переносна ємність	3	Пересувні піддони для 1 бочки для зберігання та пересування бочок об'ємом до 216 л. Обладнаний витривалими колесами – два фіксовані, два поворотні з гальмами розміром 125 мм. Змінна ручка до піддону полегшує маніпуляції. Маса – 65 кг Габаритні розміри: 800*800*400/555/1120 мм 216 л [70]
BBC-40	Вакуум-сушарка	1	Вакуум-вальцева сушарка Продуктивність, кг/год, не менше а) по готовому продукту 500 б) випареної вологи 1450 Початкова вологість продукту 80% Кінцева вологість продукту 12% Споживання пара -1950 кг/год Робочий тиск пари - 1,0 МПа Температура поверхні сушильного вальця, 3 180 + 2°С Поверхня нагріву сушильного вальця, м ² , не менше загальна 31,5 робоча 29,0 Частота обертання сушильного вальця 1,2-8 об./хв Діаметр сушильного вальця 2000 мм [71]

МД-42	Молоткова дробарка	1	Молоткова дробарка YF8-1 Тип подрібнення - ударний Продуктивність – 30-50 кг/годину Кількість звт, розмір звт – 4 шт: 6 мм, 250, 177, 149, 105 мікрон Кількість оборотів – 2800 об/хв Напруга – 220 Вольт Потужність – 3 кВт Вага - 65 кг Розміри (Д*Ш*В) - 580*360*480мм Країна виробник – Китай[72]
АВ-44	Автоматичноа фасувально-пакувальна машина	1	Автоматичноа фасувально-пакувальна машина Матеріал мішків Паперові та поліетиленові мішки Доза, не більше, кг 50 Продуктивність, мішк./хв 5-6 Точність зважування, % ± 5 Параметри електромережі 380V $\pm 10\%$ 50Hz 5.5KW Вага машини, кг 2000 Габаритні розміри, мм 6000x2000x4900 Параметри повітряної мережі 0.6MPa, 0.5 м3/хв [73]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема синтезу ітаконової кислоти мікроскопічним грибом *A. terreus* DSM 23081 включає в себе допоміжні роботи (підготовка і стерилізація поживних середовищ, приготування титрувальних агентів, приготування та стерилізація підживлюючого розчину глюкози) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрозабірник (ПЗ-1) на висоті 17 м над дахом, де концентрація пилових часток і мікроорганізмів є мінімальною.

ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря

Попередню очистку повітря здійснюють у фільтрі (Ф-2), що забезпечує ступінь очищення 70%. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил, механічні частки діаметром 5–10 мкм затримуються, знижується кількість контамінантів.

ДР 1.3. Компресування повітря

Стиснення повітря відбувається за допомогою компресора (К-3), при цьому створюється тиск величиною 1 Мпа, температура повітря підвищується від 120 до 250°C. Знищується значна кількість контамінуючої мікрофлори.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Для видалення вологи, що утворилася при компресуванні, повітря піддають швидкому охолодженню до 25-30 °C у теплообмінному апараті (Т-4), далі видалену вологу подають на ресивер (Р-5), у якому відбувається видалення конденсату до $W = 60-70 \%$.

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	Лім.	Арк.	Акрушів	
Розроб.		Шульган Я.В.					66	133	
Перевір.		Удимович В.М.							
Консультант									
Н.Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							
						Кафедра БТМ 66			

ДР 1.5. Нагрівання повітря

З метою запобігання утворення конденсату пари, на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, охолоджене повітря у теплообміннику (Т-6) нагрівають до температури 50 °С, W = 50 %.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря пропускають через головний фільтр (Ф-7), в якому фільтрувальним матеріалом є мікроскловолокно. Ступінь очищення становить E = 95 %.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом встановлюють індивідуальний фільтр (ФІ-8, ФІ-17, ФІ-28), в якому фільтруючим матеріалом є боросилікат. Ступінь очищення становить E = 99,995 %. Стерильне повітря до ТП 6.5, 6.7, 7.1.

ДР 2. Приготування титрувальних розчинів

ДР 2.1. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 10 л

Потрібно приготувати 12 мл розчину 6%-ї хлоридної кислоти для підкислення поживного середовища на стадії приготування ПС в інокуляторі об'ємом 10 л.

Для цього в колбу об'ємом 25 мл наливають 10 мл дистильованої води і за допомогою піпетки, при постійному перемішуванні, додають 2 мл концентрованої 36% хлоридної кислоти. Рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції. Колбу закривають скляною пробкою. До ТП 6.5

Тара до ЗВ 15.3.

ДР 2.2. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 100 л

Для приготування 120 мл 6%-ї HCl в колбу об'ємом 250 мл вносять 100 мл дистильованої води і додають при постійному перемішуванні 20 мл 36%-ї HCl, відміряної мірним циліндром. Рідини обов'язково змішують в такому порядку, а

не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції. Колбу закривають скляною пробкою. До ТП 6.6.

Тара до ЗВ 15.3.

ДР 2.3. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в ферментері об'ємом 1 м³

Для приготування 1,2 л 6%-ї хлоридної кислоти, у колбу об'ємом 2 л додають 1 л питної води і 200 мл 36%-ї HCl при постійному перемішуванні. Рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції. До ТП 7.1.

Тара до ЗВ 15.3.

ДР 2.4. Стерилізація 25%-го розчину аміаку для посівних апаратів та ферментера.

В колби об'ємом 25 мл, 250 мл та 2 л подають 10 мл, 100 мл та 1 л 25%-го аміаку (закуплений раніше), відповідно. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв. Простерилізовані розчини подають у посівні апарати об'ємом 10 л, 100 л та ферментер об'ємом 1 м³ автоматично при значеннях рН нижче 3,4.

ДР 3 Приготування та стерилізація підживлюючого розчину глюкози

ДР 3.1. Приготування підживлюючого розчину глюкози для інокулятора об'ємом 10 л.

На технічних вагах зважують 686 г глюкози, поміщають у колбу об'ємом 2 л і додають 1,715 л питної води при постійному перемішуванні. Готовий розчин подають порціями (428,75 л), в інокулятор об'ємом 10 л. До ТП 6.5.

Тара до ЗВ 15.3.

ДР 3.2. Приготування підживлюючого розчину глюкози для інокулятора об'ємом 100 л.

Для приготування підживлюючого розчину через об'ємно ваговий дозатор (ДЗ-15) у реактор об'ємом 25 л (РЗ-16) додають 6 846 г глюкози і додають 17,115 л

питної води при постійному перемішуванні. Потім приготовлений розчин стерилізують у реакторі при 112 °С упродовж 30 хв. Простерилізований розчин подають порціями в інокулятор об'ємом 100 л (ПА-18). До ТП 6.6.

Тара до ЗВ 15.3.

ДР 3.3. Приготування підживлюючого розчину глюкози для ферментера об'ємом 1 м³

Для приготування підживлюючого розчину через об'ємно ваговий дозатор (ДЗ-25) у реактор об'ємом 200 л (РЗ-26) додають 67,844 кг глюкози і додають 169,61 л питної води при постійному перемішуванні. Приготовлений розчин стерилізують у реакторі при 112 °С упродовж 30 хв. Простерилізований розчин подають порціями на стадію виробничого біосинтезу. До ТП 7.1.

Тара до ЗВ 15.3.

ДР 4. Приготування та стерилізація піногасника

ДР 4.1. Приготування та стерилізація піногасника

Через об'ємно-ваговий дозатору збірник подають 500 мл жирового піногасника. Стерилізують піногасник за температури 131°С упродовж 20 хв. Стерильний піногасник подають у ферментер за необхідності.

Тара до ЗВ 15.3.

ДР 5. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 5.1. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування інокуляту потрібно 500 мл поживного середовища (ПС). Вміст компонентів для приготування ПС об'ємом 500 мл наведено наведено у табл. 7.1.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 500 мл середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 500 мл ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
NH ₄ NO ₃	3,0	1,5	Композиція А	200
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1,0	0,5		
CaCl ₂ ×H ₂ O	5,0	2,5		
FeCl ₃ ×6H ₂ O	0,002	0,001		
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,008	0,004		
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,015	0,008		
Вода		200 (мл)	Композиція Б	75
КН ₂ РO ₄	0,8	0,4		
Вода		75 (мл)	Композиція В	225
Глюкоза	180,0	90		
Вода		225 (мл)		

ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1,5 г NH₄NO₃, 0,5 MgSO₄×7H₂O, 2,5 CaCl₂×H₂O, 0,001 г FeCl₃×6H₂O, 0,004 г ZnSO₄×7H₂O і 0,008 CuSO₄×5H₂O і поміщають в колбу об'ємом 1 л, доливають 200,0 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення солей, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують у автоклаві при 131°C протягом 40 хв.

Тара до ЗВ 15.3.

ДР 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,4 г калій дигідрофосфату і поміщають в колбу об'ємом 200 мл. Додають 75,0 мл дистильованої води і перемішують до розчинення солі після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Після цього стерилізують в автоклаві при 131°C 40 хв.

Тара до ЗВ 15.3.

ДР 5.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 90 г глюкози і поміщають в колбу об'ємом 500 мл. Додають 225 мл дистильованої води і перемішують до розчинення глюкози після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Після цього стерилізують в автоклаві при 112°C 30 хв.

Тара до ЗВ 15.3.

ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 10 л, потрібно приготувати 4,9 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 4,9 л середовища наведено у табл. 7.2.

Для засіву даного інокулятора потрібно внести 0,5 л посівного матеріалу, також враховується конденсат (10%), оскільки стерилізація гострою парою проходить у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування поживного середовища, становить 4,045 л.

Таблиця 7.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4,9 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 4,9 л ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, л
NH ₄ NO ₃	3,0	14,7	Композиція А	3,555
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1,0	4,9		
CaCl ₂ ×H ₂ O	5,0	24,5		
FeCl ₃ ×6H ₂ O	0,002	0,0098		
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,008	0,0392		
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,015	0,0735		
KN ₂ PO ₄	0,8	3,92		
Вода		3,555 (л)		
Конденсат		0,355 (л)		0,355
Глюкоза	40,0	196	Композиція Б	0,49
Вода		0,49 (л)		

ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 14,7 г NH₄NO₃, 4,9 MgSO₄×7H₂O, 24,5 CaCl₂×H₂O, 0,0098 г FeCl₃×6H₂O, 0,0392 г ZnSO₄×7H₂O, 0,0735 CuSO₄×5H₂O і 3,92 г KN₂PO₄. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2 л і додають 1 л води. Після розчинення вміст з колби подають в посівний апарат об'ємом 10 л (ПА-9), додають 2,555 л води.

В інокулятор, який обладнаний датчиком рН, додають 6%-ий розчин соляної кислоти до досягнення рН 4. Стерилізацію проводять безпосередньо в інокуляторі

при 131°C (0,15 МПа) упродовж 1 год. Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль ПС .

Тара до ЗВ 15.3.

ДР 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 196 г глюкози, наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л і додають 0,49 л дистильованої води і перемішують до розчинення глюкози після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Після цього стерилізують в автоклаві при 112°C 30 хв.

Тара до ЗВ 15.3.

ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 100 л, потрібно приготувати 48,9 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 48,9 л середовища наведено у табл. 7.3.

Для засіву даного інокулятора потрібно внести 4,9 л посівного матеріалу, також враховується конденсат (10%), оскільки стерилізація гострою парою проходить у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування поживного середовища, становить 40 л.

Таблиця 7.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 48,9 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 48,9 л ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, л
NH ₄ NO ₃	3,0	146,7	Композиція А	35,1
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1,0	48,9		
CaCl ₂ ×H ₂ O	5,0	244,5		
FeCl ₃ ×6H ₂ O	0,002	0,0978		
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,008	0,3912		
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,015	0,7335		
KH ₂ PO ₄	0,8	39,12		
Вода		35,1 (л)		
Конденсат		3,51 (л)		3,51
Глюкоза	40,0	1 956	Композиція Б	4,9
Вода		4,9 (л)		
Конденсат		0,49 (л)		

ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 146,7 г NH_4NO_3 , 48,9 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 244,5 $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,0978 г $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,3912 г $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,7335 $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ і 39,12 г KH_2PO_4 . Наважки поміщають у реактор об'ємом 10 л (РЗ-14), через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-13) додають 8 л води.

Для кращого розчинення солей у сорочку реактора подають гарячу пару і нагрівають розчин солей до 40°C при перемішуванні 50-100 об/хв. Після розчинення солей, розчин самоплином подають у посівний апарат об'ємом 100 л (ПА-18), обладнаний сорочкою і мішалкою, і додають 27,1 л води питної.

У посівний апарат, обладнаний датчиком рН, додають 6%-ий розчин соляної кислоти до досягнення рН 4. Стерилізацію проводять безпосередньо у посівному апараті при 131°C (0,15 МПа) упродовж 1 год. Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль ПС.

Тара до ЗВ 15.3.

ДР 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-11) подають 1 956 г глюкози у реактор об'ємом 10 л (РЗ-12) і додають 4,9 л води. Для кращого розчинення глюкози у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40°C при перемішуванні 50-100 об/хв.

Стерилізацію проводять безпосередньо у реакторі при 112°C упродовж 30 хв. Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль.

Тара до ЗВ 15.3.

ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м^3

Для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м^3 , потрібно приготувати 484,6 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 484,6 л середовища наведено у табл. 7.4.

Для засіву даного ферментера потрібно внести 48,9 л рідкого посівного матеріалу, також враховується конденсат (10%), оскільки стерилізація ПС проходить безпосередньо у ферментері. Тоді об'єм води, потрібний для приготування ПС, становить 396,09 л.

Таблиця 7.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 484,6 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 484,6 л ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, л
NH_4NO_3	3,0	1 453,8	Композиція А	347,59
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,0	484,6		
$\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	5,0	2 423		
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,002	0,9692		
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,008	3,8768		
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,015	7,269		
KH_2PO_4	0,8	387,68		
Вода		347,59 (л)		
Конденсат		34,76 (л)		34,76
Глюкоза	40,0	19 384	Композиція Б	48,5
Вода		48,5 (л)		
Конденсат		4,85 (л)		4,85

ДР 5.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-19) подають 1 453,8 г NH_4NO_3 , 484,6 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 2 423 г $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,9692 г $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 3,8768 г $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 7,269 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ і 387,68 г KH_2PO_4 у реактор, обладнаний сорочкою, об'ємом 100 л (РЗ-20) і додають 50 л води.

Для кращого розчинення солей у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин солей до 40 °С при перемішуванні 50-100 об/хв. Приготований розчин переміщують за допомогою насоса (Н-21) в ферментер (Ф-29) і додають 297,59 л води питної.

У ферментер, обладнаний датчиком рН, додають 6%-ий розчин соляної кислоти до досягнення рН 4 (від ДР2.3.). Стерилізацію проводять безпосередньо у ферментері при 131°С (0,15 МПа) упродовж 1 год. Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль ПС.

Тара до ЗВ 15.3.

ДР 5.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Через об'ємно ваговий дозатор (ДЗ-22) у реактор об'ємом 100 л (РЗ-23) подають 19 384 г глюкози і додають 48,5 л води. Для кращого розчинення глюкози у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40°C при перемішуванні 50-100 об/хв.

Стерилізацію проводять безпосередньо у реакторі при 112°C упродовж 30 хв. Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль.

Тара до ЗВ 15.3.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *A. terreus* DSM 23081 зберігають у пробірках на скошеному середовищі Чапика, при 4 °C. Пересіви здійснюють кожні 3 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять в строго асептичних умовах.

*ТП 6.2. Одержання робочої культури *A. terreus* DSM 23081 на агаризованому середовищі*

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з середовищем Чапика, в асептичних умовах розсівають петлею до ізольованих колоній на чашках Петрі з агаризованим середовищем Чапек Докс. Вирощують при температурі 35°C упродовж 72 год.

*ТП 6.3. Вирощування інокуляту *A. terreus* DSM 23081 на агаризованому середовищі*

Ізольовані колонії від ТП 4.2 в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки з агаризованим середовищем Чапек Докса до ізольованих колоній, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Пробірки інкубують 72 год при температурі 35°C.

ТП 6.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

У колбу з композицією А (від ДР 5.1.1.), вносять 75 мл композиції Б (від ДР 5.1.2) і 225 мл композиції В (від ДР 5.1.3.). Розчин перемішують і розливають по 125 мл в чотири стерильні качалочні колб на 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *A. terreus* DSM 23081, вирощеною на агаризованому середовищі Чапек Докс, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію клітин, одержану з однієї пробірки.

Штам вирощують у колбі на качалці (350 об/хв) при 35°C упродовж 72 год. Після завершення вирощування здійснюють мікробіологічний контроль в кожній з колб. В асептичних умовах інокулят з 4 колб переносять в стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 6.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

В інокулятор об'ємом 10 л з композицією А об'ємом 3,91 л (від ДР 5.2.1) через стерильну засівну колбу об'ємом 1 л вносять 490 мл розчину глюкози (від ДР 5.2.2). Після об'єднання композицій, через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 6.4). Включають перемішуючий пристрій, аерацію, в сорочку інокулятора подають пару.

Починаючи з 48 години рН культуральної рідини різко починає знижуватися, у такому випадку за допомогою засівної колби вносять 25%-ий розчин аміаку для досягнення оптимального значення рН 3,4 (від ДР 2.4.).

Культивування здійснюють при температурі 35 °С упродовж 72 год, витрати повітря 1 л/(л·хв). Кожні 3-4 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль і концентрацію біомаси ($x=4,5-5,0$ г/л).

Відпрацьоване повітря до ЗВ 15.2.

ТП 6.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

У посівний апарат з композицією А (від ДР 5.3.1) вносять композицію Б (від ДР 5.3.2) у кількості 5,35 л із збірника об'ємом 10 л. Після цього в посівний апарат подають інокулят за допомогою перистальтичного насосу (Н-10). Включають перемішуючий пристрій, аерацію, в сорочку інокулятора подають пару.

Починаючи з 48 години рН культуральної рідини різко починає знижуватися, у такому випадку за допомогою засівної колби вносять 25%-ий розчин аміаку для досягнення оптимального значення рН 3,4 (від ДР 2.4.).

Культивування здійснюють при температурі 35°C упродовж 72 год, витрати повітря 1 л/(л·хв). Кожні 3-4 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль посівного матеріалу., визначають концентрацію біомаси ($x = 4,5-5,0$ г/л).

Відпрацьоване повітря до ЗВ 15.2.

ТП 7. Виробничий біосинтез

ТП 7.1. Виробничий біосинтез у ферментері 1 м³

У ферментер (Ф-29) об'ємом 1 м³ з композицією А (від ДР 5.4.1.) подають композицію Б (від ДР 5.4.2) за допомогою перистальтичного насоса (Н-24). Після цього через трубу перетискування подають посівний матеріал (від ТП 6.6).

У сорочку ферментера подається пара, вмикається перемішуючий пристрій і аерація. Починаючи з 48 години рН культуральної рідини різко починає знижуватися, у такому випадку додають 25%-й розчин аміаку (від ДР 2.4.) для досягнення оптимального значення рН 3,4.

Упродовж культивування концентрація глюкози знижується, тому на 48, 72, 96 і 120 год культивування з реактора (РЗ-26) перистальтичним насосом (Н-27) подається підживлюючий 40 %-й розчин глюкози (від ДР 3.3.).

Біосинтез здійснюють за температури 35°C упродовж 168 год.

За процесу піноутворення зі збірника автоматично подається піногасник (від ДР 4.1).

У процесі культивування кожні 4 год відбирають проби культуральної рідини для здійснення мікробіологічного контролю. У пробі, відібраній на 168 год

культивування, визначають концентрації ітаконової кислоти ($C = 162$ г/л) і біомаси ($x = 9-10,5$ г/л).

Відпрацьоване повітря до *ЗВ 15.2*.

