

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і

мікробіології

Пирог Т.П.

“ 01 ” квітня 20 21 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Підгерської Тетяни Олегівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання лакази культивуванням *Coriolus versicolor*

керівник роботи Карлаш Юрій Васильович, к.т.н., доцент,

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

затвердені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2021 року № 228-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 28.05.2021

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Coriolus versicolor* цільовий продукт:лаказа

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Розділ 1. Характеристика цільового продукту біосинтезу. Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування. Розділ 4. Біосинтез цільового продукту. Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. Розділ 6. Специфікація обладнання. Розділ 7. Опис технологічної схеми. Розділ 8. Контроль виробництва. Розділ 9. Автоматизація ділянки виробництва. Розділ 10. Охорона довкілля.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема одержання лакази культивуванням *Coriolus versicolor* – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема одержання лакази культивуванням *Coriolus versicolor* – 2 аркуші формату А1 та А3. Схема автоматизації ділянки сушіння лакази – 1 аркуш формату А3.

6. Консультанти розділів роботи

| Розділ | Прізвище, ініціали та посада консультанта | Підпис, дата | |
|----------------------------|--|----------------|------------------|
| | | завдання видав | завдання прийняв |
| Розділ 9. Автоматизація | Клименко О.М., доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління | | |
| | | | |
| | | | |

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

| №1 | Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи | Строк виконання етапів роботи | Примітка |
|----|--|-------------------------------|----------|
| 1 | Характеристика цільового продукту біосинтезу | 01.04.2021-02.04.2021 | |
| 2 | Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента | 05.04.2021-06.04.2021 | |
| 3 | Техніко-економічне обґрунтування | 07.04.2021-09.04.2021 | |
| 4 | Біосинтез цільового продукту | 12.04.2021-13.04.2021 | |
| 5 | Обґрунтування вибору технологічної схеми | 14.04.2021-23.04.2021 | |
| 6 | Специфікація обладнання | 26.04.2021-27.04.2021 | |
| 7 | Опис технологічної схеми | 28.04.2021-30.05.2021 | |
| 8 | Контроль виробництва | 04.05.2021-07.05.2021 | |
| 9 | Автоматизація ділянки виробництва | 10.05.2021-12.05.2021 | |
| 10 | Охорона довкілля | 13.05.2021-14.05.2021 | |
| 11 | Оформлення пояснювальної записки | 17.05.2021-20.05.2021 | |
| 12 | Виконання графічної частини проекту | 20.04.2021-28.05.2021 | |
| | | | |

Здобувач

_____ (підпис)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Підгерська Т.О.

_____ (прізвище та ініціали)

Карлаш Ю.В.

_____ (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технології, технологічної та апаратурної схем отримання ферменту лакази з використанням базидіоміцета *Coriolus versicolor* МТСС 138, що синтезує на поживному середовищі з глюкозою та крохмалем 0,78 мг/мл лакази при постійній аерації середовища. Лаказа – фермент, що використовується для відбілювання тканин в текстильній промисловості. Розрахована потужність виробництва становить 76,4 кг на рік.

Технологічна схема процесу біосинтезу ферменту включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів, підготовка та стерилізація піногасника, підготовка спирту для осадження ферменту, підготовка та стерилізація поживного середовища), основний технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу, біосинтез у ферментері об'ємом 2,5 м³, відділення біомаси, концентрування, осадження, фільтрація, висушування, подрібнення, просіювання, стандартизація), а також стадія фасування та пакування і знешкодження відходів, які наведені в технологічній та апаратурних схемах. Технологія одержання ферменту передбачає використання одностадійної схеми культивування глибинним періодичним способом.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, десяти розділів, списку використаних джерел, графічної частини (2 креслення формату А1 та 2 креслення формату А3) та додатків. Загальний обсяг роботи – 148 сторінок, 13 рисунків, 23 таблиці.

Ключові слова: лаказа, відбілювання, тканина, текстильна промисловість, *Coriolus versicolor* МТСС 138, фермент, біосинтез, очищення, центрифугування, осадження, Г10Х.

ЗМІСТ

| | |
|--|----|
| ВСТУП..... | 8 |
| РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ..... | 10 |
| РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА..... | 16 |
| 2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування..... | 16 |
| 2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента..... | 22 |
| 2.3. Таксономічний статус біологічного агента..... | 23 |
| РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ..... | 24 |
| 3.1. Потреба у цільовому продукті..... | 24 |
| 3.2. Розрахунок потужності виробництва..... | 26 |
| 3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера..... | 30 |
| 3.3.1. Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)..... | 31 |
| 3.3.2. Розрахунок об'єму ферментера для біосинтезу лакази.. | 32 |
| 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу. | 33 |
| РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ..... | 37 |
| 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента..... | 37 |
| 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.. | 38 |
| РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ. | 40 |
| 5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу..... | 40 |

| | |
|---|----|
| 5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера..... | 40 |
| 5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря..... | 41 |
| 5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів..... | 44 |
| 5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища..... | 51 |
| 5.1.4.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках..... | 53 |
| 5.1.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі..... | 55 |
| 5.1.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті..... | 57 |
| 5.1.4.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу..... | 59 |
| 5.1.4.5. Розрахунок мікроелементів для вирощування інокуляту..... | 61 |
| 5.1.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника..... | 62 |
| 5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту..... | 64 |
| 5.2.1. Відділення біомаси..... | 65 |
| 5.2.2. Концентрування..... | 66 |
| 5.2.3. Осадження..... | 68 |
| 5.2.4. Фільтрація осаду..... | 69 |
| 5.2.5. Висушування..... | 70 |
| 5.2.6. Подрібнення..... | 71 |
| 5.2.7. Просіювання..... | 72 |

| | |
|---|-----|
| 5.2.8. Стандартизація..... | 73 |
| 5.2.9. Фасування та пакування..... | 74 |
| 5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту..... | 75 |
| 5.4. Підбір технологічного обладнання для доферментаційних стадій..... | 75 |
| 5.4.1. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування та стерилізації поживного середовища..... | 75 |
| 5.5. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях..... | 78 |
| 5.5.1 Центрифугування культуральної рідини..... | 79 |
| 5.5.2. Концентрування розчину цільового продукту методом ультрафільтрації..... | 80 |
| 5.5.3. Осадження ферменту 70 % етанолом..... | 80 |
| 5.5.4. Фільтрування осадженого ферменту на друк-фільтрі.... | 81 |
| 5.5.5. Сушіння осадженого ферменту у вакуум-сушільній шафі..... | 81 |
| 5.5.6. Подрібнення сухого фермента..... | 82 |
| 5.5.7. Просіювання подрібненого сухого фермента..... | 82 |
| 5.5.8. Розрахунок кількості наповнювача (TiO_2) до стандартної активності $A_{ст} = 5000$ при отриманні ферментного препарату в умовних кг..... | 82 |
| 5.5.9. Фасування готового продукту..... | 82 |
| РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ..... | 83 |
| РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ..... | 87 |
| РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА..... | 106 |
| 8.1. Мікробіологічний контроль..... | 106 |