ТП 8. Відділення міцелію

ТП 8.1 Відділення міцелію на рамному фільтр-пресі

Після культивування, культуральна рідина від *ТП 7.1* об'ємом 484 л із ферментера (Ф-29) відцентровим насосом (Н-30) подається до збірника (З-31) об'ємом 700 л, а потім під тиском потрапляє в канал рамного фільтр-пресу (ФП-32) і з нього через отвори в стінці рами потрапляє у внутрішній простір, який обмежений двома фільтрувальними перегородками і внутрішньою поверхнею рами. Міцелій затримується в цьому просторі, а нативний розчин в кількості 438 л проходить через фільтрувальні серветки, після чого по жолобам і каналам за допомогою відцентрового насосу (Н-33) через крани потрапляє у ВВА-34.

Після фільтрування здійснюють промивання міцелію для того щоб витиснути нативний розчин із осаду. Далі міцелій на фільтрі продувають стисненим повітрям задля витіснення промивних вод із пор осаду. Потім плити розсувають, осад віддають на утилізацію.

Весь процес проводимо з поступовим збільшенням тиску від 0 до 0,2-0,3 МПа, що забезпечує більш високу потужність фільтра.

ТП 9. Упарювання

ТП 9.1 Упарювання на вакуум-апараті

Фільтрат об'ємом 438 л після відділення (від *ТП 8.1*) подають до вакуум-випарного апарату (ВВА-34), де за допомогою насиченої пари фільтрат позбавляється зайвої вологи. Фільтрат упарюється при температурі 50-60°C до 1/4-1/10 первісного обсягу, тобто до 108 л. Далі упарений розчин за допомогою відцентрового насосу (Н-35) подається в вакуум-кристалізатор (ВК-36) до *ТП 10.1*.

ТП 10. Кристалізація

ТП 10.1 Кристалізація на вакуум-кристалізаторі

Упарений розчин об'ємом 108 л від ТП 9.1 подається в вакуум-кристалізатор (ВК-36). Для початку здійснюється контролю рівня рН, і корегується хлоридною кислотою до рівня 3,2-3,4. Далі в кристалізаторі створюють вакуум та подають в сорочку холодну воду, і знижують температуру до 13-15°C, а потім повільно опускають до 4°C. Кристалізується ітаконова кислоти до вмісту в розчині - 75-80 %. Кристалізована ітаконова кислота об'ємом 106 л за допомогою відцентрового насосу (Н-37) надходять до ТП 11.1. для відділення кристалів центрифугуванням.

ТП 11. Відділення кристалів

ТП 11.1. Відділення кристалів центрифугуванням

Відділення кристалів від маточного розчину об'ємом 106 л ведеться на центрифугі (Ц-38). Застосовують підвісні центрифуги з нижнім ручним вивантаженням осаду. Для початку центрифугу приводять в рух, і при частоті обертання близько 300 об/хв заливають суспензію кристалів ітаконової кислоти, далі частоту обертання ротора збільшують до 1 000 об/хв. Відбувається відділення маточного розчину від кристалів ітаконової кислоти, через 1-1,5 хвилини від початку роботи, коли маточний розчин перестане витікати, кристали промивають водою з температурою 35°C, до повного освітлення рідини. Далі ротор зупиняють, відкривають кришку і вручну вивантажують кристали ітаконової кислоти. Вологість кристалів становить 2-3%. Після центрифугування кристали ітаконової кислоти, масою 52 кг, за допомогою переносної ємності (ПЄ-39) потрапляє у ВВС-40. Маточний розчин до ЗВ 15.1.

ТП 12. Сушіння

ТП 12.1 Сушіння на вакуум сушарці

Після етапу відділення кристалів ітаконової кислоти масою 52 кг від ТП 11.1 йде етап сушіння у вакуумній сушарці (ВВС-40). Висушуваний матеріал поміщається на дека товщиною 0,5-4 см, які встановлюються на плити. Камера герметично герметично закривається і камера з'єднуються патрубком з вакуумною лінією. Сушіння відбувається під вакуумом при температурі близько 50 °C.

Висушування здійснюється до отримання залишкової вологи – 5%. Після сушарки отримуємо твердий шар матеріалу масою 15,5 кг, який за допомогою пересувної ємності (ПЄ-41) подається на стадію подрібнення до ТП 13.1.

ТП 13. Подрібнення

ТП 13. Подрібнення на молотковій дробарці

Висушена ітаконова кислота масою 15,5 кг подрібнюється на молотковій дробарці (МД-42) до розміру часток 0,5 мм. Після закінчення процесу подрібнювання, отриманий продукт масою 15,3 кг передають за допомогою переносної ємності (ПЄ-43) на стадію пакування та маркування ПМВ 14.1.

ПМВ 14. Пакування, маркування та відвантаження

ПМВ 14.1. Пакування, маркування та відвантаження

Після подрібнення від ТП 13.1 ітаконова кислота масою 15,3 кг надходить на стадію пакування, маркування та відвантаження. Пакування здійснюється в 5 пакетів з полімерних матеріалів по 3 кг в кожному, за допомогою (АВ-44). Пакети в які буде упакована продукція мають бути марковані принтом-етикеткою на якій зазначено назва, виробник, маса та термін придатності. Після пакування та маркування готовий продукт відправляється на склад для зберігання.

ЗВ 15. Знешкодження відходів

ЗВ 15.1. Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи від ТП 11.1 та після санітарної підготовки виробництва очищують за допомогою біоплато.

ЗВ 15.2. Знешкодження газоподібних відходів

Відпрацьоване повітря, яке надходить від ТП 6.5, ТП 6.6 та ТП 7.1 направляють на очищення до скрубера Вентурі.

ЗВ 15.3. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи від ДР 2.1, ДР 2.2, ДР 2.3, ДР 3.1, ДР 3.2, ДР 3.3, ДР 4.1, ДР 5.1.1, ДР 5.1.2, ДР 5.1.3, ДР 5.2.1, ДР 5.2.2, ДР 5.3.1, ДР 5.3.2, ДР 5.4.1 та ДР 5.4.2 відправляються на знешкодження на спеціально відведений полігон.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 8.1.

Карта контрольних точок виробництва ітаконової кислоти

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
1	2	3	4	5
Підготовка аераційного повітря в лабораторії Кт 1.2. Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,4 МПа t = 120-250 °C
Кт 1.4 Охолодження повітря та видалення зайвої вологи	Охолоджене повітря, повітря після видалення зайвої вологи, температура	Термометр технічний, психометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	t = 30 °C, W = 60 %
Кт 1.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 40 °C
Кт 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі головного очищення	E = 95 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,995 %

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шульган Я.В.			РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва		Літ.	Арк.
Перевір.		Удимович В.М.						81
Консультант								133
Н.Контр.							Кафедра БТМ	
Затверд.		Пирог Т.П.					81	

Кх 2.1., 2.2., 2.3. Приготування та стерилізація титрувальних агентів Приготування 6% розчину HCl	Розчин HCl Концентрація		Після приготування розчину	c = 6%
Кт, Км 2.4. Приготування та стерилізація титрувальних агентів Стерилізація 25%-го розчину аміаку	Розчин аміаку Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Після стерилізації розчину	t = 131 °C, τ = 40 хв, p = 0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 3.1., 3.2., 3.3. Приготування та стерилізація підживлювального розчину Приготування та стерилізація підживлюючого розчину глюкози	Розчин глюкози Температура, тиск, частота обертів мішалки, час, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертів визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	c = 40% t = 112 °C, p = 0,05 МПа, ω = 120 об/хв, τ = 20 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1. Приготування та стерилізація піногасника Приготування та стерилізація піногасника для виробничого біосинтезу	Піногасник Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, τ = 20 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для виращування інокуляту в колбах на качалках Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, p = 0,15 МПа, τ = 60 хв, відсутність мікробіоти

Кт, Км 5.1.2. <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирошування інокуляту в колбах на качалках</i> <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,15\text{ МПа}$, $\tau = 60\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1.3. <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирошування інокуляту в колбах на качалках</i> <i>Приготування і стерилізація композиції В</i>	Композиція В Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,05\text{ МПа}$, $\tau = 30\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх, 5.2.1., 5.3.1., 5.4.1. <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирошування посівного матеріалу в інокуляторі</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А Температура, тиск, час, рівень рН, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура і рН визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,15\text{ МПа}$, $pH = 4,5$, $\tau = 60\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.2.2., 5.3.2., 5.4.2. <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирошування посівного матеріалу в інокуляторі</i> <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,05\text{ МПа}$, $\tau = 30\text{ хв}$, відсутність мікробіоти

Кт, Км 6.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>A. terreus DSM 23081</i> Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольован их мутацій	Термометр, годинник мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно, мікробіологічний контроль при пересівах кожні 3 місяці	$t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, відсутність сторонньої мікробіоти.
Кт, Км 6.2 <i>Одержання робочої культури на агаризованому середовищі</i>	Колекційна культура <i>A. terreus DSM 23081</i> Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольован их мутацій	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно, мікробіологічний контроль проводять кожні 4 годин	$t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72\text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.3 <i>Вирощування культури на агаризованому середовищі</i>	Колекційна культура <i>A. terreus DSM 23081</i> Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно, мікробіологічний контроль проводять кожні 4 годин	$t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72\text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.4 <i>Вирощування культури в колбах на качалках</i>	Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, рН і швидкість обертання визначаються і контролюються і безперервно, мікробіологічний контроль мікроскопіюванням проводять кожні 4 годин	$t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72\text{ год}$, $\omega = 350$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км, Кх 6.5 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л</i>	Посівний матеріал, Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, рівень рН, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Термометр, годинник, тахометр, рН-метр, мікроскоп	Температура, рН і швидкість обертання визначаються і контролюються безперервно, мікробіологічний контроль мікроскопіюванням проводять кожні 4 годин	$t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72\text{ год}$, $\omega = 350\text{ об/хв}$, $\text{pH} = 3,4$ відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 6.6 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 100 л</i>	Посівний матеріал, Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, рівень рН, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Термометр, годинник, тахометр, рН-метр, мікроскоп	Температура, рН і швидкість обертання визначаються і контролюються безперервно, мікробіологічний контроль мікроскопіюванням проводять кожні 4 годин	$t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72\text{ год}$, $\omega = 350\text{ об/хв}$, $\text{pH} = 3,4$ відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 7 <i>Виробничий процес у ферментері об'ємом 1 м³</i>	Посівний матеріал, Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, рівень рН, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Термометр, годинник, тахометр, рН-метр, мікроскоп	Температура, рН і швидкість обертання визначаються і контролюються безперервно, мікробіологічний контроль мікроскопіюванням проводять кожні 4 годин	$t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 168\text{ год}$, $\omega = 350\text{ об/хв}$, $\text{pH} = 3,4$ відсутність сторонньої мікробіоти

8.2. Мікробіологічний контроль

Протягом культивування *A. terreus* DSM 23081 періодично (кожні 4 години) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, концентрації біомаси, а також вмісту джерела вуглецю (глюкози) і азоту (амоній нітрату). Після закінчення ферментації відбирають пробу для визначення концентрації ітаконової кислоти у культуральній рідині.

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованим поживним середовищем і мікроскопування.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій і з сусло-агаром (СА) – для грибів і дріжджів

Колонії *A. terreus* DSM 23081 коричневого або помаранчево-коричневого кольору (рис. 8.1). Колонії можуть бути плоскими або з помітними дрібними відцентровими борозенками, низькі, оксамитові, іноді пухнасті, краї зазвичай тонкі і рівні, з численними конідіальними головками, що додають колонії характерний вигляд – коричнево-темно-жовті, глинисто-коричневі [74].



Рис. 8.1. Колонії *A. terreus* DSM 23081

Зазвичай на виробництві немає достатньо часу для очікування результатів мікробного контролю висівом на чашки Петрі, тому частіше використовують метод мікроскопіювання.

Чистоту випробуваної культури та її морфологію оцінювали методом світлової мікроскопії вітальних препаратів фазово-контрасній схемі освітлення та інструментальному збільшенні $\times 400$. На *рис. 8.2* представлено вигляд міцелію досліджуваного гриба через 48 год (а) і 144 год (б) після початку культивування [17].

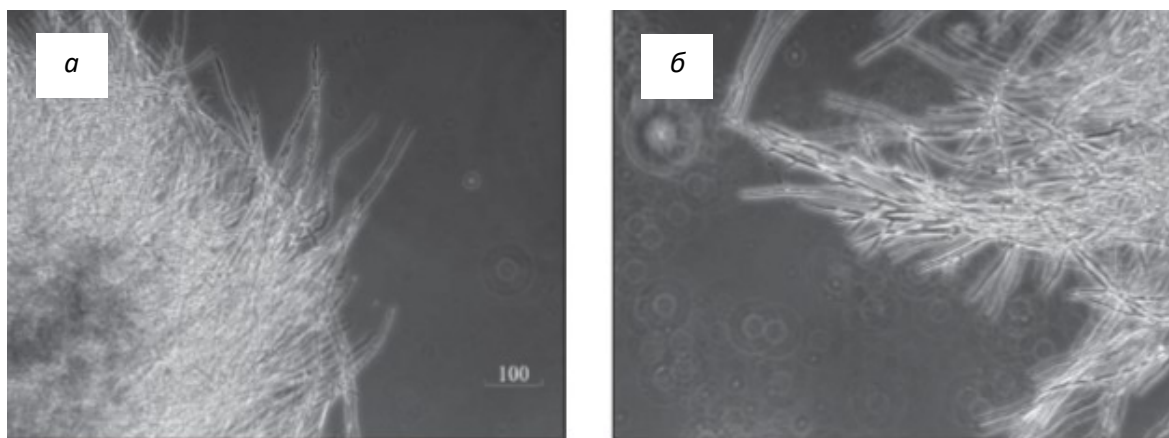


Рис. 8.2. Міцелій *A. terreus* DSM 23081 через 48 год (а) і 144 год (б) після початку глибинного культивування. Фазовий контраст ($\times 400$)

8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.3.1. Концентрація біомаси

Концентрація біомаси. Після завершення культивування міцелій *A. terreus* DSM 23081 відділяли фільтруванням культуральної рідини через лавсанову тканину. Залишки міцелія осаджували центрифугуванням 6000 g, 20 хв. Міцелій висушують упродовж 10 год за температури 100°C у вакуумній печі до постійної ваги. Після висушування суху біомасу зважують і перераховують у г/л [7].

8.3.2. Концентрація ітаконової кислоти

Концентрацію ітаконової кислоти в культуральній рідині визначали методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на аналітичній колонці довжиною 250 мм і внутрішнім діаметром 4,6 мм, заповненою октадецилсилікагелем з розміром частинок 5 мкм (RP 18). В якості елюенту використовували розчин дигідрофосфату натрія 0,1 моль/дм³. Температура

колонки 25°C. вимірювання проводили за довжини хвилі детектора 210 нм. Швидкість потоку подачі елюента становить 0,65 см³/хв. Об'єм проби для інжекції 10-20 мкл [7].

8.3.3. Концентрація джерела Карбону та Нітрогену

Концентрація глюкози. Концентрацію глюкози визначають глюкозооксидазним методом. Принцип методу полягає в тому, що глюкозооксидаза каталізує перенесення двох водневих атомів з першого вуглецевого атома глюкози на кисень, розчинений в рідкому реагенті. При цьому в ході реакції утворюється в еквімолярних кількостях перекис водню. Тобто концентрація перекису водню, що утворився, точно дорівнює концентрації глюкози в культуральній рідині.

Глюкозооксидазний метод визнаний сьогодні одним з найбільш точних кількісних методів визначення глюкози.

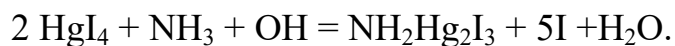
Досить популярним є використання глюкометра OneTouch і тест-смужки до них (виробництво компанії LifeScan, США) Тест-смужка OneTouch містить всі необхідні хімічні компоненти для двоетапного глюкозооксидазного методу, включаючи ферменти глюкозооксидазу і пероксидазу, які сорбовані на унікальній пористій гідрофільній мембрані. Результатом реакції є утворення забарвленого комплексу [75]. Інтенсивність забарвлення реєструється відбивним міні фотоелектроколориметром [14].

Концентрація азоту. В середовищі для культивування *A. terreus* DSM 23081 джерелом азоту є нітрат амонію, який одночасно містить амінну групу і нітратну. Тому концентрацію азоту можна визначити за аміним азотом або за нітратами.

Визначення амінного азоту

Метод Несслера: у лужному розчині аміак реагує з тетраїодомеркуратом (II) калію, утворюючи різні жовто-коричневі сполуки, що випадають в осад або (при малих концентраціях) переходять у колоїдні розчини. Реакція описується

рівнянням:



Вміст азоту, ртуті та йодиду в осаді виражається співвідношенням 1:2:3, проте можлива присутність в осаді та інших сполук ($\text{OHg}_2\text{NH}_2\text{I}$ і ін.). Деяка невизначеність складу з'єднання, що утворюється, вимагає точного дотримання умов проведення визначення як при аналізі зразку, так і при побудові калібрувального графіка. До таких умов відноситься концентрація лугу. За великого надлишку лугу може відбутися розкладання $\text{NH}_2\text{Hg}_2\text{I}_3$ з утворенням оксиду ртуті [76].

Для визначення аміаку до 1 мл супернатанту культуральної рідини додають 1 мл реактиву Несслера. Коефіцієнт екстинції вимірюють при довжині хвилі 400-425 нм. Концентрацію аміаку визначають за калібрувальним графіком. Однак, фотометричному визначенню азоту даним методом заважають іони, що випадають в осад у лужному середовищі і утворюють нерозчинні сполуки з йодид-іонами та іонами ртуті (зокрема, магній, який міститься в середовищі для культивування DSM 23081).

Індофеноловий метод: метод заснований на утворенні барвника індофенолового синього при конденсації аміаку з фенольним реагентом в лужному середовищі за присутності окисників гіпохлориту або гіпоброміту натрію. Цей метод є більш зручним, оскільки утворюється істинний розчин і максимум світлопоглинання утвореної сполуки знаходиться у видимій області спектра. Визначення проводять при довжині хвилі 624 нм [18].

Визначення концентрації нітратів

Концентрацію нітратів визначають в супернатантів, отриманого центрифугуванням культуральної рідини (6000 g) протягом 20 хв.

Нітрати визначали за допомогою ВЕРХ (Agilent Technologies, Каліфорнія, США). Обладнання складається з колонки Anion IC-ПАКТМ (50 × 4,6 мм, розмір часток 10 мкм; Waters Millipore, США). Швидкість потоку рухомої фази

підтримували на рівні 1,2 мл/хв. УФ-детектор було встановлено при 220 нм. Рухома фаза (рН 8,5) складалася з боратного буфера/концентрату глюконату, метанолу, ацетонітрилу і деіонізованої води у співвідношення 2:12:12:74 (об/об/об/об). Боратний буфер/концентрат глюконату складається з 0,07 М глюконату натрію, 0,3 М H_3BO_3 , 0,1 М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ і 3,8 М гліцерину в деіонізованій воді (100 мл). Ін'єкційний обсяг становить 50 мкл [19].

8.4. Показники якості готового продукту

8.4.1 Визначення вологовмісту

Метод висушування є найбільш надійними методами визначення вмісту води в продукті. Принцип їх полягає в тому, що певну наважку речовини висушують до постійної маси і по різниці між початковою масою і масою сухого залишку знаходять кількість води в досліджуваному продукті [77].

Для визначення вологості застосовують такі методи висушування: метод висушування до постійної маси в шафі при температурі 105°C; метод висушування інфрачервоними променями; швидкий метод висушування при температурі 130°C.

Визначення методом висушування до постійної маси при температурі 105°C.

Для наважки речовини і подальшого висушування користуються невисокими широкими скляними бюксами (діаметр 5-6 см, висота 4-5 см), забезпеченими добре притертими кришками [77].

Попередньо визначають постійну масу бюкса.

Для цього вимитий бюкс поміщають в сушильну шафу на 30 хв при температурі 105 ° С, потім його ставлять в ексікатор, охолоджують і зважують, після чого знову поміщають в сушильну шафу на 10-15 хв і після охолодження зважують. Періодичне підсушування і зважування проводять до тих пір, поки бюкс не набуде постійної маси.

У висушений бюкс зважують 2-5 г подрібненої речовини. Висота шару цієї речовини в бюксі не повинна перевищувати 1 см.

Бюкс у відкритому вигляді ставлять в сушильну шафу, попередньо нагрітий до 105 ° С. Поряд з бюксе кладуть кришку.

При масових дослідженнях число бюксів має бути не дуже велике (не більше 4-8), так як накопичується в шафі волога перешкоджає висушування проб.

Висушування проводять протягом 4-5 годин, після чого бюкс виймають, з термостата, поміщають в ексикатор, для охолодження на 30 хв і зважують на аналітичних вагах [77].

Потім бюкс з навішуванням повторно поміщають в сушильну шафу і через 1,0-1,5 год повторюють ту ж операцію охолодження і зважування. Так надходять до тих пір, поки різниця між результатами двох зважувань буде не більше 0,0005 г. У цьому випадку маса речовини вважається постійною [77].

У деяких випадках після зменшення маси матеріалу, що висушується речовини настає її збільшення, що обумовлюється наявністю окислювальних процесів. За постійну масу тоді приймають останню ще спадну масу. Таким чином, в результаті аналізу отримують два показники: масу бюкса і вологого речовини, взятого на висушування, і масу сухого залишку і бюкса, отриману після висушування. Втрата маси в грамах, віднесена до маси наважки, з перерахунком на 100 г речовини, висловлює вологість досліджуваного продукту.

Вологість речовини знаходять за формулою

$$w = \frac{b}{a} \times 100,$$

де: b - спад в масі навішення після висушування, що визначається за різницею;

a-маса випробуваної вологої речовини (навішування).

Знаючи вологість готвого продукту – 5%, легко визначити процентний вміст, в ньому сухих речовин по формулі:

$$C_{св} = 100 - w$$

8.4.2. Визначення рН ітаконової кислоти

Для визначення значення рН розчинів широко використовують кілька методів. Водневий показник можна приблизно оцінювати за допомогою індикаторів, точно виміряти рН-метром або визначати аналітично шляхом, проведенням кислотно-основного титрування [78].

Для грубої оцінки концентрації водневих іонів широко використовуються кислотно-основні індикатори - органічні речовини-барвники, колір яких залежить від рН середовища. До найбільш відомих індикаторів належать лакмус, фенолфталеїн, метиловий оранжевий (метилоранж) та інші. Індикатори здатні існувати в двох по-різному забарвлених формах - або в кислотній, або в основній. Зміна кольору кожного індикатора відбувається в своєму інтервалі кислотності, зазвичай становить 1-2 одиниці [78].

Використання спеціального приладу - рН-метра - дозволяє вимірювати рН в ширшому діапазоні і більш точно (до 0,01 одиниці рН), ніж за допомогою універсальних індикаторів. Спосіб відрізняється зручністю і високою точністю, особливо після калібрування індикаторного електроду в обраному діапазоні рН. Дозволяє вимірювати рН непрозорих і кольорових розчинів і тому широко використовується [78].

Значення рН може змінюватися в широкому діапазоні при зміні температури. Так, 0,001 молярний розчин NaOH при 20°C має рН = 11,73, а при 30°C рН = 10,83. Вплив температури на значення рН пояснюється різною дисоціацією іонів водню (H^+) і не є помилкою експерименту. Температурний ефект неможливо компенсувати за рахунок електроніки рН-метра [78].

8.4.3. Визначення ступеня подрібнення порошку ітаконової кислоти

Визначаємо ситовим методом, тобто просіювання проби порошку через набір сит з подальшим зважуванням та розрахунком відсоткового вмісту [79].

Для проведення методу знадобиться спеціальна установка з ситами, пори яких різного діаметру. Установка працює при частоті струшування від 150-200 за хвилину.

Опис: наважку порошку ітаконової кислоти (100 г) висипають на верхнє сито і закривають кришкою. Установку включають та чекають поки закінчиться розсів.

Час закінчення розсіву досягається в момент, коли кількість порошку, що проходить протягом однієї хвилини через сито, що затримує найбільшу його масу, змінюється менш ніж на 0,1% маси проби для випробування.

Далі кожену фракцію зважують з похибкою не більше 0,05 г.

Обрахунок результатів:.. Випробування вважають дійсним, якщо сума мас усіх фракцій порошку не менше 98% маси проби для випробування. Масову частку фракцій, що залишилися на кожному ситі, і фракції, зібраної на піддоні, X,%, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{m_n}{m} \times 100$$

де m_n - маса даної фракції порошку, г;

m - сума мас усіх фракцій порошку, г [79].

РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

9.1 Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формуванням завдання на розробку системи автоматизації

Ітаконова кислота являє собою кристалічний порошок, який добре розчиняється у воді (8,3 г кислоти на 100 мл води), також розчинна в етанолі, метанолі, диоксані, проте майже не розчиняється в диетиловому ефірі та бензолі.

Слід згадати і про практичне використання даної речовини. Ітаконова кислота використовується або як кислота, або у вигляді ефірів для поліпшення властивостей вінілових полімерів. Значна частка ітаконової кислоти використовується у вигляді складних ефірів, отримання яких ґрунтується на реакції зі спиртами самої кислоти або її ангідриду в присутності кислотного каталізатора з виходами до 80%.

A. terreus DSM 23081 є облігатним аеробом, тому для її культивування потрібна постійна подача аераційного повітря.

Асептичні умови забезпечуються стерилізацією обладнання і комунікацій, поживного середовища, аераційного повітря. Для запобігання контамінації у ферментері створюється надлишковий тиск.

A. terreus DSM 23081 випробовував різні синтетичні середовища для виробництва ітаконової кислоти, який містив лише один тип джерела вуглецю (глюкоза, ксилоза, сахароза, манноза або гліцерин) при концентрації 50 г/л. Пізніше гідролізат целюлозної пульпи використовували як ферментаційне середовище, який містив близько 53 г/л глюкози як джерела вуглецю. Для всіх експериментів початковий рН носій був налаштований на 3,0[80].

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ			94
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва	Лім.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Шульган Я.В.					94	133
Перевір.		Удимович В.М.						
Консультант								
Н Контр						Кафедра БТМ		

Всі ферментаційні середовища були доповнені наступними поживними речовинами(г/л):

- Глюкоза – 320;
- KH_2PO_4 – 0,8;
- NH_4NO_3 – 3;
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1;
- $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ – 5;
- $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,00167;
- $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,008;
- $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,015;

Цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу та час підготовки ферментера до роботи. Підготовка ферментера включає: миття та огляд, перевірка на герметичність, підігрів апарату, стерилізація, охолодження, завантаження середовища, засів, вивантаження культуральної рідини.

Кількість поживного середовища перед виробничим біосинтезом становитиме 484,58 літра.

У ферментер об'ємом 1 м^3 з композицією А подають композицію Б за допомогою перистальтичного насоса, доводять рН середовища до 3,4 додаванням кислоти. Після цього через трубу перетискування подають посівний матеріал.

У сорочку ферментера подається пара, вмикається перемішувач і аерація. Починаючи з 48 години рН культуральної рідини різко починає знижуватися, у такому випадку додають 25%-й розчин аміаку для досягнення оптимального значення рН 3,4.

Упродовж культивування концентрація глюкози знижується, тому на 48, 72, 96 і 120 год культивування з реактора перистальтичним насосом подається

підживлюючий 40 %-й розчин глюкози. Біосинтез здійснюють за температури 35°C упродовж 168 год.

За процесу піноутворення зі збірника автоматично подається піногасник.

В результаті аналізу технологічного процесу зроблені висновки, що автоматизація цього технологічного процесу повинна забезпечувати:

1. Контроль і регулювання температури у ферментері шляхом зміни подачі пари від ТЕЦ.

2. Контроль і регулювання рівня у ферментері з сигналізацією досягнення верхнього припустимого рівня у 70% і управління клапаном подачі рідини у ферментер.

3. Контроль і регулювання рН в ферментері шляхом зміни витрати лугу від станції підготовки.

4. Контроль тиску в ферментері по місцю.

5. Контроль і управління подачі піногасника із іншого збірника у ферментер з сигналізацією досягнення датчика 80%.

6. Контроль і регулювання концентрації розчиненого кисню в ферментері шляхом впливу на витрату стиснутого аераційного повітря в ферментер.

7. Управління насосом перекачки рідини («включено», «відключено») із збірника у ферментер.

8. Управління насосом перекачки рідини («включено», «відключено») із іншого збірника у ферментер.

Відповідно до переліку розглянутих задач системи керування заповнюємо таблицю 1. При цьому будемо притримуватись рішення, що у роботі буде розглянута система автоматизації у якій центральним управляючим пристроєм є мікропроцесорний контролер, а спостереження за ходом виконання технологічним процесом і у разі необхідності втручання в управління ним буде відбуватись за допомогою автоматизованого робочого місця (АРМ) оператора технолога з використанням спеціально розробленого людино-машинного інтерфейсу [80].

Таблиця 9.1

Завдання на розробку системи автоматизації

№ з.п	Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Припустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
1	Ферментер	Температура середовища	37 °C ± 2 °C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату холодної води
		Рівень рідини	484,58 л ± 2 л (70%± 3%)	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
		Рівень рН середовища	3,4 ± 0,4	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
		Тиск	0,2 МПа	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
		Рівень піни	80% від заповнення апарата	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
				Управління	Ручне	Подається з збірника
		Концентрація розчиненого кисню	484,58 л (2 л на 1 л КР)	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Слідкуюче	Вплив на витрату стиснутого аераційного повітря
2	Насос 1	Стан насосу подачі рідини в ферментер	Ввімкнено/вимкнено	Управління	Ручне, дистанційне	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю
3	Насос 2	Стан насосу подачі рідини в ферментер	Ввімкнено/вимкнено	Управління	Ручне, дистанційне	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю

9.2 Опис схеми автоматизації з специфікацією засобів автоматизації

У першому контурі автоматичного контролю і управління в ферментері потрібно контролювати температуру середовища, яке має значення 37°C з допустимими межами $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Спостереження за зміною відбувається на АРМі оператора зі реєстрацією цих змін в архіві.

Для регулювання температури передбачається її стабілізація шляхом витрати холодної води в сорочку ферментера, за допомогою пневматичного виконавчого механізму. Датчик розташовуємо «по місцю».

У другому контурі автоматичного контролю і управління контролюємо рівень рідини в ферментері 484,58 л (70% і має припустимі межі $\pm 3\%$). Спостерігаємо за зміною на АРМі оператора зі реєстрацією змін в його архіві. Регулювання рівня рідини не передбачається. Датчик розташований «по місцю».

У третьому контурі автоматичного контролю і управління необхідно контролюємо рН середовища в ферментері ($3,4 \pm 0,4$). Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора зі реєстрацією змін в його архіві. Датчик розташований «по місцю».

У четвертому контурі автоматичного контролю і управління контролюємо тиск в ферментері, який має значення 0,2 МПа. Спостереження за зміною передбачається на АРМі зі реєстрацією змін в його архіві. Датчик розташований «по місцю».

У п'ятому контурі автоматичного контролю і управління контролюємо і управляємо рівнем піни в ферментері з сигналізацією досягнення верхнього припустимого рівня і ручним управлінням подачі піногасника у ферментер. Сигналізація про досягнення верхнього рівня відбувається на АРМі оператора-технолога. Датчик розташований «по місцю».

У шостому контурі автоматичного контролю і управління контролюємо і регулюємо концентрацію розчиненого кисню в середовищі (484,58 л (2 л на 1 л КР). Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі реєстрацією змін в його архіві. Для регулювання передбачається слідкуюче

регулювання, за рахунок впливу на витрату стисненого аераційного повітря. Датчик розташований «по місцю».

Сьомий та восьмий контур повністю ідентичні. В них потрібно управляти роботою двигунів насосів подачі рідини в ферментер. Управління здійснюється з АРМа технолога включенням та виключенням насосів, ручним управлінням з щита перетворювачів включенням/відключенням насосів та аварійним відключенням насосів кнопкою, розташованою «по місцю» біля насоса [80].

Специфікація на засоби автоматизції

№ прикладу	№ позиції за схемою	Найменування і технічна характеристика виробу	Тип, модель	Вироб-Ник
1	2	4	5	6
1	1a	Термометр опору, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, градувальна характеристика Pt100, діапазон вимірювань: -80...+600 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 25бар, приєднання G1/2	1-3, ТСП(Pt100)	ПАО „Тера”, Україна
	1б	Електропневматичний перетворювач, вхідний сигнал 4...20мА, вихідний сигнал 20...100кПа	2713-WP	Dwyer
	1в	Мембранний виконавчий механізм прямої дії з пневматичним позиціонером, управляючий сигнал 20...100кПа, умовний хід вихідного елемента 25мм	МИМ200-113	ГідроЕнерго-Снаб
2	2a	Ємнісний датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 265-4000мм, максимальна допустима температура +125 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 10бар, під'єднання G5/4, аналоговий вихід, точність 2мм	NMC	Kobold
3	3a	pH електроди, матеріал скло, пластик, діапазон вимірювань pH 1...12, максимальна температура до 80 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 6бар	APS	Kobold

4	4a	Рідинний датчик тиску на основі U-подібної трубки, матеріал виготовлення – скло, діапазон вимірювань 0...150мбар, під'єднання – 7мм, клас точності 0,05	PUM	Kobold
5	5a	Гідростатичний рівнемір, пьезорезисторний перетворювач тиску, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, діапазон вимірювання -1...0бар, під'єднання G1/2, клас точності 0,25, аналоговий вихід	SEN-3276	Kobold
6	6a	Датчик розчиненого кисню	OXYSENS	Engineering system
	6б	Електропневматичний перетворювач, вхідний сигнал 4...20мА, вихідний сигнал 20...100кПа	2713-WP	Dwyer
	6в	Мембранний виконавчий механізм прямої дії з пневматичним позиціонером, управляючий сигнал 20...100кПа, умовний хід вихідного елементу 25мм	МИМ20-0-113	ГідроЕнерго-Снаб
7,8	KM1	Магнітний пускач, робочий струм 400А, потужність двигуна 200кВт, управляючий сигнал 220В	3RT1075-6AP36	SIEMENS
	KM2	Магнітний пускач, робочий струм 7А, потужність двигуна 3кВт, управляючий сигнал 220В	3RT2015-1AP01	SIEMENS
	SA1, SA2	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний-ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією	3SB3210-2DA11	SIEMENS
	SB1, SB2	Двоклавішна кнопка станція «Пуск»-«Стоп» 1НО+1НЗ	8LP2TB7113	Lovato

РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердин, рідких та газоподітних відходів

Виробництво ітаконової кислоти грибом *Aspergillus terreus* включає доферментаційні допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування титрувальних агентів, санітарна підготовка виробництва, приготування і стерилізація підживлюючого розчину глюкози, піногасника, та приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу біомаси), ферментаційні технологічні процеси (одержання посівного матеріалу, виробничий біосинтез) та післяферментаційні технологічні процеси (відділення біомаси, упарювання, кристалізація, відділення кристалів, сушіння, подрібнення) та стадії пакування, маркування та відвантаження.

Місця емісії рідких відходів:

- **Санітарна підготовка виробництва.** Після миття та дезінфекції, відпрацьовані розчини надходять до каналізації разом з промивною водою.
- **Відділення кристалів.** Центрифугуванням відбувається відділення маточного розчину від кристалів ітаконвої кислоти.

Місця емісії твердих відходів:

- **Приготування та стерилізація титрувальних агентів.** Твердими відходами є упаковка, в якій зберігаються агенти.
- **Приготування підживлюючого розчину.** Глюкоза перед потраплянням на виробництво зберігається у пакувальній тарі, що і є твердими відходами.

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля	Лім.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Шульган Я.В.						
Перевір.		Удимозич В.М.					102	133
Консультант						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

- **Приготування та стерилізація поживних середовищ.** Даний етап характеризується пакувальними матеріалами, в яких зберігаються компоненти поживного середовища.
- **Відділення міцелію.** На рамному фільтр-пресі здійснюється відділення міцелію від супернатанту, який і є твердим відходом.

Місця емісії газоподібних відходів:

- **Підготовка посівного матеріалу.** Під час масштабування посівного матеріалу, у посівні апарати та інокулятори подається повітря, яке після стає відпрацьованим.
- **Виробничий біосинтез.** Під час біосинтезу у ферментер подається аераційне повітря. Тому, при культивуванні виникає відпрацьоване повітря.

10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

10.2.1 Системи знешкодження та утилізації рідких відходів

У біологічних ставках (біоплато) (рис. 10.1) аеробне окиснення (процес мінералізації) органічних сполук відбувається за участю мікроорганізмів, водоростей і вищих водних рослин (очерету, рогозу, рдесту, ряски, водного шпинату, водного гіacinту та ін.). Сприятливими умовами для ефективного перебігу окиснювальних реакцій у штучно створених гідробіоценозах є незначна глибина резервуара, відсутність течії, велика кількість мікрководоростей, які насичують воду киснем, достатня чисельність найпростіших, які живляться бактеріями тощо [81].

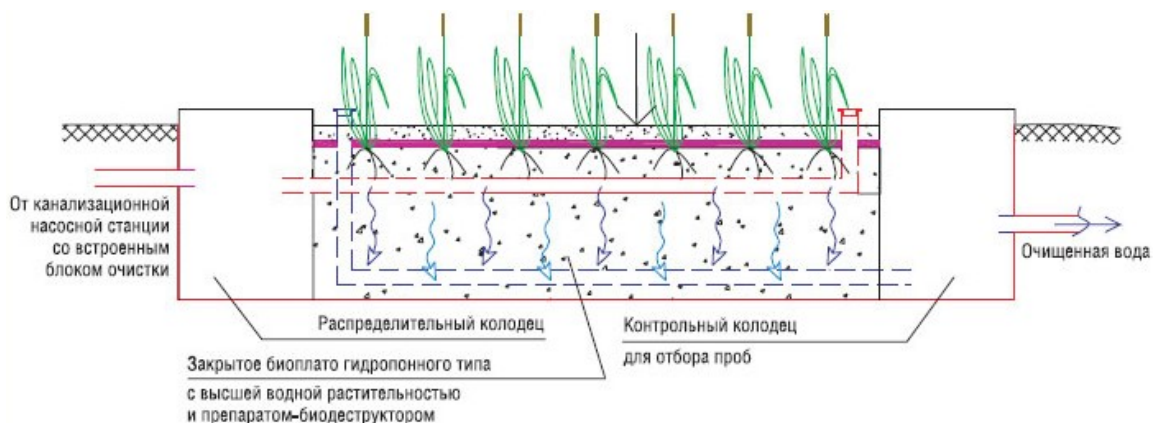


Рис.10.1 Біологічний ставок (біоплато).

Стічні води від каналізаційної насосної станції з вбудованим блоком очистки подаються в розподільчий колодезь, який часто розміщується безпосередньо в біоплато. Від розподільного колодезя через систему перфорованих трубопроводів, які в конструктивному плані можуть прокладатися по паралельній або променевої схемою, вода надходить на біоплато. Фільтрація стічної води відбувається в вертикальному напрямку через пласт завантаження (митий щебінь гравій, керамзит) [82].

Культивування у цих спорудах вищих водних рослин, які поглинають не тільки значну частину біогенних елементів, а й токсичні речовини (важкі 86 метали, нафтопродукти, феноли, нітросполуки, пестициди тощо), інтенсифікує процес очищення стічних вод [81].

10.2.2 Системи знешкодження та утилізації твердих відходів

Полігони – це природоохоронні споруди, призначені для складування ТПВ. Вони забезпечують захист від забруднення атмосфери, ґрунтів, підземних і поверхневих вод, перешкоджають розповсюдженню патогенних мікроорганізмів за межі майданчика складування і забезпечують знезараження ТПВ біологічним способом [83].