| | |
|---|-----|
| 8.2.Карта постадійного контролю доферментаційних процесів.... | 108 |
| 8.3. Показники росту і синтезу лакази..... | 116 |
| 8.3.1. Концентрація біомаси..... | 116 |
| 8.3.2. Концентрація лакази..... | 116 |
| 8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту..... | 118 |
| 8.4. Показники якості готового продукту..... | 120 |
| 8.4.1. Визначення лаказної активності..... | 120 |
| 8.4.2. Визначення активності лакази в сухому препараті..... | 122 |
| 8.4.3. Визначення вологості готового продукту..... | 122 |
| РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА..... | 124 |
| 9.1. Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формуванням завдання на розробку системи автоматизації..... | 124 |
| 9.2. Опис схеми автоматизації та специфікація засобів автоматизації..... | 126 |
| РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ..... | 128 |
| 10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів..... | 128 |
| 10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва..... | 131 |
| 10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.. | 131 |
| 10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів..... | 133 |
| 10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів..... | 134 |
| 10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів..... | 137 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ..... | 138 |
| ДОДАТКИ..... | 149 |

ВСТУП

Актуальність теми. Виробництво ферментних препаратів у всьому світі є одним з провідних напрямів біотехнології. Ферментні препарати широко використовуються в різних галузях харчової та легкої промисловості, в медицині, сільському господарстві, охороні навколишнього середовища, аналітичних дослідженнях та ін. Тому проблема отримання значної кількості ферментних препаратів, використовуючи відносно прості економічно вигідні технологічні операції, є надзвичайно актуальною. Препарати грибних лаказ використовуються для текстильної, харчової, косметичної та інших галузей промисловості, в органічному синтезі, у виробництві миючих засобів, для створення антимікробних композицій, в імуноферментному аналізі[1].

Легка промисловість є однією з найперспективніших галузей економіки, оскільки забезпечує весь господарський комплекс України. Пріоритетність галузей легкої промисловості для економіки нашої країни зумовлена великою місткістю товарів на внутрішньому ринку. Легка промисловість є галуззю з великими потенційними можливостями. Однією з провідних галузей легкої промисловості є текстильна. Ця галузь займає важливе місце у виробництві суспільного продукту. Розвиток текстильної промисловості має великий вплив на забезпечення конкурентоспроможності вітчизняного виробництва товарів народного споживання[2].

На жаль, сучасні текстильні матеріали та вироби можуть нанести шкоду здоров'ю споживачів при їх використанні. Це пов'язано із застосуванням в технологіях обробки тканин хімічних речовин, що негативно впливають не лише на здоров'я людини, але і на екосистему та спричиняють її забруднення.

| | | | | | | | | |
|------------------|-------------|------------------------|---------------|-------------|---------------------------------|--------------------|-------------|----------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ</i> | | | |
| <i>Зм.</i> | <i>Арк.</i> | <i>№ документа</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | | <i>Лім.</i> | <i>Арк.</i> | <i>Акрушів</i> |
| <i>Розробив</i> | | <i>Підгерська Т.О.</i> | | | <i>Вступ</i> | | | |
| <i>Консульт.</i> | | | | | | | 8 | 148 |
| <i>Керівник</i> | | <i>Карлаш Ю.В.</i> | | | | <i>Кафедра БТМ</i> | | |
| <i>Н. Контр.</i> | | | | | | | | |
| <i>Зав.каф.</i> | | <i>Пирог Т.П.</i> | | | | | | |

Загострення в останні роки екологічних проблем у вітчизняному текстильному виробництві диктує нагальну потребу посилення екологічної спрямованої діяльності не тільки окремих підгалузей і підприємств, але й широкого впровадження в практику їх роботи принципів екологічного маркетингу та екологічного менеджменту[3].

Новизною даної роботи є розробка проекту виробництва ферменту лакази на основі культури *Coriolus versicolor* МТСС 138. Мікроорганізм росте при температурі 28° С, рН –5,0 протягом 144 год. і синтезує фермент, який відрізняється дуже високою каталітичною активністю (82×10^4 МО/л). Така активність була досягнута за рахунок підбору оптимального складу поживного середовища і додавання ароматичного індуктора 2,5-ксилідину та мідного купоросу на 4 день культивування[4]. За рахунок впровадження у в технологію обробки тканин лакази, що синтезована *C.versicolor* МТСС 138 є можливим зменшення використання шкідливих хімічних речовин в текстильній промисловості України так як фермент є екологічно безпечним. Використання лакази підвищує міцність та стійкість оброблюваних тканини. На даний час лаказа в промислових масштабах в Україні не виробляється та не використовується. Впровадження даної технології призведе до формування в нашій країні нового екостилю при виробництві тканин.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ

Лаказа (бензендіол, оксидоредуктаза, (ЕС 1.10.3.2.)) – це оксидаза, до складу якої входить мідь. Фермент окислює субстрати, які багаті електронами, фенольного походження із супутнім зменшенням кисню до води[5].

Лаказа належить до сімейства блакитних мідьвмісних білків, що містять від 1 до 6 атомів міді в молекулі[6].

Більшість лаказ містять у своєму активному центрі чотири атоми міді, які опосередковують окислювально-відновний процес і класифікуються на три групи відповідно до спектроскопічних властивостей:

- мідний тип 1 (Т1) або блакитний;
- тип 2 (Т2) або звичайна мідь;
- тип 3 (Т3) або сполучені двоядерні мідні центри[5].

За рахунок наявності Т1-мідного центру утворюється інтенсивний блакитний колір розчинів ферменту максимально при 600 нм в спектрі поглинання. Т2 – це моноядерний мідний центр, що ніяк не проявляється в спектрі поглинання. Т3 - біядерний мідний центр, містить іони двухвалентної міді, які спарені антиферомагнітно за рахунок гідроксидного містка[7].

Т1 містить 1 атом міді, до складу Т2 також входить 1 атом міді і Т3 включає 2 атома міді. Всі атоми міді мають ступінь окислення 2^+ . Ліганди Т1-центру – це дві амінокислоти гістидина та сульфгідрильна група цистеїну, вони формують тригональну структуру. До складу грибних лаказ, в якості додаткового ліганда Т1-мідного центру, входять також лейцин або фенілаланін. Лігандами Т2 / Т3-кластера є вісім імідазолів гістидину. Для усіх лаказ характерна наявність одинадцяти амінокислот, що беруть участь в зв'язуванні міді, це десять залишків

| | | | | | | | | |
|------------------|-------------|------------------------|---------------|-------------|--|-----------------------|-------------|----------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ</i> | | | |
| <i>Зм.</i> | <i>Арк.</i> | <i>№ документа</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | <i>Розділ 1. Характеристика цільового продукту</i> | <i>Літ.</i> | <i>Арк.</i> | <i>Акрушів</i> |
| <i>Розробив</i> | | <i>Підгерська Т.О.</i> | | | | | <i>10</i> | <i>148</i> |
| <i>Консульт.</i> | | | | | | | | |
| <i>Керівник</i> | | <i>Карлаш Ю.В.</i> | | | | | | |
| <i>Н. Контр.</i> | | | | | | | | |
| <i>Зав.каф.</i> | | <i>Пирог Т.П.</i> | | | | <i>Кафедра БТМ. .</i> | | |

гістидину і один залишок цистеїну[7].