Загальний вид полігона представлений на рис. 10.2

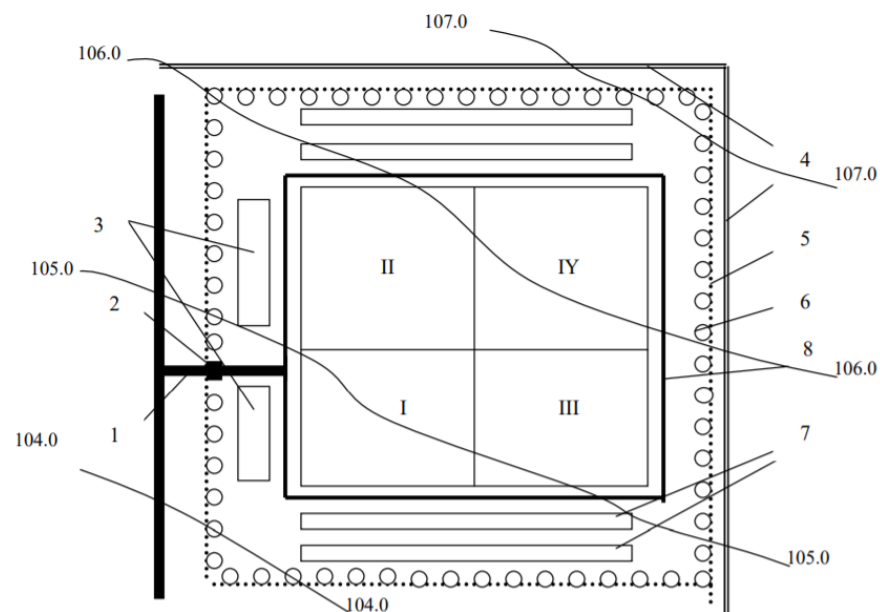


Рис. 10.2. Загальний вид полігона (I– IV) – черги експлуатації полігона. – підїзна дорога; 2– вїзд на полігон з пунктом радіометричного контролю; 3 – адміністративно–господарська зона; 4 – нагірний канал; 5 – огороження

полігона; 6 – лісосмуга; 7 – кавальєри мінерального та родючого ґрунту; 8 – внутрішньогосподарська дорога.

Захист від забруднення ґрунтів і ґрунтових вод здійснюється шляхом установки спеціального протифільтраційного екрану, укладеного по всьому днищу і бортам полігона, системи перехоплення, відведення і очищення фільтрату, а також системи наглядових свердловин для контролю якості ґрунтових вод. Захист від забруднення ґрунтів і повітряного басейну здійснюється шляхом щоденного перекриття заповнених робочих карт полігона шарами ґрунту, організації системи збору, відведення й утилізації біогазу, устаткування робочих карт переносними сітками для перехоплення легких фракції (папір, плівки), рекультивації поверхні заповнених ділянок полігона [83].

10.2.3. Системи знешкодження та утилізації газоподібних відходів

Скрубер Вентурі - газопромивач складається з труб, в які під високим напором надходять газ і рідина. Краплі рідини захоплюють тверді частинки і разом з ними осідають в краплеуловач [84].



Рис. 10.3 Скрубер Вентурі

Брудний газ заходить через повітропровід всередину корпусу скрубера. Далі за допомогою аеродинамічних сил він закручується. Очищення

відбувається за допомогою води. Вода подається через насосну станцію, проходить через трубопровід, форсунки і змочує газ. Частинки води вловлюють пил і падають вниз. Брудна вода зливається в бак-відстійник або переходить в очищаюче обладнання [85].

10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Під час виробництва ітаконової кислоти *Aspergillus terreus* утворюється достатня кількість відходів за 1 цикл виробництва. Рідкі відходи очищуємо за допомогою біоплато. Тверді відходи, які представлені пакувальною тарою, знешкоджуємо на полігонах. Міцелій, який відокремлюється на рамному фільтр-пресі, в подальшому знаходить застосування у сільськогосподарській промисловості. Газоподібні відходи очищуються за допомогою скрубера Вентурі.

Отже, виробництво ітаконату є екологічно безпечним для навколишнього середовища.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Meyer H.P., Minas W., Schmidhalter D. Industrial biotechnology. Weinheim, Germany: Wiley; VCH Verlag GmbH; Co. KGaA. 2017, P. 453-469. [doi: 10.1002/ 9783527807833](#).
2. Конспект лекцій з дисципліни «Технології БАР та харчових продуктів» для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» Укл.: старший викладач Філімоненко О.Ю. – Дніпродзержинськ, ДДТУ, 2016. – С. 48-51.
3. Geiser E., Przybilla S.K., Engel M., et al. Genetic and biochemical insights into the itaconate pathway of *Ustilago maydis* enable enhanced production. *Metab. Eng.* 2016, 38:427–435. doi: 10.1016/j.ymben.2016.10.006
4. Haofei Chemical. Итаконична кислота на міжнародному ринку [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://ua.haofeichemical.com/info/itaconic-acid-international-market-demand-25237940.html>
5. Котелев М.С., Кожевникова Е.А., Бочкова Е.А., Барков А.В. Практические аспекты работы с продуцентами итаконовой кислоты. *Теоретические и прикладные проблемы АПК*. 2015, 3: 35-39.
6. Krull S., Hevekerl A., Kuenz A., Prüße U. Process development of itaconic acid production by a natural wild type strain of *Aspergillus terreus* to reach industrially relevant final titers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 101(10): 4063–4072. doi:10.1007/s00253-017-8192-x
7. Wu X., Liu Q., Deng Y., et al. Production of itaconic acid by biotransformation of wheat bran hydrolysate with *Aspergillus terreus* CICC40205 mutant. *Bioresour. Technol.* 2017, 241: 25–34. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.080
8. Thom C, Church MB. (1918). "*Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *A. terreus* n. sp. and their allies". *American Journal of Botany*. 5 (2): 84–104.

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Список використаної літератури	Лім.	Арк.	Акрушів	
Розроб.	Шульган Я.В.								
Перевір.	Удимович В.М.						107	133	
Консультант						Кафедра БТМ			
Н.Контр.									
Затверд.	Пирог Т.П.								

9. "ASPERGILLUS TERREUS" IMI Descriptions of Fungi and Bacteria No. 1253. Retrieved 14 October 2013.
10. Szakacs, G; Morovjan G.; Tengerdy R (1998). "Production of lovastatin, itaconic acid by a wild strain of *Aspergillus terreus*". Biotechnology Letters. 20 (4): 411–415.
11. Способ выделения каучуков эмульсионной полимеризации [Электронный ресурс] // Режим доступа <https://patents.google.com/patent/RU2619703C1/ru>
12. Выделения каучуков [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.freepatent.ru/patents/2065450>
13. Свойства и применение итаконовой кислоты [Электронный ресурс] // Режим доступа http://chemanalytica.com/book/novyj_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/06_syre_i_produkty_promyshlennosti_organicheskikh_i_neorganicheskikh_veshchestv_chast_II/5392
14. High Precision Colour Difference Meter , Digital Photoelectric Colorimeter [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.digitalcolormeter.com/sale-10522311-high-precision-colour-difference-meter-digital-photoelectric-colorimeter.html>
15. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?afv00010 KEGG Гликолиз / Глюконеогенез - *Aspergillus flavus*
16. Егоров Н. С. Промышленная микробиология. – М.: Выс. шк., 1989. 689 с.
17. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія. – К.: НУХТ. 2004, 471 с.
18. Миронов М. А. Методы расчета оборудования биотехнологических производств: [учеб.-метод. пособие]/М. А. Миронов, М. И. Токарева ; [науч. ред. М. Н. Иванцова]; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2017. — 47 с.
19. Propionix. Микробное брожение. Культивирование микроорганизмов. Технологии ферментации. Микробная ферментация

[Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://propionix.ru/mikrobnaya-fermentatsiya>

20. Пилотные и промышленные биореакторы (Biorus) [Электронный ресурс] // Режим доступа: [https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-\(laboratornyie-i-promyshlennyye\)/promyshlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-\(-kitaj\)/erliftnyie-fermenteryi.html](https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-(laboratornyie-i-promyshlennyye)/promyshlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-(-kitaj)/erliftnyie-fermenteryi.html)

21. Стерилизация воздуха [Электронный ресурс] // Режим доступа - https://studref.com/324401/meditsina/ochistka_sterilizatsiya_vozduha

22. Batti, M. and Schweiger, L.B. (1963) Process for the production of itaconic acid. US Patent 3,078,217. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office

23. Nguyen-Thai NU, Hong SC. Controlled architectures of poly(acrylonitrile-co-itaconic acid) for efficient structural transformation into carbon materials. Carbon N Y. 2014;69:571–581. doi: 10.1016/j.carbon.2013.12.068

24. <https://farmakos.ua/bimoi.html> БИМОЙ® - предстерилизационное средство.

25. https://www.covalent.com.ua/ru/shop/soda_ash/ Сода кальцинированная (натрий углекислый, натрия карбонат)

26. <http://sibraduga.com/node/140> INCIMAXX® DES-N (ИНЦИМАКС ДЕЗ-Н)

27. <https://bionika.pro/catalog/pererabotka-i-vyrawivanie-pticy/dezinfekciya/gazaciya/incimaks-t-incimaxx-t-dezinficiruyuwie-sredstvo-dlya-dezinfekcii-ob-ektov-veterinarnogo-nadzora/> Инсимакс Т (INCIMAXX Т) Дезинфицирующее средство на основе глутаральдегида и ЧАС

28. <https://coagulant.com.ua/ru/mojka-i-dezinfekciya/> Реагенты для мойки и дезинфекции ITS WATER CDS

29. <https://premclass.ru/catalog/dive/diversey-desinfection/diversey-divosan-extra-vt55.html> Diversey Divosan Extra VT55

30. Конспект лекцій з дисципліни „Технології БАР та харчових продуктів” для студентів напряму 6.051401 „Біотехнологія”// Укл.: старший викладач Філімоненко О.Ю. – Дніпродзержинськ, ДДТУ, 2016. –101 с
31. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник.-К.: НУХТ, 2009.-336 с.
32. http://chemanalytica.com/book/novyj_spravochnik_khimika_i_tekhnologiya/06_syre_i_produkty_promyshlennosti_organicheskikh_i_neorganicheskikh_veshchestv_chast_II/5392 Свойства и применение итаконовой кислоты.
33. Omar A. Abdelrahman, Dae Sung Park. Renewable Isoprene by Sequential Hydrogenation of Itaconic Acid and Dehydro-Decyclization of 3-Methyl-Tetrahydrofuran. *ACS Catal.* 2017, 7, 2, 1428–1431. DOI: [10.1021/acscatal.6b03335](https://doi.org/10.1021/acscatal.6b03335).
34. Процеси і апарати. Гідромеханічні процеси: Підручник / В.С. Бойко, К.О. Самойчук, В.Г. Тарасенко, Н.П. Загорко, В.Г. Циб. – Мелітополь, 2019. – 212с
35. Черепанський В.В., Грегірчак Н.М. Особливості технологічного процесу виробництва пробіотичного препарату на основі лактобацил. *Biotechn. Scientific Works of NUFT* 2020, 26 (3): 45-59.
36. Гунько Ю.Л., Шведик М.С., Ткачук П.І. Результати дослідження роботи фільтрувальної станції цукрового виробництва. *Сільськогосп. маш.* 2019, 38: 40-47 с.
37. О.С. Марценюк, Л.М. Мельник, Процеси і апарати харчових виробництв. Підручник. Київ. НУХТ, 2011.
38. Клименко О.Д., Селезньов Д.Е. Автоматизований розрахунок рамного фільтрпресу. *Наукові нотатки*. 2019, 34: 118-122 с.
39. Бабак Т.Г., Голубкіна О.О. Пономаренко Є.Д. Інтеграція потоків випарної установки концентрування сиропу сорго з використанням ПНЧ-аналізу. *Хімія, хімічна технологія та екологія*. 2018, № 35(1311): 17-20.
40. Конспект лекцій з курсу "Основні процеси та апарати хімічної технології". Розділ “КРИСТАЛІЗАЦІЯ” для студентів усіх спеціальностей /

Укл.: Т.Ю. Гіріч, Т.П. Єльцова, П.В. Рябік. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2010. – 26 с.

41. <http://www.ukrteh.kiev.ua/page/text/category=cen> Укртехприбор ТД. Центрифуги.

42. Стасевич М.Б., Милянч А.О. Технологічне обладнання фармацевтичної та біотехнологічної промисловості // М.: Львів Новий Світ, 2000 – 410 с.

43. Саленко Ю.С. Обладнання для подрібнення матеріалів: дробарки та млини: Навч. посібник. – Кременчук: КДПУ, 2008. – 100 с.

44. <https://www.ukrpak.com/novosti/polietilenovi-mishki> Пакування сипких матеріалів. Поліетиленові мішки.

45. <https://deltafan.com.ua/product-category/osovi-ventilyatory/aksesuary-uk/zabir-povitrya/>. Забір повітря.

46. <https://alterair.ua/uk/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry-gruboy-ochistki-g1-g4/>. Панельні повітряні фільтри для грубого очищення.

47. http://gk-sk.ru/kompresory/katalog/ATMOS-model-Albert_E_40/. Компресор ATMOS модель: Albert E 40.

48. http://paskal.ua/ua/product/teploobmenik-whe-2050_172.html. Теплообмінник WHE 2050.

49. <http://www.kongyr.com.ua/resiver-vozdushniy-gorizontalny-rg-50-294/>. Ресивер повітряний горизонтальний РГ 50.294.

50. https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php . Система підігріву повітря.

51. [https://alterair.ua/uk/product/panelnyye-vozdushnyye-filtry-dlya-tonkoy-ochistki-vozdukha-\(f7-f9\)/](https://alterair.ua/uk/product/panelnyye-vozdushnyye-filtry-dlya-tonkoy-ochistki-vozdukha-(f7-f9)/). Панельні повітряні фільтри для тонкого очищення повітря.

52. <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/hepa-filtri-dlya-sistem-ventilyatsiyi.html> HEPA фільтри для вентиляції від NEW FILTER

53. <https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/pilotnyie-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus%C2%AE/pilotnyie-bioreaktoryi.html> Ферментер

54. https://www.etatron.com.ua/pumps/peristaltic_pumps/f/
Перистальтичні шлангові насоси F / F-T
55. https://artmash.ua/category/dozatory?utm_source=google&utm_medium
Вагові дозатори від виробника. Фасовка 1 - 50 кг
56. <https://mash-him.ru/reaktory-i-avtoklavy-vysokogo-davleniya> Центр
Химического Машиностроения
57. https://gazovik-pgo.ru/cat/capacities/apparaty_s_peremeshivajuschimi_ustrojstvami/apparaty_s_ellipticheskimi_dnischem_i_semnoy_ellipticheskoy_kryshkoy.html Аппараты с
эллиптическими днищем и съёмной эллиптической крышкой
58. <https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus%C2%AE/promyishlennyye-bioreaktoryi.html> Ферментер
59. https://www.vicaqua.com.ua/chemical_pumps/peristaltic_pumps/mp-3/
Насос Перистальтичний МР-3
60. <https://vesmaster.com.ua/images/dozators/doz5.html> Дозатор весовой
автоматический для дозирования воды.
61. https://tirit.org/reactor_him/lab_steel_pope.php Реакторы среднего
давления Pope Scientific (США)
62. https://www.vicaqua.com.ua/chemical_pumps/peristaltic_pumps/mp-6/
Перистальтичний насос МР-6
63. <https://bio-rus.ru/primeryi-specifikaczij/promyishlennyyj-fermenter-biorus-1000-l-dlya-veterinarij.html> Промышленный ферментер BIORUS 1000 L
для ветеринарии
64. <https://tehzona.com.ua/p670368138-nasos-tsentrobeznyj-sprut.html>
Tehzona. Насос центробежный SPRUT JSP 100A
65. <https://cherkassy.flagma.ua/uk/reaktor-dlya-inekcionnyh-rastvorov-obemom-01873314.html> FLAGMA. Реактор для растворов объемом 700 л.
66. <http://hydrotrend.ru/filter-press/frame-filter-press/frame-filter-press-r1-serii-250/> Гидротренд. Рамные фильтр-прессы.

67. <https://ub.ua/market/view/679976/all/vakuum-vyparnoy-apparat-mzs-320/> Вакуум-випарний апарат МЗС-320.
68. <https://ebner-co.de/ru/portfolio/%D0%B2%D0%B0%D0%BA%D1%83%D1%83%D> Ebner.
Вакуумная кристаллизация с охлаждением.
69. <http://snpo.ua/ru/produkts/tsentrifugi/tsentrifugi-podvesnye/> Сумское НПО. Центрифуги подвесные.
70. <http://ecoway.com.ua/uploads/Catalog%202017.pdf> Каталог. Пересувні піддони.
71. <https://www.prostanki.com/board/item/201754> Простанки. Вальцева сушарка.
72. <https://chumaki.in.ua/ua/p606012619-izmelchitel-yf8-melnitsa.html>
Подрібнювач YF8-1 Млин молоткова дробарка
73. https://omela.ua/ua/avtomaty-i-linii/vesovoie-avtomat-dlya-upakovki-pilyashix-i-trudnosipuchix-produktov-v-gotovie-otkritie-meshki-032_50_01 Омела.
Ваговий автомат для пакування сипучих продуктів в готові відкриті мішки.
74. Фотометрические методы определения аммиака [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://c-carbon.info/?p=745>
75. Современные методы определения глюкозы [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://unimedao.ru/articles/6826/9672/item/146>
76. Khalil A.M.A, Hashem A.H. Morphological changes of conidiogenesis in two *Aspergillus* species. *J. Pure Appl. Microbiol.* 2018
77. Харчова хімія: лабораторний практикум для студентів напрямів підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія», 6.051301 «Хімічна технологія» денної та заочної форм навчання /уклад: О.І. Майборода, С.І. Шульга, Н.В. Сімурова та ін.- К.: НУХТ, 2015. - 80 с.
78. <https://floragrowing.com/uk/encyclopedia/vodnevyi-pokaznyk-ph-faktor>
Методи визначення значення рН.
79. <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4294834/4294834794.pdf> Определение размера частиц сухим просеиванием. ГОСТ 18318-94.

80. Ельперін І.В. Автоматизація та управління біотехнологічним виробництвом: Метод. рекомендації до виконання індивідуального завдання з дисципліни для студентів освітнього ступеня бакалавр за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» всіх форм навчання. /Уклад: І.Ельперін – К.: НУХТ, 2017. – 44 с.

81. Біотехнології в екології : навч. посібник / А.І. Горова, С.М. Лисицька, Б 63 А.В. Павличенко, Т.В. Скворцова. – Д. : Національний гірничий університет, 2012. – 184 с.

82. Стольберг В.Ф., Ладыженский В.Н., Спирин А.И. Биоплато — эффективная малозатратная экотехнология очистки сточных вод // *Екологія довкілля та безпека життєдіяльності*. — 2003. — № 3. — С. 32-34.

83. Душкін С. С. Конспект лекцій з дисципліни «Технологія утилізації твердих побутових відходів» (для студентів 2, 5 курсів денної і заочної форм навчання за напрямом підготовки 6.060103 «Гідротехніка (Водні ресурси)» та слухачів другої вищої освіти спеціальності 7.092601 (7.06010808) «Водопостачання та водовідведення») / С. С. Душкін, М. В. Дегтяр; Харк. нац. акад. міськ. госп-ва. – Х.: ХНАМГ, 2011. – 86 с.

84. Процеси та апарати біологічної очистки та дезодорації газоповітряних викидів. Монографія / Л. В. Кричковська, О. В. Шестопалов, Г. Ю. Бахарєва, К. В. Слісь. – Харків: НТУ «ХПІ», 2013. – 200 с.

85. <https://fakel-f.ru/blog/09-10-19> Скрубберы: принцип работы, устройство и характеристики



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

Production of itaconic acid by biotransformation of wheat bran hydrolysate with *Aspergillus terreus* CICC40205 mutant



Xuefeng Wu^{a,d}, Qing Liu^a, Yongdong Deng^a, Jinghong Li^b, Xiaojun Chen^c, Yongzhong Gu^a, Xijun Lv^a, Zhi Zheng^{a,d}, Shaotong Jiang^{a,d}, Xingjiang Li^{a,d,*}

^a School of Food Science and Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui Province 230009, PR China

^b China Rural Technology Development Center, Beijing 100045, PR China

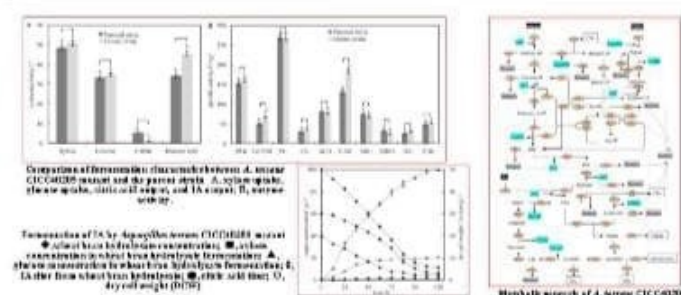
^c College of Chemistry and Material Engineering, Chuohu University, Hefei, Anhui Province 238000, PR China

^d Key Laboratory for Agricultural Products Processing of Anhui Province, Hefei, Anhui Province 230009, PR China

HIGHLIGHTS

- An *Aspergillus terreus* CICC40205 mutant using wheat bran hydrolysate was got.
- Itaconic acid yield was increased and citric acid yield was decrease.
- Metabolic flux analysis of pathway from glucose and xylose using was studied.
- The maximum itaconic acid yield was 49.65 g L⁻¹ in a 7 L stirred tank.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 March 2017

Received in revised form 12 May 2017

Accepted 13 May 2017

Available online 17 May 2017

Keywords:

Wheat bran

Aspergillus terreus CICC40205

Itaconic acid

Metagenic breeding

Metabolic flux analysis

ABSTRACT

The replacement of the carbon source in the microbial production of itaconic acid (IA) with economic alternatives has attracted significant attention. In this study, an *Aspergillus terreus* CICC40205 mutant was used to increase the IA titer and decrease the citric acid titer in the wheat bran hydrolysate compared with the parental strain. The results showed that the IA titer was increased by 33.4%, whereas the citric acid titer was decreased by 75.8%, and were in accordance with those of the improved pathway of co-metabolism of glucose and xylose according to the metabolic flux analysis. Additionally, the maximum IA titer obtained in a 7-L stirred tank was 49.65 g L⁻¹ ± 0.38 g L⁻¹. Overall, *A. terreus* CICC40205 showed a great potential for the industrial production of IA through the biotransformation of the wheat bran hydrolysate.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Itaconic acid (2-methylidenebutanedioic acid; IA) is a promising organic acid, such as citric acid, glucose acid, lactic acid, and malic

acid, and it is widely used in the chemical industry, medicine, and agriculture, and especially in the industrial production of resins, acrylic plastics, acrylate, latex, super absorbents, and anti-scaling agents (Chandragiri and Sastry, 2011; Cordes et al., 2015; Kuenz et al., 2012; Okabe et al., 2009). IA is mainly produced by chemical synthesis using petrochemical raw materials; however, the development of biological conversion methods using eco-friendly materials is considered essential due to the depletion of gas supply.

* Corresponding author at: School of Food Science and Engineering, Hefei University of Technology, No. 193 Tunxi Road, Hefei City 230009, Anhui Province, PR China.

E-mail address: hfut-lixingjiang@hotmail.com (X. Li).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.080>

0960-8524/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Currently, IA is commercially produced by *A. terreus*, although it was firstly produced by *Aspergillus itaconicus* (Chen et al., 2016; Huang et al., 2016, 2014a; Okabe et al., 2009; Strelko et al., 2011).

A. terreus is a filamentous fungus able to produce IA. Bentley and Thiessen (1957a,b) have reported that the biosynthesis of IA starts from a sugar substrate (i.e., glucose); then, carbon molecules are converted via glycolysis to pyruvate; and finally, a part of the carbon is metabolized to acetyl-coA with the release of a carbon dioxide molecule, whereas the other part is converted to oxaloacetate with the incorporation of the previously released carbon dioxide molecule. In the citric acid cycle, citrate and *cis*-aconitate are formed first, and then, *cis*-aconitate decarboxylase forms IA, releasing carbon dioxide (Bentley and Thiessen, 1957a,b; Blazeck et al., 2015; Chen et al., 2016; Karaffa et al., 2015; Li et al., 2012; Okabe et al., 2009).

The potential feedstock for IA fermentation includes molasses, starch, and the hydrolysate of various cellulosic materials such as the wheat bran (Huang et al., 2016; Mondala, 2015). Compared with molasses and starch, wheat bran has not been utilized efficiently, although its production is approximately 20 million tons per year. Thus, a green platform needs to be developed for the conversion of wheat bran to IA that will be utilized in the food and chemical industries (Blumhoff et al., 2013; Duarte et al., 2011; Ji et al., 2010).

Compared with chemical synthesis using petrochemical raw materials as substrates, one-step fermentation is the direct transformation of sustainable feedstock (sugar or hydrolysate of cellulosic materials) for preparation of IA (Mondala, 2015). Although direct one-step fermentation does not have many industrial applications, it has great potential in the bio-refinery of IA, which is a research hotspot and is included among the top twelve sugar-derived platform chemicals (Werpy et al., 2004).

A. terreus is a typical organic acid-producing strain with a well-established glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter system (Huang et al., 2014a) and an efficient gene-targeting system (Huang et al., 2016) for genetic modification. Its potential for IA production from starch sugar has been reported to be 80 g L⁻¹ (Huang et al., 2014b).

In this study, we aimed to use an *A. terreus* CICC40205 mutant to increase the IA titer and decrease the citric acid titer by the bio-transformation of the wheat bran hydrolysate. We also aimed to investigate the pathway of co-metabolism of glucose and xylose using the metabolic flux analysis and identify the maximum IA titer production in a 7-L stirred tank.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism

A. terreus CICC40205 was obtained from the China Center of Industrial Culture Collection and preserved at the laboratory of the School of Food Science and Engineering, Hefei University of Technology.

2.2. Fermentation

The fungus was first cultured on potato-dextrose agar (PDA) medium, containing 200 g L⁻¹ boiled potato, 20 g L⁻¹ glucose, and 20 g L⁻¹ agar (pH 7), at 32 °C for 3–5 d, and subsequently stored at 4 °C. Spores were collected with a platinum loop and suspended in sterilized water. Spore suspensions of 5 ml with a concentration of 5 × 10⁶ spores ml⁻¹ were inoculated into 250-ml shake flasks filled with 50 ml seed medium, containing 50 g L⁻¹ glucose, 2 g L⁻¹ corn steep liquor, 3 g L⁻¹ NH₄NO₃, 0.2 g L⁻¹ KH₂PO₄, 3 g L⁻¹ MgSO₄, 0.16 g L⁻¹ FeSO₄, and 0.15 g L⁻¹ ZnSO₄ (pH 2.5),

sterilized at 121 °C for 15 min. Spore suspensions were cultured at 32 °C for 24 h with a rotation speed of 180 rpm⁻¹.

Seeds of 5 ml were inoculated into 250-ml shake flasks filled with 50 ml fermentation medium, containing 100 g L⁻¹ wheat bran hydrolysate sugar (approximately 60 g L⁻¹ xylose and 40 g L⁻¹ glucose), 2 g L⁻¹ corn steep liquor, 3 g L⁻¹ NH₄NO₃, 0.2 g L⁻¹ KH₂PO₄, 3 g L⁻¹ MgSO₄, 0.16 g L⁻¹ FeSO₄, and 0.15 g L⁻¹ ZnSO₄ (pH 2.5), sterilized at 121 °C for 15 min, and cultured at 32 °C for 3–5 d.

2.3. Preparation of wheat bran hydrolysate

A total of 14 g of wheat bran (Anhui Fengda Ltd., China), a by-product of wheat flour from Wheat Wan 50 (32.5% soluble substance, 44.2% hemicelluloses, 10% cellulose, and 13.3% lignin), meshed, and filtered through a 60 mesh screen, was hydrolyzed in 100 ml sulfuric acid (3%) at 108 °C for 80 min. The pH of the hydrolyzed liquid was adjusted to 7.0 using calcium hydroxide and centrifuged at 8000g for 10 min. The supernatant liquid was detoxified using 6% (wv⁻¹) of activated carbon (7,440-44-0; Sino-pharm Chemical Reagent Co., Shanghai, China) at 60 °C for 90 min, and then, the detoxified liquid was centrifuged at 8000g for 10 min. The clear supernatant was concentrated at 60 °C using a rotary evaporator (Heidolph Instruments, Germany) until the sugar concentration was approximately 100 g L⁻¹.

2.4. Determination of xylose and glucose

High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the concentration of xylose and glucose in the wheat bran hydrolysate. A total of 10 ml of the wheat bran hydrolysate was centrifuged at 8000g for 10 min, and 1 ml of the supernatant was diluted with distilled water and filtered through a 0.22-μm membrane. The concentration of xylose and glucose was analyzed by HPLC (Waters, USA) equipped with Purospher STAR C18 (Merck, USA), a 250 × 4.6-μm column, and a UV detector (Waters) at 210 nm. The eluent was 5 mM H₂SO₄ with a flow rate of 0.6 ml min⁻¹, whereas the column temperature was 50 °C (Li et al., 2014).

2.5. Determination of IA and citrate acid

A total of 10 ml of fermentation broth was centrifuged at 8000g for 10 min, and 1 ml of the supernatant was diluted with distilled water and filtered through a 0.22-μm membrane. The concentration of IA and citrate acid was analyzed using a 3.9 mm × 300 mm carbohydrate analysis column (Waters) by an evaporate light scattering detector (Waters). The eluent was 5 mM H₂SO₄ with a volume of 20 μl and a flow rate of 0.6 ml min⁻¹. The column temperature was 30 °C for 25 min (Blazeck et al., 2015; Hevekerl et al., 2014a; Kuenz et al., 2012; Li et al., 2014). Furfural and hydroxymethyl furfural were determined as described by Liu et al. (2010).

2.6. Enzyme activity assays

Enzyme activities were determined by photometry as described by Li et al. (2014) and calculated according to the linear portion of the reaction formula. The reactions were initiated by adding the substrate (Li et al., 2014).

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity was determined as described by Li et al. (2014). Briefly, 0.1 ml of 0.2 mM glucose 6-phosphate, 0.1 ml of 0.2 mM 6-phosphogluconate, and 0.1 ml of 0.1 mM NADP⁺ were added in a cuvette that contained 0.1 ml of 50 mM Tris and 0.1 ml of 1 mM MgCl₂ (pH 8.1), and the increase in absorbance at 340 nm was observed using a spectrophotometer (Persee, China).

Table 4

Original flux data of *Aspergillus terreus* CICC40205 and *A. terreus* CICC40205 mutant.

Flux data	Parental strain	Mutant strain	Flux data	Parental strain
F ₁	0.5577	0.7667	F ₂₈	0.0056
F ₂	0.7707	0.8130	F ₂₉	0.4010
F ₃	0.6264	0.8354	F ₃₀	0.4010
F ₄	0.1630	0.3508	F ₃₁	0.4010
F ₅	0.0029	0.0029	F ₃₂	0.0121
F ₆	0.9678	1.1979	F ₃₃	2.2908
F ₇	0.4010	0.4222	F ₃₄	0.0632
F ₈	1.9354	2.3959	F ₃₅	0.7311
F ₉	0.0336	0.3358	F ₃₆	0.7311
F ₁₀	2.3029	2.7845	F ₃₇	1.4965
F ₁₁	0.3853	0.4065	F ₃₈	1.4965
F ₁₂	0.3853	0.4065	F ₃₉	0.0687
F ₁₃	0.3072	0.3072	F ₄₀	1.4278
F ₁₄	0.4066	0.4278	F ₄₁	1.4278
F ₁₅	0.0157	0.0157	F ₄₂	1.3644
F ₁₆	-0.0369	-0.0369	F ₄₃	0.7379
F ₁₇	0.0094	0.0094	F ₄₄	0.7379
F ₁₈	0.7707	0.8130	F ₄₅	0.7311
F ₁₉	0.7707	0.8130	F ₄₆	0.7311
F ₂₀	0.4066	0.4278	F ₄₇	0.7311
F ₂₁	0.4066	0.4278	F ₄₈	0.7311
F ₂₂	0.4066	0.4278	F ₄₉	0.0343
F ₂₃	0.4066	0.4278	F ₅₀	0.0634
F ₂₄	0.4066	0.4278	F ₅₁	0.7379
F ₂₅	0.4066	0.4278	F ₅₂	0.0069
F ₂₆	0.4066	0.4278	F ₅₃	0.1115
F ₂₇	0.4066	0.4278		

Note: mmol g⁻¹ DW h⁻¹.

In Table 4, the total flux of IA in the *A. terreus* CICC40205 mutant (0.8354 mmol g⁻¹ DW h⁻¹) was higher than that of the parental strain (0.6264 mmol g⁻¹ DW h⁻¹), whereas the fluxes of glucose uptake (0.5577 mmol g⁻¹ DW h⁻¹), xylose uptake (0.7707 mmol g⁻¹ DW h⁻¹), and citrate acid output (0.0149 mmol g⁻¹ DW h⁻¹) were lower (0.7667 mmol g⁻¹ DW h⁻¹, 0.8130 mmol g⁻¹ DW h⁻¹, and 0.0634 mmol g⁻¹ DW h⁻¹, respectively). The flux of glucose-6P conversion into ribulose-5P (0.4065 mmol g⁻¹ DW h⁻¹) was higher in the *A. terreus* CICC40205 mutant-compared with the parental strain (0.3853 mmol g⁻¹ DW h⁻¹), probably because of the increased interaction of EMP and HMP that improved the metabolism of pentose.

3.5. Fermentation of *A. terreus* CICC40205 mutant in a 7-L stirred tank

IA titer increased with spore suspension culture time and reached the maximum value of 48.96 g L⁻¹ at 24 h of culture. After 24 h of culture, IA titer declined (Fig. 5A). IA titer increased with the increasing rotation speed and reached the maximum value of 48.64 g L⁻¹ at 400 r min⁻¹ (Fig. 5B). At low rotation speeds of approximately 200 r min⁻¹, the quantity of dissolved oxygen did not meet the demand of strain growth, whereas at high rotation speeds (>400 r min⁻¹), the cells were destroyed. The rotation speed was also significant for the mycelium morphology. At low rotation speeds, many small mycelia were observed, whereas at 400 r min⁻¹, mycelia formed pellets. Hevekerl et al. (2014a,b) and Kuenz et al. (2012) reported that *A. terreus* grows in the form of small pellets with a diameter of 0.1 mm and frayed edges, and this morphology permits a good mixing and low viscosity in the fermentation broth.

IA titer increased with the increasing aeration rate and reached the maximum value of 48.55 g L⁻¹ at 0.4 L min⁻¹ (Fig. 5C). At low aeration rates of approximately 0.1 L min⁻¹, the quantity of dissolved oxygen did not meet the demand of strain growth, whereas at high aeration rates (>0.4 L min⁻¹), the excessive growth of cell biomass overused carbon source, reducing the IA titer.

The fermentation curve of the *A. terreus* CICC40205 mutant under optimized conditions is shown in Fig. 6. The consumption of the wheat bran hydrolysate decreased rapidly at 36–84 h, and stably at 84–120 h. The maximum IA titer was 49.65 g L⁻¹ ± 0.21 g L⁻¹, and the maximum biomass was 10.21 g L⁻¹.

As shown in Fig. 1, the consumption of glucose was almost synchronous by the *A. terreus* CICC40205 mutant, with a 12-h delay in the consumption of xylose. Additionally, the consumption rate of xylose by the *A. terreus* CICC40205 mutant was lower than the parental strain. The acid titer was lower than 1 g L⁻¹, suggesting that the fermentation conditions were better in the bioreactor than in the shake flask.

Many reports showed that the IA titer was higher when it was produced industrially from a pure culture by *A. terreus* (Saha, 2017); for instance, 86 g L⁻¹ by *A. terreus* DSM-23081 (Hevekerl et al., 2014a; Kuenz et al., 2012), 82 g of IA from 160 g glucose L⁻¹ by the mutant *A. terreus* IFO-6365 (Yahiro et al., 1995). However, the IA titer from glucose was as low as 43 g L⁻¹ by *A. terreus* CICC40205 (see Appendix). Previous studies have also reported the production of IA from xylose; for instance, 8 g L⁻¹ by *A. terreus* CICC40205 (Kautola, 1990) and 30 g L⁻¹ by *A. terreus* CICC40205 (Kautola, 1990). In this study, the IA titer from glucose was approximately 30 g L⁻¹ by *A. terreus* CICC40205 (see Appendix), indicating that the fungus has the potential to produce IA from xylose.

IA production from lignocellulose as raw material has been described for *A. terreus*. It was successful to produce IA from the hemicellulosic fraction of selectively fractionated *Ustilago maydis*, but the applied pretreatment was not yet tailor-made for biotechnological production (Klement and Buchs, 2013; Saha, 2017). A broader range of low cost sustainable production of IA by fermentation needed to be developed (Klement and Buchs, 2013; Saha, 2017). And



Process development of itaconic acid production by a natural wild type strain of *Aspergillus terreus* to reach industrially relevant final titers

Susan Krull¹ · Antje Hevekerl¹ · Anja Kuenz¹ · Ulf Prüfle¹

Received: 4 January 2017 / Revised: 8 February 2017 / Accepted: 13 February 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract Itaconic acid is a promising organic acid and is commercially produced by submerged fermentation of *Aspergillus terreus*. The cultivation process of the sensitive filamentous fungus has been studied intensively since 1932, with respect to fermentation media components, oxygen supply, shearing rate, pH value, or culture method. Whereas increased final titers were achieved over the years, the productivity has so far remained quite low. In this study, the impact of the pH on the itaconic acid production was investigated in detail. The pH during the growth and production phase had a significant influence on the final itaconic acid concentration and pellet diameter. The highest itaconic acid concentration of 160 g/L was achieved at a 1.5-L scale within 6.7 days by raising and controlling the pH value to pH 3.4 in the production phase. An ammonia solution and an increased phosphate concentration were used with an itaconic acid yield of 0.46 (w/w) and an overall productivity of 0.99 g/L/h in a fed-batch mode. A cultivation with a lower phosphate concentration resulted in an equal final concentration with an increased yield of 0.58 (w/w) after 11.8 days and an overall productivity of 0.57 g/L/h. This optimized process was successfully transferred from a 1.5-L scale to a 15-L scale. After 9.7 days, comparable pellet morphology and a final concentration of 150 g/L itaconic acid was reached. This paper provides a process strategy to yield a final titer of itaconic acid from a wild-type strain of *A. terreus* which is in the same range as the well-known citric acid production.

Keywords *Aspergillus terreus* · Itaconic acid · pH control · Process optimization · Scale-up

Introduction

Itaconic acid is an unsaturated dicarboxylic acid which can be biotechnologically produced from renewable resources. The pK_a values of itaconic acid are 3.84 and 5.55 at 25 °C in water, and the concentration of each dissociated form in an aqueous solution depends on the pH value (Rychtera and Wase 1981). Due to its chemical structure, itaconic acid is used in a wide range of applications and replaces petrochemical-based monomers like acrylic or methacrylic acid for polyesters (Robert and Friebe 2016). The manifold use of itaconic acid in the chemical industry is considered by Willke and Vorlop (2001) or Okabe et al. (2009). Itaconic acid was discovered by Baup (1837) as a product of pyrolytic distillation of citric acid. In 1932, the fermentative process with an *Aspergillus* species was described by Kinoshita (1932). In the following years, the biotechnological itaconic acid production of *Aspergillus terreus* was further investigated. Chemical routes, like the thermolysis of citric acid, or the oxidation of isoprene to citraconic acid followed by an isomerization, for itaconic acid production could not compete economically with biotechnological production (Tate 1981). According to literature, a phosphate limitation triggers the overproduction of itaconic acid with *A. terreus* (Rychtera and Wase 1981; Riscaldati et al. 2000; Willke and Vorlop 2001); this theory was disproved by Hevekerl et al. (2014a). Neither a phosphate nor a nitrate limitation initiated the production of itaconic acid, and what triggers the production phase is still unknown (Hevekerl et al. 2014a). A production of up to 91 g/L itaconic acid in stirred tank reactors is described with *A. terreus* NRRL 1960 by Batti and Schweiger and Von Fries (Batti and Schweiger 1963; Von Fries 1966) and *A. terreus* DSM 23081 by Kuenz et al. (2012), although different strategies

✉ Anja Kuenz
anja.kuenz@thuenen.de

¹ Thünen Institute of Agricultural Technology, Bundesallee 50,
38116 Braunschweig, Germany

regarding the pH value were used. In Kuenz et al. (2012), the initial pH was adjusted to pH 3.1 and was not controlled in the further cultivation, in which it decreased to pH 1.8–2.0. In contrast, Batti and Schweiger (1963) controlled the pH after 5.8 days at pH 3.2 with ammonia solution. A similar pH strategy was applied by Hevekerl et al. (2014b). The pH was controlled in the production phase at pH 3 and resulted in an itaconic acid concentration of 146 g/L with an overall productivity of 0.48 g/L/h. The productivity was increased to 1.15 g/L/h itaconic acid with a final titer of 129 g/L itaconic acid by combining different optimized parameters. Also, Karaffa et al. (2015) were able to increase the final itaconic acid concentration to 130 g/L with *A. terreus* NRRL 1960 without pH control. Therefore, manganese ion-deficient conditions were necessary.