Структура лакази представлена на рис.1.1.

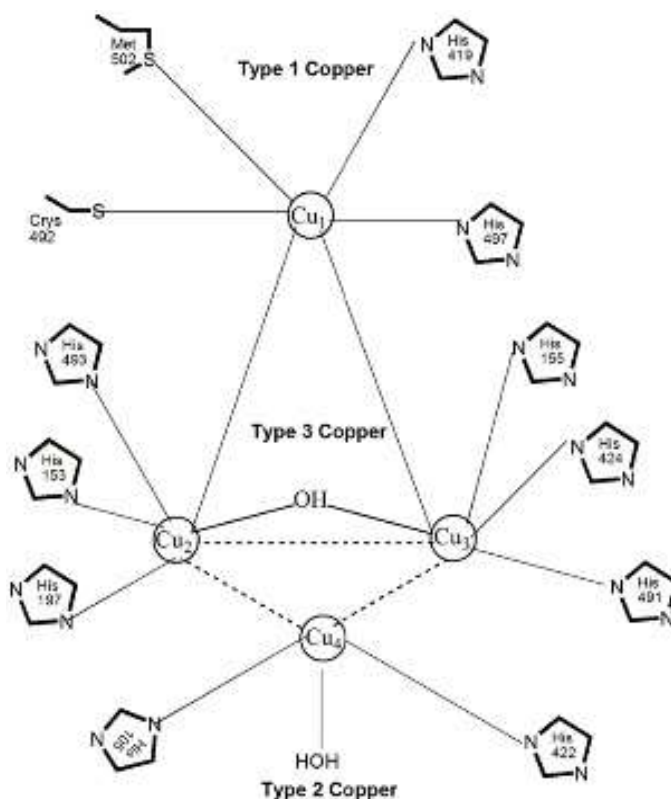


Рис.1.1. Структура мідної координаційної мережі молекули лакази

Оскільки, всі чотири атоми міді повністю окислюються (Cu^{2+}), то через це лаказа може декарбоксилувати, деметилувати фенольну та метаоксифенольну кислоти, які є важливими початковими етапами деградації лігніну.

Субстратна специфічність ферменту може бути значно розширена при використанні медіаторів. Медіатор - це невелика хімічна сполука, яка безперервно окислюється ферментом лакази і згодом відновлюється субстратом. Оскільки субстрат через свої розміри не може потрапити в активний центр лакази, медіатор діє як носій електронів між ферментом і субстратом, тим самим долаючи стеричні перешкоди, які існують між ними[5].

Лакази окислюють велику кількість субстратів, які розділяють на дві групи: донори електрона (фероціанід), донори електрона і протона (феноли і аміни). Типовими субстратами, характерними для більшості відомих лаказ різного походження, є катехол (2-гідроксифенол), 2,6-диметоксифенол, гваякол (2-метоксифенол), *p*-фенілендіамін. Лакази не здатні окисляти тирозин. Більшість лаказ окислюють орто-, мета- і пара-заміщені фенольні сполуки.

Орто-заміщені з'єднання: гваякол, катехол, кавова кислота, пірогалол, протокатехінова кислота та ін. Пара-заміщені з'єднання: гідрохінон, *p*-крезол та ін. Мета-заміщені з'єднання: *m*-фенілендіамін, орцінол, резорцінол і ін. Орто-заміщені сполуки окислюються лаказою з більш високою швидкістю, ніж мета- і пара-заміщені[7].

Деякі іони металів, такі як Hg^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} і Zn^{2+} інгібують лаказну активність, модифікуючи залишки амінокислот або викликаючи конформаційні зміни лаказного глікопротеїну. Жирні кислоти, сульфгідрильні реагенти, гідроксигліцин, дитиотреїтол та глутатіон також є інгібіторами лакази.

Лаказа зустрічається в багатьох грибах, вищих рослинах та бактеріях. Найбільш вивченими вважаються лакази грибів-базидіоміцетів. Цей фермент у великій кількості присутній в грибах білої гнилі. Порівняно з грибковими лаказами, бактеріальні лакази, як правило, більш стійкі при високих значеннях рН та температури. У грибів лакази переважно позаклітинні. Однак, лакази бактерій бувають внутрішньо- та позаклітинними[5].

Молекулярна маса мономерної грибної лакази, переважно, знаходиться в межах 60-110 кДа з 10–50% глікозилювання. До складу вуглеводних компонентів лакази можуть входити арабіноза, маноза, ксилоза, галактоза, глюкоза. Високий вміст вуглеводів у молекулі білка забезпечує термостабільність лакази до 70° С. Глікозилювання також впливає на секрецію та активність ферментів. Температурний оптимум грибних лаказ становить 40-60 ° С. Однак, існують

лакази з більш низьким (25 ° С для лакази *Ganoderma lucidum*) або більш високим значенням оптимуму (≥ 80 ° С для лакази *Marasmius quercophilus*[5,7].

Функції лаказ досить різноманітні. Вони каталізують відновлення молекули кисню до двох молекул води, при цьому оминаючи стадію утворення пероксиду водню. В результаті відбувається окислення широкого спектру субстратів: фенолів і ароматичних амінів, неорганічних сполук[7].

Лакази беруть участь у руйнуванні лігніну, утворенні пігментів у грибкових спорах, у патогенезі рослин та в якості факторів вірулентності грибів, у метаболізмі заліза.

Грибкові лакази відповідають за детоксикацію, плодоношення, спороношення, патогенність (лаказа є патогенним фактором у багатьох захворюваннях, що викликаються грибами) та деградацію лігніну. Гриби білої гнилі мають здатність до деградації лігніну завдяки високій концентрації лакази, яку вони виробляють, і добре розвинених гіфів, що здатні ефективно проникати в клітини рослин[5].

Всі лакази поділяють на такі групи: низько- (350-450 мВ), середньо- (450-550 мВ) і високо-редокспотенціальні (550-850 мВ) ферменти. Високо-редокспотенціальні лакази зустрічаються, зазвичай, у базидіальних грибів. Відносно ОВП лакази в поєднанні з низькою субстратної специфічністю пояснює здатність цих ферментів окислювати широкий спектр стійких субстратів як природного, так і не природного походження[7].

Маючи надзвичайні здібності, лакази виявляються корисними для багатьох процесів, таких як очищення барвників, очищення води, дехлорування та як каталізатор для виготовлення ліків та косметики[6].

Екологічна оцінка показала, що лакази позитивно впливають на екологічне середовище ґрунту і можуть бути використані для його очищення від дихлорфенолу[8].

Лаказу використовують також в якості окислювача під час виготовлення фарби для волосся. Це дає можливість виключити використання пероксиду водню, що має сильний дратівливий ефект на шкірні покриви. Відомий ряд патентів, що захищають рецептури миючих засобів з лаказою чи парою лаказа-медіатор, які входять до їх складу[7].

Лакази широко застосовуються в харчовій промисловості. Наприклад при виробництві вин, фруктових соків і пива, для освітлення, за рахунок видалення поліфенольних сполук. Лаказу застосовують для видалення кисню з готового продукту, при виробництві пива, це призводить до збільшення терміну зберігання готового продукту. При виробництві соків можливе використання лакази як окремо, так і в комплексі з ультрафільтрацією, для отримання освітленого продукту без домішок фенолів. Лаказа застосовують при виробництві хлібобулочних виробів. Фермент забезпечує підвищення міцності і зниження липкості тіста, це покращує його оброблюваність, у готового виробу поліпшується пишність і м'якість. Лаказа відіграє певну роль у стабілізації вина[6-7].

Препарат лакази синтезованої *Trametes (Coriolus) versicolor* – Laccase Daiwa Y120 виробник Amano Enzyme USA Co. Ltd. (США) використовується для покращення якості деяких напоїв[9].

В біотехнологіях використовують такі переваги лаказ, як високий ОВП, широка субстратна специфічність, стабільність, відсутність необхідності використання дорогих кофакторів. А використання редокс-медіаторів робить практичне застосування лаказ більш привабливим: пара лаказа-медіатор зазвичай має більш високий ОВП, ніж у лакази[7].

Виробником ферменту лаказа є торгова компанія Xi'an Saying Bio - Technology Co., Ltd. (Китай). Лаказа має вигляд білого порошку, активність ферменту 2000-10000 МО/г[10].

З лакази вперше було розроблено екологічно чистий відбілюючий засіб для використання в целюлозно-паперовій промисловості[5].

Препарат на основі лакази синтезованої *T. versicolor* Lignozym-process (виробник Lignozym GmbH, Німеччина) використовується в целюлозно-паперовій промисловості для делігніфікації і відбілювання[9].

Препарат на основі лакази Deni Lite II (Novo Nordisk Co) використовується для відбілення тканин у текстильній промисловості[11].

В Данії, компанія «Novozymes» випускає на основі лакази комерційні препарати призначені для відбілювання та обробки текстильних виробів, делігніфікації паперової пульпи[12].

Отже, лакази мають широке застосування у різних біотехнологічних сферах. Однак низька стабільність вільних ферментів обмежує їх промислове використання. Зараз залишається проблемою розробка ефективних методів збереження та підвищення ферментативної активності, що є важливим критерієм їх використання[13].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Лаказа вперше була виявлена в сокові японського лакового дерева *Rhus vernicifera* та описана Бертраном як металовмісна оксидаза у 1985 р. Лакази виробляються комахами, вищими рослинами, грибами та бактеріями[14].

Лаказна активність проявляється у великої кількості мікроорганізмів, однак найкращими продуцентами лакази є саме гриби білої гнилі.

Загальну характеристику технологічних особливостей одержання лакази з використанням різних продуцентів наведено у *табл. 2.1*.

Funalia trogii ТИ 035 виробляє лаказу з найнижчою активністю $51,340 \times 10^3$ МО/л, а *Trametes (Coriolus)*[15] МТСС 138 виробляє фермент з досить високою активністю 82×10^4 МО/л. Фермент із високою активністю також синтезує *T. pubescens* МВ 89 ($74,3 \times 10^4$ МО/л), однак недоліком цього мікроорганізму є тривалий час культивування – 692 год, порівняно із *F. trogii* ТИ 035 (336 год) та *C. versicolor* МТСС 138 (144 год).

| | | | | | | | | |
|------------------|-------------|------------------------|---------------|-------------|---|--------------------|-------------|----------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ</i> | | | |
| <i>Зм.</i> | <i>Арк.</i> | <i>№ документа</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | | | | |
| <i>Розробив</i> | | <i>Підгерська Т.О.</i> | | | <i>Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i> | <i>Літ.</i> | <i>Арк.</i> | <i>Акрушіє</i> |
| <i>Консульт.</i> | | | | | | | 16 | 148 |
| <i>Керівник</i> | | <i>Карлаш Ю.В.</i> | | | | <i>Кафедра БТМ</i> | | |
| <i>Н. Контр.</i> | | | | | | | | |
| <i>Зав.каф.</i> | | <i>Пирог Т.П.</i> | | | | | | |

Таблиця 2.1

**Особливості одержання ферменту лакази за допомогою *T. pubescens* МВ 89 , *F. trogii* ТИ 035, *C. versicolor*
МТСС 138**

| Біологічний агент | Склад поживного середовища, г/л | Тривалість культивування, год | Активність ферменту, 10 ⁻⁴ МО/л | Особливості процесу біосинтезу | Література |
|---------------------------------|--|-------------------------------|--|---|---|
| <i>Trametes pubescens</i> МВ 89 | Глюкоза – 40; Пептон – 10; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 1; Через 124 год додають CuSO ₄ ·5 H ₂ O – 0,5. | 692 | 74,3 | температура 25° С, рН зменшується від 5,0 до 3,5. 100 об / хв. Дробне підживлення: через 302 год додають глюкозу в кількості 3,0 мл/год до кінця культивування (320 г/л) | Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., Haltrich D. Increased production of laccase by the wood degrading basidiomycete <i>Trametes pubescens</i> . <i>Enzyme and Microbial Technology</i> . 2002, 30: 529-536. (додаток 1) |
| <i>Funalia trogii</i> ТИ 035 | Глюкоза – 10,0; Пептон – 15,0; KH ₂ PO ₄ – 0,6; K ₂ HPO ₄ – 0,4; MgSO ₄ · – 0,5; MnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,05; ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,001; FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,0005; CuSO ₄ ·5H ₂ O – 0,15. | 336 | 5,1 | температура 26-28 °С, при рН – 6,0 180 об/хв | Клепиков А.А., Шамцян М.М. Скрининг и изучение базидиальных грибов в качестве продуцентов лакказ. <i>Известия СПбГТИ(ТУ)</i> . 2014, 23: 39-42 (додаток 2) |

Продовження табл. 2.1

| | | | | | |
|--|--|------------|-------------|--|--|
| <p><i>Coriolus versicolor</i> МТСС 138</p> | <p>Крохмаль – 15; Глюкоза – 10; Дріжджовий екстракт – 2,5; D, L-фенілаланін 0,15; Аденін – 0,0275; КН₂РО₄ – 1 ; MgSO₄·7H₂O – 0,5; CaCl₂ – 0,01; FeSO₄·7H₂O – 0,01; MnSO₄·4H₂O – 0,001; ZnSO₄·7H₂O – 0,001; CuSO₄·5H₂O – 0,001 2,5-ксилідин – 0,12</p> | <p>144</p> | <p>82,0</p> | <p>температура 28 ° C рН – 5 150 об/хв</p> | <p>Revankar M. S., Lele S.S. Increased production of extracellular laccase by the white rot fungus <i>Coriolus versicolor</i> МТСС 138. <i>World Journal of Microbiology & Biotechnology</i>. 2006,22:921-926. doi:10.1007/s11274-006-9136-2 (додаток 3)</p> |
|--|--|------------|-------------|--|--|