To shape an economical industrial process, like the citric acid production with *Aspergillus niger*, it is important to decrease the process cost by increasing the final concentration of itaconic acid with a reasonable productivity. Industrial processes of citric acid yield production levels of more than 200 g/L citric acid with *A. niger* (Steiger et al. 2013). There are several approaches using metabolic engineering and *A. niger* as host to increase production levels of itaconic acid (Blumhoff et al. 2013; Hossain et al. 2016; Li et al. 2012; van der Straat et al. 2013; van der Straat et al. 2014). Up to now, 26.2 g/L itaconic acid is achieved with *A. niger* (Hossain et al. 2016).

The aim of this study was to reach comparable production levels of itaconic acid compared to the industrial citric acid production through bio-process engineering only using a wild-type strain. Therefore, we determined in detail the influence of pH on the itaconic acid production with *A. terreus* and carried out a scale-up in a 15-L stirred tank reactor.

Material and methods

Microorganism

The experiments were performed with a self-isolated filamentous fungus *A. terreus*, which is deposited at the DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany) as DSM 23081. The strain was stored at -80°C as 50% (v/v) glycerol stock culture in the form of spores.

Inoculum preparation

For the production of spores from surface cultures, a stock culture was plated on Czapek Dox Agar (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated for 4 days at 30°C . The spores were harvested with a NaCl solution (0.9% w/v), and the concentration of the spore suspension was determined using a Thoma counting chamber with a Zeiss microscope (Axioplan, Carl Zeiss AG, Jena, Germany).

These spores from surface culture were used for standard fermentation in a 1.5-L stirred tank reactor with a filling volume of 1×10^6 spores/mL. After 2 days of cultivation at pH 5 manually by adding NaOH, the mycelia were separated by a sieve during the further cultivation. After other 3 days of cultivation, the fermentation was separated by a sieve. The mycelia were separated by a sieve, centrifuged at $4600 \times g$ for 10 min with NaCl solution (0.9% w/v). The concentration of the suspension was also determined using a Thoma counting chamber with a Zeiss microscope (Axioplan, Carl Zeiss AG, Jena, Germany). These spores of substrate-limited and all fermentations and were stored at -80°C .

Fermentation media composition

The production media contained 180 g/L glucose, 0.8 g/L KH_2PO_4 , 5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 15 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. All components were of p.a. quality (Merck, Darmstadt, Germany), Sigma-Aldrich (Karlsruhe, Germany). All components were separately in stock solutions and were sterile-filtered. Before autoclaving, the pH was adjusted to pH 3.1 for all solutions, except for CaCl_2 and FeSO_4 . No precipitation was observed during the autoclaving. The glucose was added in solid form to prevent a glucose limitation.

To reduce the manganese concentration in the medium, a 400-g/L glucose solution was used in a column (450 mm $\times$ 25 mm), which was filled with resin (Dowex 50WX8, 100/200, Rohm and Haas, Louisville, USA). The pH value of the solution was adjusted to pH 3.1 with a 0.5 M NaOH solution. The other part was freeze-dried (Alpha 1, Karlsruhe, Germany), crushed in a mortar, and used in the form without previous sterilization to prevent a substrate limitation.

Cultivation in a 1.5-L multi-reactor

The cultivations were performed in a glass bioreactor system, consisting of two stirred tank reactors with a filling volume of 1.5 L, stirred at 450 rpm with a magnetic stirrer. The initial pH was 3.1 and the inoculation was 1×10^6 spores/mL. The cultivation was controlled by the DASGIP Control software (DASGIP, Karlsruhe, Germany) and the online signals of the

and redox. If not otherwise mentioned, the pH regulation was carried out with a 6.25% ammonia solution (ultra-trace analysis, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The DO was controlled by the variation of the air flow rate at around 25%. After 1 day of cultivation, antifoam (Ucolup N115, Brenntag, Mülheim/Ruhr, Germany) was added to the broth.

The cultivations regarding the starting point of pH control were carried out as single experiments. All other cultivations were carried out in two replicates. The presented cultivations depict a single representative cultivation. The final concentrations obtained from two replicates were presented as the mean values with standard deviation.

Cultivation in a 15-L stirred tank reactor

The cultivation in a 15-L stainless steel stirred tank reactor (BioStat E, Braun Biotech International, Melsungen, Germany) was performed with a filling volume of 10 L, 35 °C, 350 rpm (Rushton impeller), a DO range of 20–25%, and an initial pH 3.1 and was inoculated with 1×10^6 spores/mL from submerged cultures. Related units of the reactor controlled the temperature, stirring rate, and DO. The pH and redox of the cultivation were recorded by DASYLab 9.0 (measX, Mönchengladbach, Germany). Antifoam (Ucolup N115, Brenntag, Mülheim/Ruhr, Germany) was added after 1 day. After 2 days, the pH value was adjusted and controlled manually to pH 3 by adding a 25% ammonia solution (ultra-trace analysis, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

The cultivation in the 15-L stirred tank reactor depicts a single representative cultivation. This cultivation was carried out in two replicates, and the mean values of the final concentration with standard deviation are presented.

Analytical methods

All samples were centrifuged at $21,000 \times g$ for 25 min at 20 °C. For determination of the cell dry weight (CDW), the pellet was washed twice with deionized water and dried to constant weight at 105 °C for at least 48 h. The supernatant was used for further analysis. A Shimadzu (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) HPLC with a HPX-87H column (Bio-Rad, Munich, Germany) and a refractive index detector and UV detector at 210 nm was used to analyze the concentrations of glucose and organic acids. The mobile phase was a 5 mM H_2SO_4 solution at a flow rate of 0.6 mL/min and a column temperature of 40 °C.

Phosphate concentration was detected with an ICS-100 ion chromatograph (Dionex, Sunnyvale, USA). For the determination of anions at room temperature, an IonPac AS11-HC pre-column (4×50 mm), an IonPac AS11-HC column (4×250 mm), and an Anion Self-Regenerating Suppressor were used. The signal was detected by a conductivity detector. Twenty-five millimolars of NaOH with a flow rate of 1 mL/min was used as mobile phase.

Manganese ion concentration was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; Element XR, ThermoFisher, Bremen, Germany). A micro-mist nebulizer, a cyclonic spray chamber, a N 1.25 kW were used. Samples were diluted 100 times.

Dissociation constants of itaconic acid were determined by titration of the fermentation broth with a titrator (TitroLine alpha, Seba, Germany) and a 0.1 M KOH solution. The pH was monitored and the equivalent weight was calculated with the software TitrSoft 2.6 (Schott Instrument, Mainz, Germany). pK_a values were calculated and used for determination of the relative concentration of itaconic acid forms. Itaconic acid form is named H_2IA , itaconic acid describes the sum of the measured concentration by HPLC and the calculated concentration by pK_a .

Microscopy

Cells were examined with a light microscope (Axioplan, Carl Zeiss AG, Jena, Germany) with the software analysis program (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Results

Standard cultivation without

A cultivation of *A. terreus* with a 1.5-L bioreactor with spore concentration of 1×10^6 spores/mL and 0.8 g/L KH_2PO_4 as a reference

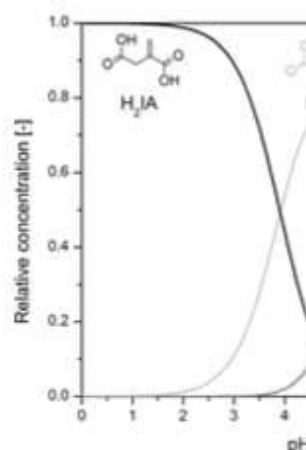


Fig. 1 Calculated relative concentration of itaconic acid forms as a function of the pH value in the fermentation broth

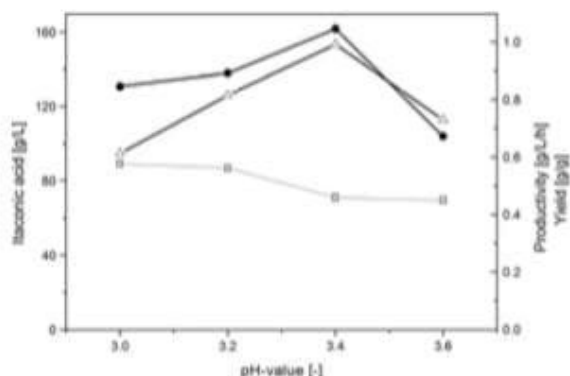


Fig. 3 Influence of the controlled pH during the production phase of itaconic acid on the final titer (circle), overall productivity (open triangle), and yield (square). The pH was raised after 2.1 days and controlled with a 6.25% ammonia solution in 1.5-L glass stirred tank reactors, standard medium with 0.8 g/L KH_2PO_4 , 1×10^6 submerged spores/mL, DO 25%, 450 rpm, and 35 °C

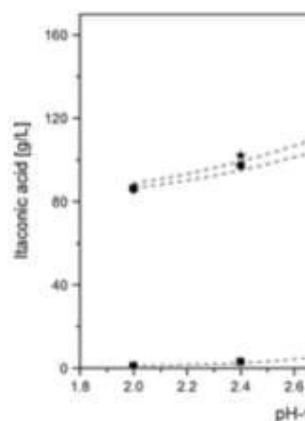


Fig. 4 Final titer of itaconic acid (stars) and the calculated amounts of H_2IA (circles) and IA^{2-} (triangles) in the fermentation broth. Data of this study from Hevekerl et al. (2014b) for pH values

formation remained at 17 g/L. However, the pellets became larger in diameter and more compact with an increasing pH value. Both cultivations indicated a typical light yellow color. Controlling the pH value at 3.6, the color changed from typical light yellow to reddish brown during fermentation. The CDW amounted to 23 g/L at a pellet diameter of approximately 190 μm . The final itaconic acid concentration was 104 g/L with a yield of 0.45 (w/w) and an overall productivity of 0.73 g/L/h. A pH control at 3.4 after 2 days resulted in the highest itaconic acid titer with 162 g/L after 6.8 days, an overall productivity of 0.99 g/L/h, and a yield of 0.46 (w/w). The share of the by-products averaged 4.3%, while α -ketoglutaric acid was the major by-product with a concentration of 5.5 g/L besides 1.6 g/L malic acid. *Cis*- and *trans*-aconitate were formed in very minor concentrations. The fermentation broth was light yellow colored and contained 22 g/L CDW with a pellet diameter of 160 μm . As a result, in terms of final titer and overall productivity, a pH control at 3.4 after 2 days was optimal for the cultivation. The final concentration increased by 26% compared to a pH control at pH 3.

For determination of the concentration of each dissociation form of itaconic acid, both pK_a values were calculated at 35 °C in the fermentation broth. The equilibrium of H_2IA and HIA^- existed at pH 3.91 and shifted for further increasing pH values to HIA^- . At pH 5.43, equal amounts of HIA^- and IA^{2-} occurred and the equilibrium shifted for pH values larger than 5.43 to IA^{2-} (Fig. 1). The concentration of each dissociation form was calculated for each final titer depending on the pH value from this study and supplemented by data by Hevekerl et al. (2014b) at pH values lower than 3.0 (Fig. 4). In a standard cultivation at pH 2.0 without pH control, only H_2IA occurred. With increasing pH control from 3.0 to 3.4, the final titer of itaconic acid increased from 129 to 162 g/L; however, for pH values larger than 3.0, the concentration of H_2IA was in the same range of 115–123 g/L. The

concentration of HIA^- increased first at pH 3.2 and 38 g/L at pH 3.4. IA^{2-} of pH 3.0–3.6.

Influence of phosphate on a pH

Hevekerl et al. (2014b) described a concentration of 146 g/L with 0.1 g/L KH_2PO_4 after 2 days at pH 3; because the strategy of this study was used for 0.1 g/L KH_2PO_4 and compared to a concentration of 0.8 g/L KH_2PO_4 .

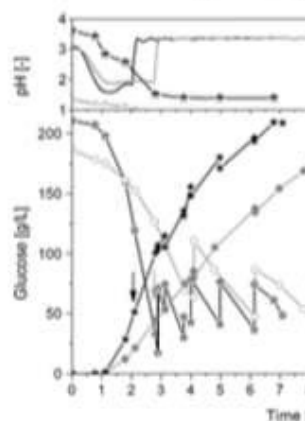


Fig. 5 Comparison of the cultivation with 0.8 g/L KH_2PO_4 (stars), 0.1 g/L KH_2PO_4 (black line), and 0.8 g/L K_2HPO_4 (half-filled symbols). Data of this study from Hevekerl et al. (2014b) for pH values

decreased to pH 1.8 and was controlled after 2.8 days at pH 3.4 for the cultivation with 0.1 g/L KH_2PO_4 . A phosphate limitation occurred after 2.1 days; at this point in time, the itaconic acid concentration was 16 g/L. The color of the fermentation broth turned slowly from light yellow to red violet after 7 days. After 11.8 days, a concentration of 160 ± 1 g/L itaconic acid was achieved and 138 mL ammonia solution was required for neutralization. Itaconic acid was formed with an overall productivity of 0.56 g/L/h and a yield of 0.56 (w/w). In all, around 10 g/L CDW was formed, whereby the pellet diameter was approximately 80 μm . A by-product share of 1.4% was attained, while α -ketoglutaric acid and malic acid were the major by-products. For the cultivation containing 0.8 g/L KH_2PO_4 , the initial pH of 3.1 dropped to 1.6, increased to 1.9, and was raised and controlled at 3.4 after 2.1 days. A phosphate concentration of 396 mg/L phosphate was measured with the start of itaconic acid production at day 1.1. Phosphate was not consumed totally, and a concentration of 85 mg/L was detected in the fermentation broth at the end of cultivation. The final itaconic acid concentration of 160 ± 2 g/L was reached after 6.8 days with an overall productivity of 0.99 g/L/h and a yield of 0.46 (w/w). In total, 118 mL base was used and 22 g/L CDW was formed. The pellets had a diameter of 160 μm , and the fermentation broth was light yellow during the whole cultivation time. All in all, an equal final concentration of itaconic acid was formed, independent of the phosphate concentration, and a phosphate limitation did not occur in case of cultivation with 0.8 g/L KH_2PO_4 . However, using only 0.1 g/L KH_2PO_4 , in the cultivation the yield increased by 26% and the overall productivity decreased by 44% compared with a cultivation comprising 0.8 g/L KH_2PO_4 .

15-L scale

The cultivation of *A. terreus* with the optimized pH strategy was transmitted from a 1.5-L scale to a 15-L scale. A concentration of 0.8 g/L KH_2PO_4 was chosen, and the pH control at pH 3.4 was activated after 2.1 days. After activating the pH control, the maximum productivity decreased drastically from 2.1 to 0.6 g/L/h at day 2.6 (data not shown) and the pellet diameter rose to >200 μm . Because of the changed productivity and larger pellet diameter, a relevant final titer with a high overall productivity and yield could no longer be expected and the cultivation was canceled. For that reason, in a subsequent run, the phosphate concentration was reduced to 0.1 g/L KH_2PO_4 and the pH control was set to 3 to prevent a reduced productivity. The cultivation was carried out in parallel in a 1.5- and 15-L scale stirred tank bioreactor with a 25% ammonia solution as base (Fig. 6). The pH value dropped in both cultivations from 3.1 to 1.8 and was raised to 3.0 after 1.9 days. The pH value was manually adjusted upwards at 3.0 by adding ammonia solution if required. In total, a volume of 190 mL of the base was added to the cultivation in the 15-L

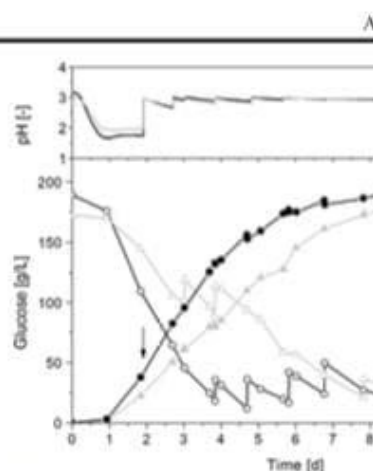


Fig. 6 Comparison of the cultivation in a 1.5-L (triangle, gray line for pH) and a 15-L stirred tank bioreactor (open circles, black line for pH) with 0.1 g/L KH_2PO_4 . Itaconic acid and glucose (open symbols). After 2 days, the pH was raised with a 25% ammonia solution: 35 °C, 1×10^6 sp. L reactor: 450 rpm, min, DO 25%; 15-L reactor: 25%

bioreactor. A total of 21 mL was required for the final itaconic acid concentration of 150 g/L after 9.7 days of cultivation in the 15-L scale with a productivity of 1.7 g/L/h. At pH 3.0, HIA^- occurred as calculated by the molar ratio (Fig. 1). In the 1.5-L cultivation, the maximum productivity was 1.1 g/L/h and a slightly lower final itaconic acid concentration of 144 g/L itaconic acid was achieved after 9.7 days. The by-product concentration was 1.4% for the 1.5-L scale and 2.5% for the 15-L scale. α -ketoglutaric acid was produced. The yield of 0.56 (w/w) from the 15-L scale with a CDW of 10 g/L was higher than the 0.46 (w/w) from the 1.5-L scale with 8 g/L CDW. The cells in the 15-L scale were more frayed and had longer filaments than the cells in the 1.5-L scale. Both cultivations showed the typical color change from light yellow to red violet compared to cultivation without pH control. The color of the 1.5-L cultivation turned

Influence of manganese

Itaconic acid production is negatively affected by manganese concentrations higher than 3 $\mu\text{g/L}$. At the beginning of the cultivations in the 1.5-L scale, the concentration of manganese in the standard medium was 1.7 $\mu\text{g/L}$. Because this concentration was described as affecting manganese concentration, the medium was purified by an ion exchanger. Thereby, the manganese concentration was reduced to ≤ 1 $\mu\text{g/L}$ at the beginning of the cultivation. Parallel fed-batch cultivations with standard glucose and purified glucose were performed.



Contents lists available at ScienceDirect

Metabolic Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymben

Original Research Article

Genetic and biochemical insights into the itaconate pathway of *Ustilago maydis* enable enhanced production

Elena Geiser^{a,e,1}, Sandra K. Przybilla^{a,1}, Meike Engel^a, Wiebke Kleineberg^{a,e},
Linda Büttner^b, Eda Sarikaya^a, Tim den Hartog^d, Jürgen Klankermayer^d, Walter Leitner^d,
Michael Böcker^{b,c}, Lars M. Blank^{a,*}, Nick Wierckx^a

^a IAMB – Institute of Applied Microbiology, ABBt – Aachen Biology and Biotechnology, RWTH Aachen University, Worringerweg 1, D-52074 Aachen, Germany

^b Department of Biology, Philipps-University Marburg, Karl-von-Frisch-Straße 8, D-35032 Marburg, Germany

^c LOEWE Center for Synthetic Microbiology (SYNMIKRO), D-35032 Marburg, Germany

^d Institut für Technische und Makromolekulare Chemie (ITMC), RWTH Aachen University, Worringerweg 2, D-52074 Aachen, Germany

^e BioSC, c/o Forschungszentrum Jülich, D-52425 Jülich, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 August 2016

Received in revised form

6 October 2016

Accepted 11 October 2016

Keywords:

Itaconate

2-hydroxyisocaproate

*Ustilago maydis**Aspergillus terreus*

Metabolic engineering

Secondary metabolites

P450 monooxygenase

ABSTRACT

The Ustilaginaceae family of smut fungi, especially *Ustilago maydis*, gained biotechnological interest over the last years, amongst others due to its ability to naturally produce the versatile bio-based building block itaconate. Along with itaconate, *U. maydis* also produces 2-hydroxyisocaproate. The latter was proposed to be derived from itaconate, but the underlying biochemistry and associated genes were thus far unknown. Here, we confirm that 2-hydroxyisocaproate is a secondary metabolite of *U. maydis* and propose an extension of *U. maydis* itaconate pathway from itaconate to 2-hydroxyisocaproate. This conversion is catalyzed by the P450 monooxygenase Cyp3, encoded by *cyp3*, a gene, which is adjacent to the itaconate gene cluster of *U. maydis*. By deletion of *cyp3* and simultaneous overexpression of the gene cluster regulator *ria1*, it was possible to generate an itaconate hyper producer strain, which produced up to 4.5-fold more itaconate in comparison to the wildtype without the by-product 2-hydroxyisocaproate. By adjusting culture conditions in controlled pulsed fed-batch fermentations, a product to substrate yield of 67% of the theoretical maximum was achieved. In all, the titer, rate and yield of itaconate produced by *U. maydis* was considerably increased, thus contributing to the industrial application of this unicellular fungus for the biotechnological production of this valuable biomass derived chemical.