Для подальшого вибору найбільш ефективного біологічного агента, необхідно порівняти вартість 1 л поживного середовища, яка представлена в табл. 2.2

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування *T. pubescens* MB 89, *F. trogii* ТИ 035, *C. versicolor* МТСС 138

| Штам | Компоненти | Конц., компоненту поживного середовища, г/л | Ціна компонен ту, грн/кг | Вартість компонентів середовища для 1 л, грн/л | Джерело інформації (1,2,3,4...)* |
|--|--------------------------------------|---|--------------------------------|--|--|
| <i>Trametes pubescens</i> MB 89 | Глюкоза | 40 | 30 | 1,2 | 1 |
| | Пептон | 10 | 750 | 7,5 | 1 |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1 | 65 | 0,065 | 2 |
| | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,5 | 65 | 0,0325 | 3 |
| Вартість 1 л середовища – 8,8грн | | | | | |
| <i>Funalia trogii</i> ТИ 035 | Глюкоза | 10 | 30 | 0,3 | 1 |
| | Пептон | 15 | 750 | 11,25 | 1 |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,6 | 60 | 0,036 | 2 |
| | K ₂ HPO ₄ | 0,4 | 72 | 0,0288 | 2 |
| | MgSO ₄ | 0,5 | 65 | 0,025 | 2 |
| | MnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,05 | 153 | 0,00765 | 3 |
| | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,001 | 80 | 0,00008 | 2 |
| | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,0005 | 25 | 0,0000125 | 2 |
| | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,15 | 65 | 0,00975 | 3 |
| Вартість 1 л середовища – 11,61 грн | | | | | |
| <i>Coriolus versicolor</i> МТСС 138 | Крохмаль | 15 | 24 | 0,36 | 2 |
| | Глюкоза | 10 | 30 | 0,3 | 1 |
| | Дріжджовий екстракт | 2,5 | 1632 | 4,08 | 4 |
| | D, L-фенілаланін | 0,15 | 2000 | 0,3 | 2 |
| | Аденін | 0,0275 | 390 | 0,010725 | 5 |
| | KH ₂ PO ₄ | 1 | 60 | 0,06 | 2 |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,5 | 65 | 0,03 | 2 |
| | CaCl ₂ | 0,01 | 13 | 0,00013 | 2 |
| | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,01 | 25 | 0,00025 | 2 |
| | MnSO ₄ ·4H ₂ O | 0,001 | 153 | 0,000153 | 3 |
| | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,001 | 80 | 0,00008 | 2 |
| | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,001 | 65 | 0,000065 | 3 |
| | 2,5-ксилідин | 0,12 | 600 | 0,072 | 6 |
| Вартість 1 л середовища – 5,22 грн | | | | | |

Примітка. - * ціни наведено станом на 5 лютого 2020 року.

1. <https://www.systopt.com.ua>
2. <https://prom.ua>
3. <https://flagma.ua/>
4. <http://agar.com.ua/>
5. <https://www.alibaba.com>
6. <https://www.sigmaaldrich.com/>

Проаналізувавши дані *табл. 2.2*, можна сказати, що *C. versicolor* МТСС 138 росте на найдешевшому поживному середовищі (5,22 грн) в порівнянні з іншими продуцентами лакази. Такий мікроорганізми як *T. pubescens* МВ 89 культивується на дорожчому середовищі (8,8 грн.). Найбільш дороговартісним виявилось середовище для вирощування *F. trogii* ТИ 035 – 11,61 грн.

Для остаточного результату у виборі біологічного агента на заключному етапі потрібно скласти узагальнюючу *табл. 2.3*, де розраховується умовна вартість у грн за 10^4 МО активності цільового продукту – лакази.

Таблиця 2.3

Умовна вартість МО активності лакази при культивуванні різних штамів

| Біологічний агент | Вартість 1 л середовища, грн/л | Активність цільового продукту, 10^4 МО/л | Умовна вартість продукту, грн/ 10^4 МО активності | Тривалість культивування, год | Продуктивність штаму за годину, МО/год |
|-------------------------------------|--------------------------------|--|---|-------------------------------|--|
| <i>Trametes pubescens</i> МВ 89 | 8,8 | 74,3 | 0,12 | 692 | $10,737 \times 10^2$ |
| <i>Funalia trogii</i> ТИ 035 | 11,61 | 5,1 | 2,29 | 336 | $1,528 \times 10^2$ |
| <i>Coriolus versicolor</i> МТСС 138 | 5,21 | 82,0 | 0,06 | 144 | $56,944 \times 10^2$ |

Підсумовуючи всі попередні обрахунки та дані наведені в таблицях, можна зробити висновок про те, що найефективнішим продуцентом лакази є *C. versicolor* МТСС 138. Цей мікроорганізм росте на найдешевшому поживному середовищі (5,22 грн/л) і синтезує фермент з найвищою активністю (82×10^4 МО/л). Його продуктивність перевищує інші мікроорганізми, при цьому умовна вартість МО активності лакази складає (0,06 грн за 10^4 МО), що є значно нижчою у порівнянні з іншими продуцентами.

Отже, за основу розроблення технології отримання лакази вибираємо штам *C. versicolor* МТСС 138 із наступним складом середовища, г/л:

- Крохмаль – 15;
- Глюкоза – 10;
- Дріжджовий екстракт – 2,5;
- D , L–фенілаланін – 0,15;
- Аденін – 0,0275;
- KH_2PO_4 – 1 ;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5;
- CaCl_2 – 0,01;
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01;
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,001;
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001;
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,001;
- 2,5-ксилідин – 0,12;
- Вода – до 1 л.

Оптимальний діапазон рН для культивування 5,0; температура – 28°C ;

Час культивування – 144 год[4].

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

C. versicolor МТСС 138 – це базидіальний гриб, який добре культивується на щільних поживних середовищах з утворенням густого розгалуженого, септованого міцелію, з численними пряжками одиночного типу. На сусло-агарі – штам володіє помірним зростанням; формує присадкуватий шкірястий повітряний міцелій з яскраво вираженими концентричними колами; край колонії рівний, злегка піднятий. Під час мікроскопіювання можна побачити міцелій септований, тонкий, незабарвлений з пряжками[16].

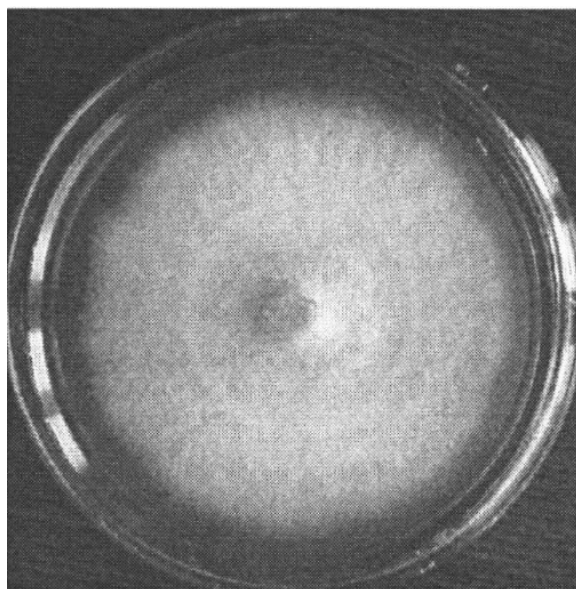


Рис.2.1. C. versicolor на щільному середовищі

Генеративні гіфи важко помітні, тонкостінні, септовані, з пряжками, 2-4 мкм в діаметрі. Скелетні гіфи товстостінні, не розгалужені, не септовані, довгі, 4-6 мкм в діаметрі. Базидії довжиною 10-15 мкм і шириною 4-5 мкм. Спори циліндричні, гаплоїдні, довжиною 5,5-6,0 мкм і шириною 1,5-2,5 мкм, гладенькі[17].

Встановлено, що ріст грибів у глибинній культурі найбільш інтенсивно відбувається у вигляді дрібнодисперсної форми міцелію (пульпоподібної). Такий ріст характерний для грибів при дотриманні оптимальних умов культивування.



Рис.2.2. Скануюча електронна мікроскопія міцелія *C. versicolor* (x1500)

При глибинному культивуванні штамів *C. versicolor* спостерігається характерний дрібноглобулярний ріст у вигляді кульок гладеньких або з ворсинками. Розмір кульок варіює в межах 0,1—0,8 см залежно від штаму та середовища.

Діапазон рН становить від 4 – 6. Оптимальне рН – 4,2– 5,5[18]. Оптимальна температура становить 28° С.

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Домен: Еукаріоти (*Eukaryota*);

Царство: Гриби (*Fungi*);

Відділ: Базидіомікотові (*Basidiomycota*);

Клас: Агарикоміцети (*Agaricomycetes*);

Порядок: Поліпоральні (*Polyporales*);

Родина: Поліпорові (*Polyporaceae*);

Рід: Траметес (*Trametes*);

Вид: *Trametes versicolor*.

Найбільш поширеним синонімом або застарілою назвою *Trametes versicolor*, що часто використовується є *Coriolus versicolor*. Отже це різні назви одного продуцента[19].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Виробництво ферментних препаратів є одним з провідних напрямків у розвитку біотехнології в усьому світі. Ферментні препарати знаходять широке застосування в різних галузях промисловості. У зв'язку з цим виникає завдання отримання значних кількостей ферментних препаратів з використанням досить простих технологічних операцій.

Застосування лакази перспективно в багатьох галузях промисловості:

- текстильна (екологічно чисте відбілювання тканин);
- целюлозно-паперова (делігніфікація паперової пульпи);
- виробництво сучасних екологічно чистих деревно-волокнистих плит;
- тонкий органічний синтез;
- харчова;
- косметична (фарба для волосся, відбілююча зубна паста);
- виробництво миючих засобів (відбілюючий агент);
- енергетика (кисневий електрод біопаливного елемента);
- синтез лікарських препаратів (наприклад, антибіотиків);
- в біосенсорах (наприклад, аналіз фенольних сполук, включаючи лігніни, в стічних водах промислових підприємств, визначення антиоксидантного статусу вин);
- іммуноферментний аналіз (в якості фермента-маркера)[1,20].

Лакази були інтегровані у вже існуючі процеси, такі як відбілювання і фарбування волокон в текстильній промисловості. Так як лакази здатні знебарвлювати, їх використання в цій галузі постійно зростає.

| | | | | | | | | |
|------------------|-------------|------------------------|---------------|-------------|---|---------------------|-------------|---------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ</i> | | | |
| <i>Зм.</i> | <i>Арк.</i> | <i>№ документа</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | | | | |
| <i>Розробив</i> | | <i>Підгерська Т.О.</i> | | | <i>Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування</i> | <i>Літ.</i> | <i>Арк.</i> | <i>Акруїв</i> |
| <i>Консульт.</i> | | | | | | | 24 | 148 |
| <i>Керівник</i> | | <i>Карлаш Ю.В.</i> | | | | <i>Кафедра БТМ-</i> | | |
| <i>Н. Контр.</i> | | | | | | | | |
| <i>Зав.каф.</i> | | <i>Пирог Т.П.</i> | | | | | | |

На жаль, на сьогодні в Україні не існує технології синтезу лакази. В нашій країні фермент практично не використовується. Лаказу синтезують лише за кордоном. В промисловості для делігніфікації і відбілювання використовується препарат на основі лакази синтезованої *Trametes (Coriolus) versicolor* Lignozym-process (виробник Lignozym GmbH, Німеччина)[9].

Препарат Déni Lite II (Novo Nordisk Co) використовується для відбілювання бавовняних тканин в текстильній промисловості[11].

Фірма «Novozymes» (Данія) випускає на основі лакази комерційні препарати призначені для відбілювання та обробки текстильних виробів[12].

Легка промисловість є провідною галуззю економіки України.

Основною галуззю текстильної промисловості є бавовняна, на яку приходиться майже 50% усіх тканин, що виробляються[2].

Сучасні текстильні матеріали та вироби є продуктами негативної дії комплексу хімічних речовин, виходячи з природи сировини та особливостей технологічних процесів їх виробництва. Пошук альтернативних екологічно безпечних технологій основних етапів оздоблювального виробництва (особливо відбілювання, фарбування) приведе до формування в Україні ринку екотекстилю[3].

Зараз є досить поширеними тверді гіпохлорити (MeClO), що широко застосовуються як окисники для відбілювання в усьому світі. Водні розчини гіпохлоритів натрію та кальцію використовують для відбілювання целюлози і текстильних матеріалів[21].

Їх перевагою є низька вартість. Проте, цей метод відбілювання має ряд недоліків, наприклад, може викликати жовтизну тканини, а також зменшувати її міцність[9].

Вони належать до речовин високого класу небезпеки, що помітно знижує екологічність. Особливо токсичним є гіпохлорит натрію. Подвійне оброблення гіпохлоритом руйнує целюлозу та забруднює стічні води. Перспективним

напрямок у створенні екологічно чистих технологій є повне виключення хлоромістких речовин під час підготовки текстильних матеріалів[22].

До складу відбілюючих засобів входить 2-3% амідів і NaOH, що також забруднюють стічні води[23].

Застосування лакази в текстильній галузі підприємств в Україні дозволить створити екологічно безпечне виробництво та замінити шкідливі хімікати.