© 2016 International Metabolic Engineering Society. Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

The Ustilaginaceae family of smut fungi gained biotechnological interest over the last years (Feldbrügge et al., 2013; Geiser et al., 2014; Guevarra and Tabuchi, 1990a). Their yeast-like morphology in axenic culture can be advantageous in industrial production of valuable bio-based platform chemicals (Geiser et al., 2014; Klement and Büchs, 2013; Maassen et al., 2013). Furthermore, members of this family are able to metabolize a variety of carbohydrate poly- and monomers derived from renewable non-food biomass degradation, which is widely considered the future substrates for biotechnological bulk production processes (Cano-Canchola et al., 2000; Couturier et al., 2012; Feldbrügge et al., 2013; Geiser et al., 2016b, 2013; Gray et al., 2006; Mueller et al., 2008). Also their

utilization of industrial waste streams as substrate, for example glycerol as by-product of biodiesel production, can contribute to a more sustainable bio-economy (Zambanini et al., 2016a, 2016b). Ustilaginaceae naturally produce a wide range of value-added chemicals (e.g., secondary metabolites, TCA cycle intermediates) with growing biotechnological significance, such as itaconic, L-malic, succinic, itatartaric, and 2-hydroxyisocaproic acid, but also biosurfactants such as mannosylerythritol lipids and ustilagic acid (Feldbrügge et al., 2013; Geiser et al., 2014; Guevarra and Tabuchi, 1990a; Zambanini et al., 2016b).

The production of most of the abovementioned chemicals has been investigated in detail (Aurich et al., 2009; Blazeck et al., 2015; Blumhoff et al., 2013; Böcker et al., 2008; Feldbrügge et al., 2013; Geilen et al., 2010; Günther et al., 2013; Harder et al., 2016; Ikeda et al., 2002; Kubicek et al., 1988; Moon et al., 2010; Morita et al., 2009; Steiger et al., 2016; Tsao et al., 1999; Willke and Vorlop, 2001). In contrast, the production of the organic acid itatartarate ($C_5H_8O_6$, CAS No. 2957-09-7) and its lactone 2-hydroxyisocaproate ($C_5H_8O_5$, CAS No. 32814-34-9) are not as well characterized. This is

* Corresponding author.

E-mail address: lars.blank@rwth-aachen.de (L.M. Blank).

¹ These authors contributed equally to this manuscript.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.006>

1096-7176/© 2016 International Metabolic Engineering Society. Published by Elsevier Inc.

Please cite this article as: Geiser, E., et al., Genetic and biochemical insights into the itaconate pathway of *Ustilago maydis* enable enhanced production. Metab. Eng. (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.006>

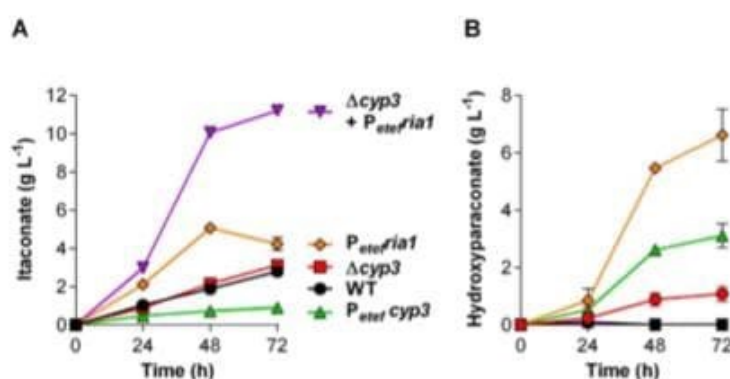


Fig. 4. Itaconate and 2-hydroxyparaconate production by various *U. maydis* MB215 strains. Itaconate (A) and 2-hydroxyparaconate (B) production in shaken cultures of this engineered *U. maydis* MB215 $\Delta cyp3 P_{itefria1}$ strain itaconate production was drastically increased, reaching an itaconate titer almost 4-fold higher than the wildtype and 2.6-fold higher than the *ria1* overexpression strain (Fig. 4A, C). As expected, formation of 2-hydroxyparaconate was completely abolished in *U. maydis* MB215 $\Delta cyp3 P_{itefria1}$ (Fig. 4B, C).

strain, the itaconate concentration decreases more rapidly upon prolonged cultivation, suggesting that *cyp3* is also upregulated resulting in a faster conversion of itaconate to 2-hydroxyparaconate (Geiser, 2015). Thus, overexpression of *ria1* does not only enhance activity of all itaconate anabolism genes but simultaneously increases activity of the abovementioned pathway to 2-hydroxyparaconate. In order to avoid this, *ria1* was overexpressed in the $\Delta cyp3$ mutant. In shaken cultures of this engineered *U. maydis* MB215 $\Delta cyp3 P_{itefria1}$ strain itaconate production was drastically increased, reaching an itaconate titer almost 4-fold higher than the wildtype and 2.6-fold higher than the *ria1* overexpression strain (Fig. 4A, C). As expected, formation of 2-hydroxyparaconate was completely abolished in *U. maydis* MB215 $\Delta cyp3 P_{itefria1}$ (Fig. 4B, C).

2.5. Optimized itaconate production in controlled pulsed fed-batch fermentations

In order to achieve high itaconate production, *U. maydis* MB215 $\Delta cyp3 P_{itefria1}$ was cultivated in pH-controlled pulsed fed-batch fermentations. When using 200 g L⁻¹ glucose as initial carbon source and 4 g L⁻¹ ammonium chloride as nitrogen source, glucose consumption, ammonium consumption, OD₆₀₀ and cell dry weight of the engineered strain were similar to the wildtype (Fig. 5A, Table 1). Also under these conditions 2-hydroxyparaconate production

was completely absent in *U. maydis* MB215 $\Delta cyp3 P_{itefria1}$ (Fig. 4B, C). Itaconate production was increased by 4.5-fold in the $\Delta cyp3 P_{itefria1}$ strain compared to the wildtype (Fig. 4A, C). In *A. terreus*, m, synthesis, where it is located in mitochondria by MttA (J cluster regulator upregulates cytoplasmic malate flux) the reduced malate production that the *U. maydis* upstre With these values so far 45 g L⁻¹ with *U. maydis* 2014; Klement and Büch 2013).

Probably product in higher itaconate titers. already observed at itaconate leading to decreased yield at higher concentration avoided by the development of such as calcium phosphate for itaconate recovery additionally enable cell

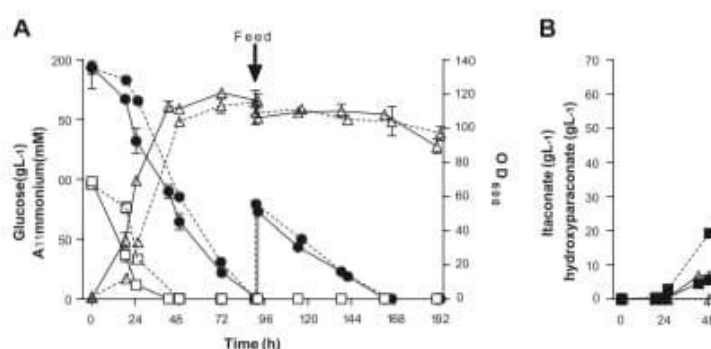


Fig. 5. Controlled high-density pulsed fed-batch fermentations of *U. maydis* MB215 wildtype (solid lines) and strain $\Delta cyp3 P_{itefria1}$ (dashed lines). A: concentration of glucose (●) and ammonium (○) and B: concentration of itaconate (■) and 2-hydroxyparaconate (▲) in the medium with 200 g L⁻¹ glucose, 4 g L⁻¹ NH₄Cl at pH 6.0–6.5 titrated with NaOH. Arrows indicate the addition of 75 g L⁻¹ glucose and 4 g L⁻¹ NH₄Cl at pH 6.0–6.5 titrated with NaOH. Data are mean ± SD (n = 3).

Please cite this article as: Geiser, E., et al., Genetic and biochemical insights into the itaconate enhanced production. Metab. Eng. (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.006>

Table 1

Production parameters of *U. maydis* wildtype and *U. maydis* MB215 Δ cyp3 *P_{ced1}* fermentations in a bioreactor after 163 h in 75 g L⁻¹ glucose feed, and 4 g L⁻¹ NH₄Cl or 50 g L⁻¹ glucose, 65 g L⁻¹ glucose feed, and 0.8 g L⁻¹ NH₄Cl. Errors indicate deviation from the mean (n=3).

		<i>U. maydis</i> MB215 wildtype	<i>U. maydis</i> MB215 Δ cyp3 <i>P_{ced1}</i>
Itaconate	titer _{max} (g L ⁻¹) ^a	2229	3025
	r _p (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^b	14.0 ± 0.3	63.2 ± 0.7
	Y _{PI/S} (g _{ita} g _{glc} ⁻¹) ^c	0.09 ± 0.00	0.38 ± 0.00
2-hydroxyitaconate	titer _{max} (g L ⁻¹) ^a	21.3 ± 0.7	0.00 ± 0.00
	r _p (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^b	0.13 ± 0.01	0.00 ± 0.00
	Y _{PI/S} (g _{2hita} g _{glc} ⁻¹) ^c	0.08 ± 0.01	0.00 ± 0.00
malate	titer _{max} (g L ⁻¹) ^a	21.1 ± 1.3	8.8 ± 0.2
	r _p (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^b	0.13 ± 0.01	0.05 ± 0.00
	Y _{PI/S} (g _{mal} g _{glc} ⁻¹) ^c	0.08 ± 0.01	0.03 ± 0.00
Y _{PI/S} (g _{total} g _{glc} ⁻¹) ^d		0.21 ± 0.01	0.26 ± 0.00
	CDW _{max} (g _{biomass} L ⁻¹) ^e	36.9 ± 0.7	31.6 ± 3.9

^a titer_{max}: maximum titer.

^b r_p: overall production rate.

^c Y_{PI/S}: yield product per consumed glucose.

^d Y_{PI/S}: yield total acid per consumed glucose.

^e CDW_{max}: maximum cell dry weight.

growth associated yield reductions (Carstensen et al., 2013). In addition, advanced feeding strategies could be beneficial for further improvement of the itaconate production in controlled pulsed fed-batch fermentations. Furthermore, a strain, which is more resistant to itaconate, could be developed, either by screening the natural tolerance spectrum of the Ustilaginaceae, by genetic engineering, and/or by mutagenesis and laboratory evolution. The latter was already successfully performed for *A. terreus* (Yahiro et al., 1995).

The maximal theoretical product to substrate yield (Y_{PI/S}) for itaconate from glucose is 0.72 g_{ita} g_{glc}⁻¹ assuming zero growth. With the Y_{PI/S} of 0.23 ± 0.0 g_{ita} g_{glc}⁻¹ obtained by *U. maydis* MB215 Δ cyp3 *P_{ced1}* almost 32% of the theoretical maximum was reached, which is 3-fold higher in comparison to our previous study (Geiser et al., 2014). However, the comparison to the theoretical Y_{PI/S} and also to yields achieved by *A. terreus* (Kautola et al., 1985; Klement and Büchs, 2013; Yahiro et al., 1995) indicates that there is still room for further optimization. *U. maydis* and other smut fungi often only initiate organic acid production upon depletion of an essential nutrient such as nitrogen, which poses an inherent trade-off between biomass and product formation (Zambanini et al., 2016b). Less nitrogen leads to less biomass

formation and thus, theoretical increase comes at the expense. Also, in contrast to *A. terreus*, efficiently with relatively low (Maassen et al., 2013). Thus, yield of *U. maydis* MB215 Δ cyp3 reduced initial glucose and ammonium concentration, respectively (Fig. 6B, Table 1). In all, pending on the main goal, it can be changed by variation of medium and ammonium concentration

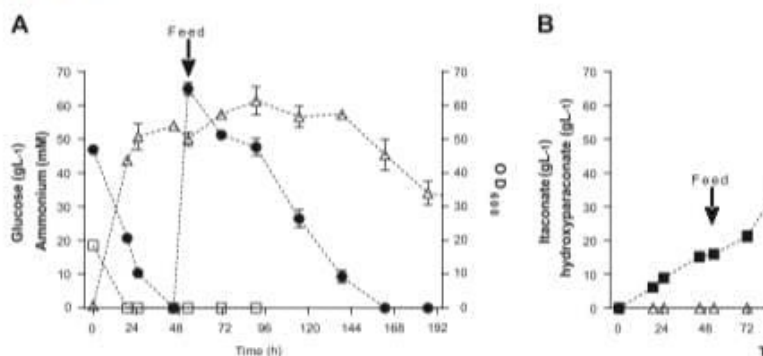


Fig. 6. Controlled low-density pulsed fed batch fermentation of *U. maydis* MB215 Δ cyp3 *P_{ced1}*. A: OD₆₀₀ (Δ), concentration of itaconate (●) and 2-hydroxyitaconate (Δ) during fermentation in a bioreactor containing batch medium with 6.0 titrated with NaOH. Arrows indicate the addition of 65 g L⁻¹ glucose. Error bars indicate deviation from the mean (n=3).

Please cite this article as: Geiser, E., et al., Genetic and biochemical insights into the itaconate production enhanced production. Metab. Eng. (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.006>

efficiency of itaconate production in this optimized strain. This might be beneficial when using lignocellulosic hydrolysates as substrates, which often have lower sugar concentrations (Klement et al., 2012).

Although the low-density cultivation of *U. maydis* MB215 $\Delta cyp3$ P_{etf1} constitutes a major improvement in the itaconate production by this unicellular fungus, there is still room for further improvement by metabolic engineering, especially concerning the $Y_{P/S}$. Further optimization could be achieved by disruption of pathways responsible for the formation of byproducts such as glycolipids or for possible itaconate degradation as mentioned above. The recent establishment of CRISPR/Cas9 genome editing in *U. maydis* (Schuster et al., 2016) is expected to expedite this effort.

3. Conclusion

U. maydis' itaconate production was considerably increased by a combination of metabolic engineering and optimization of culture conditions. Although the maximum yield and titer obtained in this study are still somewhat lower than that of industrial *A. terreus* strains, they are in a range that could make industrial application feasible since *U. maydis*' unicellular growth can pose a significant process advantage. Further optimization of both strain and process can be expected, strengthening the outlook of application of this promising fungus for the biotechnological production of itaconate. The characterization of the itaconate oxidase Cyp3 will enable the rational design of 2-hydroxyparaconate producing strains in the future, while the presence of its possible orthologue in *A. terreus* may also provide further insight into the diversity of itaconate-based secondary metabolism in other hosts.

4. Experimental procedures

4.1. Strains and culture conditions

All strains used in this work are listed in Table 2. *U. maydis* was grown in YEP5 medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) sucrose) at 30 °C. Strain *U. maydis* MB215 $\Delta cyp3$ P_{etf1} was constructed according to materials and methods previously published in Geiser et al. 2016 (Geiser et al., 2016a) by integration of the *ria1* overexpression construct into the *ip*-locus of *U. maydis* strain MB215 $\Delta cyp3$.

Shaking cultures of *Ustilago maydis* mutants were performed in the System Duetz® (24 well plates) with a filling volume of 1.5 mL ($d=50$ mm, $n=300$ rpm, $T=30$ °C and $\Phi=80\%$) (Duetz et al.,

2000). The screening medium contained 0.8 g L⁻¹ NH₄Cl, 0.2 g L⁻¹ N, 0.5 g L⁻¹ KH₂PO₄, 1 mL L⁻¹ yeast extract, 1 mL L⁻¹ MES solution, and as buffer MES (Geiser et al., 2016a). The inoculum was taken as a continuous oxygenation.

For the itaconate feeding, strains were cultivated in screening medium (well plates) with a filling volume of 1.5 mL ($n=300$ rpm, $T=30$ °C and $\Phi=80\%$). Cells were harvested and the medium consisting of screening medium, NH₄Cl and a pH set to 3.5 was taken at different time points during the cultivation. 2-hydroxyparaconate concentration was determined via HPLC.

Controlled batch cultivation was performed in Brunswick BioFlo® 115 bioreactors with a total filling volume of 1.3 L. Cultivations were performed at 200 g L⁻¹ or 50 g L⁻¹ glucose, 0.01 g L⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O, 0.01 g L⁻¹ FeSO₄ · 7H₂O, 0.01 g L⁻¹ yeast extract (Merck Millipore) and 1 mL L⁻¹ trace elements. The pH was maintained by a CO₂ stream at approximately 80% saturation. The aeration rate (700–1200 rpm), the stirring rate (1 L min⁻¹), the temperature (30 °C) and evaporation were controlled. Antifoam 204 (Sigma) was added to prevent foam formation. The bioreactor was filled with washed cells from screening medium. Samples were taken after 96 h a single feed pulse (64.8 ± 1.5 g L⁻¹) was added.

4.2. Analytical methods

Cell densities were measured at 600 nm with a Unicob spectrophotometer.

For dry weight determination, cells were harvested using Macherey-Nagel Paper and weighed after drying at 60 °C.

The ammonium concentration was determined via HPLC.

Table 2
U. maydis strains used in this study.

Strain designation (iAMB strain collection number)	Relevant genotype and Resistance	Plasmid transformed/Resistance	Description
MB215 (2229)	<i>a2b13</i> , no resistance (wild isolate; progenitor strain)	–	–
MB215 $\Delta cyp3$ (2222)	ΔUMG_05074_HygR	pRS426-05074-HygR	<i>umag_05074</i> (cytochrome P450, Cyp3)
MB215 $\Delta rda1$ (2224)	ΔUMG_12229_HygR	pRS426-12229-HygR	<i>umag_12229</i> (ring-cleaving endonuclease, Rda1)
MB215 $\Delta rda1$ (2108)	ΔUMG_05076_HygR	pRS426-05076-HygR	<i>umag_05076</i> (trans-aconitase, Tac1)
MB215 $\Delta rda1$ (2317)	ΔUMG_11778_HygR	pRS426-11778-HygR	<i>umag_11778</i> (aconitase, Acon1)
MB215 $\Delta rda1$ (2112)	ΔUMG_05080_HygR	pRS426-05080-HygR	<i>umag_05080</i> (regulator of aconitase, Rda1)
MB215 $P_{etf1} cyp3$ (2352)	$P_{etf1} UMG_05074_CbxR$	pETEF-05074_CbxR	<i>umag_05074</i> (cytochrome P450, Cyp3)
MB215 $P_{etf1} rda1$ (2366)	$P_{etf1} UMG_05080_CbxR$	pETEF-05080_CbxR	<i>umag_05080</i> (regulator of aconitase, Rda1)
MB215 $\Delta cyp3$ $P_{etf1} rda1$ (3025)	ΔUMG_05074_HygR , $P_{etf1} UMG_05080_CbxR$	pRS426-05074-HygR, pETEF-05080-CbxR	<i>umag_05074</i> (cytochrome P450, Cyp3), <i>umag_05080</i> (regulator of aconitase, Rda1)

Please cite this article as: Geiser, E., et al., Genetic and biochemical insights into the itaconate enhanced production. Metab. Eng. (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.006>

Главный редактор:

А. Ф. Туманян – д. с.-х. н., проф.