Крім відбілювання, лаказа є важливим «інструментом» для поліпшення властивостей тканини. Так, лаказу використовуються для прикріплення функціональних молекул до текстильних волокон вовни та бавовни, покращуючи цим їх водовідштовхувальні властивості, збільшуючи стійкість тканини до усадки, міцність на розрив і зменшуючи мнучість тканини. Крім того, доведено, що тканини, оброблені лаказою в присутності ферулової кислоти або гідрохінона, проявляють антибактеріальні властивості[9].

3.2. Розрахунок потужності виробництва

В таблиці 3.1 наведено дані по виробництву бавовняних тканин по областях України.

Таблиця 3.1

Виробництво бавовняних тканин по областях України

| № | Назва області | Вид виробу | Потужність виробництва, тон * | Література |
|---|---------------|-----------------------------|-------------------------------|------------|
| 1 | Дніпровська | білизна постільна бавовняна | 587,085 | 1 |
| 2 | Чернівецька | білизна постільна бавовняна | 414,9 | 2 |
| 3 | Закарпатська | білизна постільна бавовняна | 364,500 | 3 |
| 4 | Львівська | білизна постільна бавовняна | 37 | 4 |
| 5 | Харківська | білизна постільна бавовняна | 25,037 | 5 |
| 6 | Черкаська | білизна постільна бавовняна | 23,226 | 6 |

| | | | | |
|----|-------------------|-----------------------------|--------|----|
| 7 | Київська | білизна постільна бавовняна | 20 | 7 |
| 8 | Житомирська | білизна постільна бавовняна | 16 | 8 |
| 9 | Сумська | білизна постільна бавовняна | 14 | 9 |
| 10 | Запорізька | білизна постільна бавовняна | 13,786 | 10 |
| 11 | Івано-Франківська | білизна постільна бавовняна | 13 | 11 |
| 12 | Хмельницька | білизна постільна бавовняна | 8,212 | 12 |
| 13 | Полтавська | білизна постільна бавовняна | 7 | 13 |
| 14 | Тернопільська | білизна постільна бавовняна | 3,688 | 14 |

Примітка.

Потужність виробництва наведена за 2018 рік.

1. <http://www.dneprstat.gov.ua/>
2. <https://www.chernigivstat.gov.ua/>
3. <http://www.uz.ukrstat.gov.ua/>
4. <https://www.lv.ukrstat.gov.ua/>
5. <http://kh.ukrstat.gov.ua/>
6. <http://www.ck.ukrstat.gov.ua/>
7. <http://kyivobl.ukrstat.gov.ua/content/>
8. <http://www.zt.ukrstat.gov.ua/>
9. <http://sumy.ukrstat.gov.ua/>
10. <http://www.zp.ukrstat.gov.ua/>
11. <http://www.ifstat.gov.ua/>
12. <http://www.km.ukrstat.gov.ua/>
13. <http://www.pl.ukrstat.gov.ua/>
14. <http://www.te.ukrstat.gov.ua/>

Проаналізувавши дані таблиці 3.1, можна зробити висновок про те, що найбільшими виробниками білизни постільної бавовняної є підприємства Дніпровської, Чернівецької та Закарпатської областей.

Розрахуємо кількість води та лакази для забезпечення підприємств по областях України відбілюючим засобом.

Для розрахунку кількості води для відбілюючого засобу на область підставляємо дані у формулу:

$$V_{\text{відб.зас.}} = P_{\text{вт}} \times V_{\text{в}}$$

де $P_{\text{вт}}$ – це потужність виробництва тканин, тонни;

$V_{\text{в}}$ – витрати води для відбілювання л/кг.

Для розрахунку кількості лакази для відбілюючого засобу на область підставляємо дані у формулу:

$$L_{\text{об.}} = L \times V_{\text{відб.зас.}}$$

де L – кількість лакази для відбілювання 1 кг тканин;

$V_{\text{відб.зас.}}$ - кількості води для відбілюючого засобу на область.

Таблиця 3.2

Потреба лакази для відбілювання білизни постільної бавовняної

| № | Назва області | Потужність виробництва тканин, тонн | Кількість лакази для відбілюючого засобу, мг/л* | Витрати води для відбілювання, л/кг** | Кількість води для відбілюючого засобу на область, л | Кількість лакази для відбілюючого засобу на область, кг |
|----------------|-------------------|-------------------------------------|---|---------------------------------------|--|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 2 | Дніпровська | 587,1 | 1 | 50 | 29 355 000 | 29,355 |
| 3 | Чернівецька | 414,9 | 1 | 50 | 20 745 000 | 20,745 |
| 4 | Закарпатська | 364,5 | 1 | 50 | 18 225 000 | 18,225 |
| 5 | Львівська | 37 | 1 | 50 | 1 850 000 | 1,85 |
| 6 | Харківська | 25 | 1 | 50 | 1 250 000 | 1,25 |
| 7 | Черкаська | 23,2 | 1 | 50 | 1 160 000 | 1,16 |
| 8 | Київська | 20 | 1 | 50 | 1 000 000 | 1 |
| 9 | Житомирська | 16 | 1 | 50 | 800 000 | 0,8 |
| 10 | Сумська | 14 | 1 | 50 | 700 000 | 0,7 |
| 11 | Запорізька | 13,8 | 1 | 50 | 690 000 | 0,69 |
| 12 | Івано-Франківська | 13 | 1 | 50 | 650 000 | 0,65 |
| Всього: | | 1 528,5 | | | 76 425 000 | 76,425 |

Примітка: для розрахунку потреби у лаказі взята частина областей з таблиці 3.1.

«*» - інформацію взято з літературного джерела[24].

«**» - інформацію взято з літературного джерела [23]

Отже загальна потреба в лаказі для показаних в таблиці 3.2. областей складає 76,425 кг на рік.

Як стандартний препарат приймаємо суху лаказу компанії Zhuo Zhou Wen Xi Import and Export Co., Ltd. (Хебей, Китай), що використовується як текстильно-допоміжна речовина із стандартною активністю $A_{ст} = 5\ 000$ од/г [25]. Кількість даного препарату визначається в умовних одиницях маси (умов. кг тощо) із визначеною стандартною активністю.

Для розрахунків потужності виробництва необхідно знати концентрацію лакази, яку синтезує культура *Coriolus versicolor* МТСС 138. Також для подальших розрахунків потрібно знати концентрацію біомаси. Оскільки, цих даних не наведено в джерелі [4], то розраховуємо їх, беручи за основу джерело [26], де наведено культивування *Trametes pubescens* МВ 89, оскільки вони схожі за морфологічними ознаками і належать до одного роду *Coriolus (Trametes)*[27-28].