Научно-редакционный совет**Председатель совета:**

А. Л. Иванов – д. б. н., проф.

Члены совета:

С. Р. Аллахвердиев – д. б. н., проф.

Н. Н. Балашова – д. э. н., проф.

Ю. А. Ватников – д. вет. н., проф.

М. С. Гинс – д. б. н., проф.

Н. Н. Дубенок – д. с.-х. н., проф.

В. П. Зволинский – д. с.-х. н., проф.

П. Ф. Кононов – д. с.-х. н., проф.

К. Н. Кулик – д. с.-х. н., проф.

С. С. Литвинов – д. с.-х. н., проф.

В. М. Пизенгольц – д. э. н., проф.

В. Г. Плющиков – д. с.-х. н., проф.

В. С. Семенович – д. э. н., проф.

Г. Е. Серветник – д. с.-х. н., проф.

Н. Н. Скитер – д. э. н., проф.

Н. В. Тютюма – д. с.-х. н.

Р. С. Шепитько – д. э. н., проф.

Head editor:

A. F. Tumanyan – Dr. Agr. Sci., Prof.

Editorial Board**Chairman of the Board:**

A. L. Ivanov – Dr. Biol. Sci., Prof.

Members of the Board:

S. R. Allahverdiyev – Dr. Biol. Sci., Prof.

N. N. Balashova – Dr. Econ. Sci., Prof.

Yu. A. Vatinikov – Dr. Vet. Sci., Prof.

M. S. Gins – Dr. Biol. Sci., Prof.

N. N. Dubenok – Dr. Agr. Sci., Prof.

V. P. Zvolinsky – Dr. Agr. Sci., Prof.

P. F. Kononov – Dr. Agr. Sci., Prof.

K. N. Kulik – Dr. Agr. Sci., Prof.

S. S. Litvinov – Dr. Agr. Sci., Prof.

V. M. Pizengolts – Dr. Econ. Sci., Prof.

V. G. Plyushchikov – Dr. Agr. Sci., Prof.

V. S. Semenovich – Dr. Econ. Sci., Prof.

G. E. Servetnik – Dr. Agr. Sci., Prof.

N. N. Skiter – Dr. Econ. Sci., Prof.

N. V. Tyutyuma – Dr. Agr. Sci.

R. S. Shepit'ko – Dr. Econ. Sci., Prof.

Редактор

О. В. Любименко

Оформление и верстка

В. В. Земсков

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ПРОБЛЕМЫ АГРОПРОМЫШЛЕННОГО КОМПЛЕКСА

№3(24) 2015

Содержание**Овощеводство**

А. Ф. Туманян, Н. В. Тютюма, Н. А. Щербакова
Фенология и биометрические показатели
сортов картофеля в зависимости от применяемых
ростостимулирующих препаратов.....3

Плодоводство, виноградарство

Е. Н. Иваненко, Л. В. Попова, Т. В. Меншуткина
Влияние подвоя на рост и развитие яблони
в засушливых условиях Северного Прикаспия..... 11

Е. Н. Иваненко, Е. В. Полухина

Перспективный сортимент винограда
для создания продуктивных насаждений
в Астраханской области 16

Мелиорация, рекультивация и охрана земель

К. Е. Калайджян

Оценка мелиоративного состояния
осушенных сельскохозяйственных угодий
Московской области 19

Агрохимия

В. П. Зволинский, А. Н. Бондаренко, А. Ф. Туманян

Результаты возделывания сои
при использовании микробиологических препаратов
и стимуляторов роста в аридных условиях
Астраханской области..... 23

Практические аспекты работы с продуцентами итаконовой кислоты

УДК 547.462.3

М. С. Котелев, Е. А. Кожевникова, Е. И.
Российский государственный университет нефти и газа

Микроорганизмы-продуценты итаконовой кислоты, в первую очередь *Aspergillus terreus*, многих лет остаются объектом активных экспериментальных исследований. Тем не менее в ходе исследований давно стали рутинной лабораторной практикой. Тем не менее в ходе исследований практические аспекты, которые необходимо учитывать при планировании, реализации эксперимента. В работе были исследованы особенности коллекционных штаммов итаконовой кислоты в лиофильно высушенном состоянии на их способность к синтезу итаконовой кислоты в культуральной жидкости. Были сняты кривые роста, кривые продукта, изучена морфология коллекционных штаммов с использованием при погруженном культивировании и при поверхностном росте на плотных питательных средах. Была исследована способность *Aspergillus terreus* катаболизировать итаконовую кислоту ферментацией. Полученные данные в целом совпадают с результатами, описанными в литературе. Однако направленное изучение данного эффекта было проведено впервые. Было установлено, что исследованные коллекционные штаммы *Aspergillus terreus* хранения сохраняют способность к сверхсинтезу итаконовой кислоты, их способность к синтезу описанной в литературе. При этом наблюдаемое уменьшение показателей в эксперименте может быть обусловлено такими неочевидными причинами, как изменение культуры или катаболизация продуцентом целевого продукта. Максимальный выход итаконовой кислоты в неоптимизированных условиях составил 22,7 г/л, что, по утверждению многих авторов, является надежной базой для достижения промышленно значимых значений выхода.

Ключевые слова: биотехнология, итаконовая кислота, лиофилизация.

Введение

Разработка биотехнологий переработки отходов сельского хозяйства, являющихся возобновляемым источником сырья для производства коммерчески ценных веществ, остается актуальной задачей современных научных исследований. Одним из базовых химических продуктов, используемым в различных процессах органического синтеза, является итаконовая кислота. Основой современной промышленной технологии получения итаконовой кислоты служит погруженное культивирование гриба *Aspergillus terreus*. Этот продуцент был описан как *Aspergillus itaconicus* в 1931 г. исследователем Киношита (Kinoshita), который предположил, что биосинтез итаконовой кислоты основан на декарбоксилировании аконитовой кислоты [1]. В 1955 г. в Бруклине на заводе компании «Пфайзер» (Pfizer Co. Inc.) было запущено первое промышленное производство итаконовой кислоты [2, 3].

Процесс получения итаконовой кислоты подразумевает использование в качестве

сырья таких сахаров, как глюкоза, фруктоза, сахароза. Однако результаты исследований показывают, что для получения итаконовой кислоты более дешевых видов сырья, не только свободных сахаров, но и полисахаридов, таких как целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал, могут быть использованы в процессе ферментации. В сельском хозяйстве итаконовая кислота используется для получения итаконовой кислоты из шелухи подсолнечника и т.п.

Более чем полвека исследований и работы с продуцентами итаконовой кислоты значительно усовершенствовали процесс ее синтеза. Прием *A. terreus* давно стал практикой. Тем не менее в последние годы открываются новые возможности, которые необходимы для дальнейшего культивирования, реализации и экспериментальной проверки.

Экспериментальная часть

В ходе исследования использовали штамм *A. terreus* DSM 826 из Германской коллекции микроорганизмов и культур клеток (DSMZ). Культура поступила в форме лиофильно высушенного препарата в герметичной ампуле. Ампулу вскрыли с соблюдением правил асептики и растворили препарат стерильным физраствором. С целью уменьшения количества пересевов исходной культуры взвесь бактерий использовали для получения коллекционных и рабочих культур на глюкозо-картофельном агаре (ГКА) в биологических пробирках 20 × 200 мм под целлюлозными пробками.

Коллекционные культуры, предназначенные для длительного хранения, получали на «коротком» скошенном ГКА, угол поверхности которого по отношению к стенке пробирки составлял около 40°, что обеспечивало относительно небольшую площадь толстого слоя среды. Рабочие культуры, предназначенные для дальнейших пересевов, получали на «длинном» скошенном ГКА, угол поверхности которого по отношению к стенке пробирки составлял около 20°, что обеспечивало относительно большую площадь тонкого слоя среды. Контроль чистоты исходной культуры осуществляли методом высева на ГКА в чашки Петри с последующим изучением культурально-морфологических свойств.

Культивирование на плотной среде осуществляли при 35°C в течение 3–5 суток до зарастания не менее 2/3 поверхности агара. Хранили культуры при температуре 4°C.

Для получения посевного материала использовали жидкую питательную среду следующего состава, г/л: глюкоза — 55,5, кукурузный экстракт — 3, NH_4NO_3 — 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 2. Значение pH среды устанавливали равным 3,0 раствором HNO_3 [3]. Среду разливали по 100 мл в качалочные колбы объемом 750 мл и стерилизовали автоклавированием в течение 30 мин при 121°C. В пробирки с рабочими культурами *A. terreus* вносили по 10 мл стерильного физраствора с добавлением 0,1 г/л Tween 20 и смывали споры с поверхности мицелия. Количество спор определяли методом прямого подсчета в камере Горяева. Исходную суспензию вносили в количестве, содержащем 3–3,5·10⁸ спор. Колбы помещали на ротационную качалку и культивировали при скорости вращения 200 об./мин и температуре 35°C. Через 5 су-

ток культуру использовали для посева нового материала.

В альтернативном варианте посевной культуры, полученной из жидкой культуры, полученной в жидкой среде по описанной методике, засева культуры в твердую среду вносили 10 мл культуры в стерильную пробирку. В жидкой среде, хранение в виде суспензии спор и не требовало дополнительного материала не отличалось от описанной методики.

Для получения посевного материала использовали жидкую питательную среду следующего состава, г/л: глюкоза — 55,5, кукурузный экстракт — 3, NH_4NO_3 — 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 2. Значение pH среды устанавливали равным 3,0 раствором HNO_3 [3]. Среду разливали по 100 мл в качалочные колбы объемом 750 мл и стерилизовали автоклавированием в течение 30 мин при 121°C. В пробирки с рабочими культурами *A. terreus* вносили по 10 мл стерильного физраствора с добавлением 0,1 г/л Tween 20 и смывали споры с поверхности мицелия. Количество спор определяли методом прямого подсчета в камере Горяева. Исходную суспензию вносили в количестве, содержащем 3–3,5·10⁸ спор. Колбы помещали на ротационную качалку и культивировали при скорости вращения 200 об./мин и температуре 35°C. Через 5 су-

ток культуру использовали для посева нового материала. В альтернативном варианте посевной культуры, полученной из жидкой культуры, полученной в жидкой среде по описанной методике, засева культуры в твердую среду вносили 10 мл культуры в стерильную пробирку. В жидкой среде, хранение в виде суспензии спор и не требовало дополнительного материала не отличалось от описанной методики. Для получения посевного материала использовали жидкую питательную среду следующего состава, г/л: глюкоза — 55,5, кукурузный экстракт — 3, NH_4NO_3 — 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 2. Значение pH среды устанавливали равным 3,0 раствором HNO_3 [3]. Среду разливали по 100 мл в качалочные колбы объемом 750 мл и стерилизовали автоклавированием в течение 30 мин при 121°C. В пробирки с рабочими культурами *A. terreus* вносили по 10 мл стерильного физраствора с добавлением 0,1 г/л Tween 20 и смывали споры с поверхности мицелия. Количество спор определяли методом прямого подсчета в камере Горяева. Исходную суспензию вносили в количестве, содержащем 3–3,5·10⁸ спор. Колбы помещали на ротационную качалку и культивировали при скорости вращения 200 об./мин и температуре 35°C. Через 5 су-

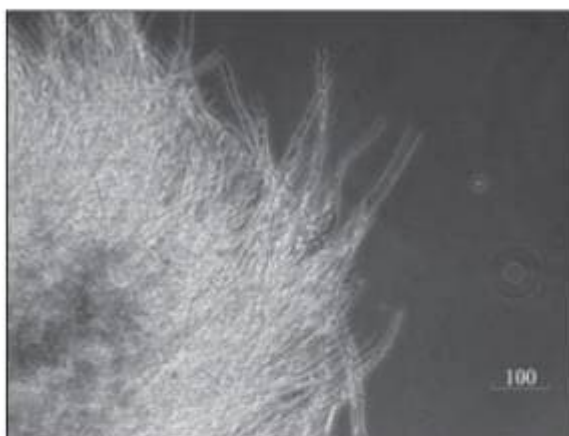


Рис. 1. Мицелій *A. terreus* DSM 826 на 2-е сутки погруженного культивирования. Фазовый контраст (×400)



Рис. 2. Мицелій погруженного культивирования. Фазовый контраст (×400)

элюента составляла 0,65 см³/мин. Объем вводимой пробы был 10–20 мкл.

Чистоту погруженной культуры и ее морфологию оценивали методом световой микроскопии витальных препаратов при фазово-контрастной схеме освещения и инструментальном увеличении ×400.

Результаты исследований и их обсуждение

В первой серии экспериментов по синтезу итаконовой кислоты непосредственно после получения штамма *A. terreus* DSM 826 из коллекции показатели выхода целевого продукта не превышали 10,8 г/л. По данным литературы, штамм должен был обеспечить к концу ферментации концентрацию итаконовой кислоты в культуральной жидкости не менее 20 г/л [5]. При этом отсутствовали явные нарушения технологии, и культура оставалась чистой. Продукцент сохранял характерные морфологические характеристики. На ранних стадиях культивирования в периферической зоне пеллет не наблюдалось ветвление гиф мицелия, как показано на рис. 1. На более поздних стадиях, в период кислотообразования, на концах гиф образовались вильчатые разветвления, как показано на рис. 2. Такая морфологическая особенность продуцентов итаконовой кислоты была выявлена у отечественного штамма *A. terreus* Thom № 407 [6].

Исходя из предположения, что штамм не утратил генетически детерминированный признак — способность к сверхсинтезу итаконовой кислоты, а снижение продуктивности культуры обусловлено сужением границ нормы реакции вследствие неблагоприятного

внешнего воздействия, две генерации культуры в жидкой питательной среде на ГКА с целью ускорения времени зарастания пеллет культивировалось с 5 до 30 суток. В результате работ по созданию рабочих культур для посева маточной культуры в серии опытов ускорения синтеза итаконовой кислоты к концу ферментации достигли накопления биологического продукта при модифицированных условиях культивирования. Достижение выхода более 20 г/л за 6 суток в условиях культивирования на ГКА базой для даль-

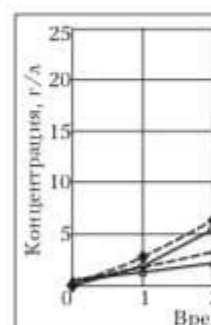
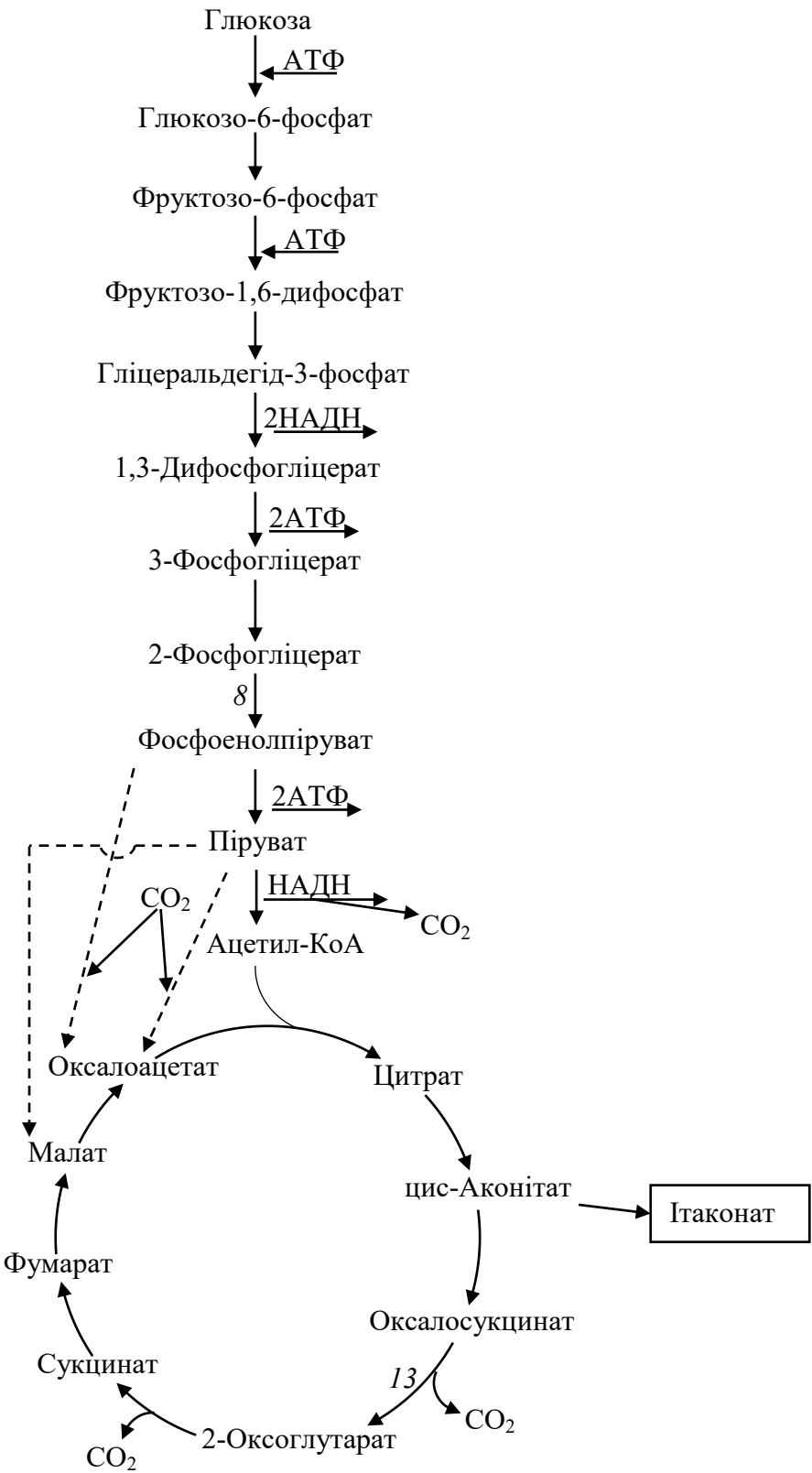


Рис. 3. Динамика накопления итаконовой кислоты и биомассы *A. terreus* в жидкой питательной среде (опыт 1 — сплошная линия, опыт 2 — пунктирная линия)



Ферменти: 1- Гексокіназа [КФ: 2.7.1.1]; 2- Глюкозо-6-фосфатна ізомераза [КФ: 5.3.1.9]; 3- Фосфоглюкіназа (глюкокіназа) [КФ: 2.7.1.11]; 4- фруктозодифосфат альдолаза [КФ: 4.1.2.13]; гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа [КФ: 1.2.1.12]; фосфогліцераткіназа [КФ: 2.7.2.3]; 7- фосфогліцератмутаза [КФ: 5.4.2.12]; 8- енолаза [КФ: 4.2.1.11]; 9- піруваткіназа [КФ: 2.7.1.40]; 10-піруватдегідрогеназа 11-цитратна синтаза [КФ: 2.3.3.1]; 12- аконітат гідратаза [КФ: 4.2.1.3]; 13- ізоцитратдегідрогеназа [КФ: 1.1.1.42]; 14- бета-субодиниця сукциніл-КоА синтетази [КФ: 6.2.1.5]; 15- сукцинатдегідрогеназа [КФ: 1.3.5.1]; 16- фумаратгідратаза, клас II [КФ: 4.2.1.2] 17- малатдегідрогеназа [КФ: 1.1.1.37]; 18 - аконітат декарбоксилаза [КФ: 4.1.1.6]; 19 - фосфоенолпіруват карбоксикіназа (АТФ) [КФ: 4.1.1.49]; 20 – малатдегідрогеназа (декарбоксилювання) [КФ: 1.1.1.39]; 21 – піруват карбоксилаза [КФ: 6.4.1.1];

[Pathway menu](#) | [Organism menu](#) | [Pathway entry](#) | [Download KEGML](#) | [Show description](#) | [User data](#)

Aspergillus flavus

Go

100%

GLYCOLYSIS / GLUCONEOGENESIS