Культура *T. pubescens* МВ 89 [26] синтезує лаказу з активністю $A_{кр3}=740$ од/мл. Концентрація ферменту в культуральній рідині становить $P_{кр3}=0,7$ мг/мл, а концентрація біомаси $X_{кр} = 10$ г/л. Час культивування – 600 год. Тоді питома активність становить:

$$A_{п3} = A_{кр2} / P_{кр2} = 740/0,7 = 1057 \text{ Од/мг}$$

Для культури *C. versicolor* МТСС 138 при активності лакази в культуральній рідині [4] $A_{кр1} = 820$ Од/мл концентрація лакази в культуральній рідині складе:

$$P_{кр1} = 820 \times 0,7 / 740 = 0,78 \text{ мг/мл}$$

Питома активність:

$$A_{п1} = A_{кр1} / P_{кр1} = 820/0,78 = 1051 \text{ Од/мг}$$

Концентрацію біомаси приймемо таку саму, як і для *T. pubescens* МВ 89 $X_{кр1} = 10$ г/л.

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

Згідно ТЕО потреба в лаказі складає $G_{нд} = 76,425$ умов. кг із стандартною активністю $A_{ст} = 5000$ Од/г. За умовами замовника цю кількість лакази потрібно виробити за $T_{рд} = 68$ днів. За даними наведеними вище максимальний синтез лакази ($P_{кр} = 0,78$ г/л) досягається за $T_{ф} = 144$ години культивування [4].

Відповідно до нормативно-технічної документації вміст сухих речовин в готовому продукті $CP_{гп}$ має складати не менше 90% із ступенем очищення – 90%.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані:

1. Час циклу роботи ферментера:

$$T_{цф} = T_{ф} + T_{по}$$

$$T_{цф} = 144 + 5 = 149 \text{ год,}$$

де $T_{по}$ – час підготовчих операцій: миття та огляд апарату – 0,5 год; перевірка на герметичність – 0,5 год; підігрів апарату – 0,5 год; стерилізація апарату – 1 год; охолодження апарату – 0,5 год; завантаження середовища – 0,5 год; стерилізація середовища – 0,5 год; охолодження середовища та засів – 1 год.

2. Коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1-1,5) $K_1 = 1,1$.

3. Коефіцієнт заповнення ферментера, частка, (0,5 – 0,65); приймаємо $K_{зф} = 0,6$;

4. Коефіцієнт заповнення посівного апарата, частка $K_{па} = 0,6$;

5. Коефіцієнт заповнення посівного апарата (інокулятора), частка $K_{ін} = 0,6$;

6. Коефіцієнт заповнення колб, частка $K_{кол} = 0,2$.

7. Коефіцієнт заповнення збірника, частка (0,7-0,8) $K_{зб} = 0,7$.

8. Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{св} = 0,85$.

9. Сумарні втрати активності ферменту при виділенні готового продукту приймаємо, частка, $E_a = 0,77$.

10. Кількість посівного матеріалу для виробничого ферментеру, частка (0,05-0,1) $X_{вф} = 0,1$.
11. Кількість посівного матеріалу для посівного апарату, частка (0,02-0,1) $X_{па} = 0,1$;
12. Кількість посівного матеріалу для інокулятора, частка (0,02-0,1) $X_{ін} = 0,1$.
13. Кількість посівного матеріалу для качалочних колб, частка (0,02-0,1) $X_{кол} = 0,1$.
14. Втрати культуральної рідини при біосинтезі, частка (0,1- 0,2) $E_{ф} = 0,15$.
15. Втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в посівному апараті, частка (0,1- 0,2) $E_{па} = 0,1$.
16. Втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в інокуляторі, частка (0,05- 0,1) $E_{ін} = 0,1$.

3.3.1. Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів).

1. Кількість ум. кг ферменту/цикл:

$$G_{цкy} = G_{нт} \times T_{ц} / (24 \times T_{рд})$$

$$G_{цкy} = 76,425 \times 149 / (24 \times 68) = 6,98$$

де $G_{нт}$ – річна потужність підприємства, ум.кг/рік;

$T_{ц}$ – час виробничого циклу, год;

$T_{рд}$ – кількість робочих днів у рік.

2. Кількість одиниць активності ферменту, що знаходяться в 1 умовному кг з врахуванням втрат активності при виділенні за цикл Од лакази, Од/кг

$$A_{цкy} = A_{ст} \times 1000$$

$$A_{цкy} = 5\,000 \times 1000 = 5 \times 10^6$$

де $A_{ст}$ – стандартна активність препарату, од/г.

3. Кількість одиниць активності ферменту в культуральній рідині з врахуванням втрат активності при виділенні, Од/кг

$$A_{крт} = A_{кр} \times 10^6 (1 - E_a) / P_{кр}$$

$$A_{крт} = 820 \times 10^6 (1-0,77)/0,78 = 2,4 \times 10^8$$

де $A_{кр}$ – активність препарату в культуральній рідині, од/мл;

E_a – сумарні витрати активності фермента при виділенні;

$P_{кр}$ – концентрація ферменту в культуральній рідині, кг/м³.

4. Кількість товарного ферменту за цикл, з урахуванням втрат при виділенні, тов. кг/цикл

$$G_{цкт} = A_{цкy} \times G_{цкy} / A_{крт}$$

$$G_{цкт} = 5 \times 10^6 \times 6,98 / 2,4 \times 10^8 = 0,145$$

5. Об'єм культуральної рідини, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат при виділенні $E_{св}$, м³

$$V_{кр} = K_1 \times G_{цкт} \times CP_{гп} / P_{кр} (1 - E_{св})$$

$$V_{кр} = 1,1 \times 0,145 \times 0,9 / 0,78 (1 - 0,85) = 1,150$$

де K_1 – коефіцієнт запасу (витрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій) (1,1-1,5);

$CP_{гп}$ – кількість сухих речовин в готовому продукті, частка (0,9-0,95);

$E_{св}$ – сумарні витрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат по стадіям виділення готового продукту), частка.

6. Кількість циклів (партій) за рік

$$N_{цк} = G_{нт} / G_{цкy}$$

$$N_{цк} = 76,425 / 6,98 = 10,9$$

Отже, кількість циклів за рік становить 11.

3.3.2. Розрахунок об'єму ферментера для біосинтезу лакази.

Робочий об'єм ферментера становить:

$$V_{ф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 1,150 / 0,85 = 1,353 \text{ м}^3 = 1\,353 \text{ л.}$$

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментера при заданому $K_{ф}$, л

$$V_{фг} = V_{ф} / K_{ф} = 1\,353 / 0,6 = 2\,255 \text{ л}$$

У додатку знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер.

Оскільки в таблиці «Технічних характеристик ферментерів» такий відсутній, вибираємо ферментер геометричний об'єм якого 2 500 л або 2,5 м³.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного з таблиці ферментера, частка, $K_{фг}$

$$K_{фг} = V_{ф} / (N_{ф} \times V_{фг}) = 1\ 353 / 2\ 500 = 0,54$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

1) Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері, геометричним об'ємом 2,5 м³ (з барботером та з мішалкою, з коефіцієнтом заповнення 0,54).

Робочий об'єм ферментера ($V_{роб}$) визначають за формулою:

$$V_{роб} = V_{г.ф} \times K_{зап}$$

де $V_{г.ф}$ – геометричний об'єм ферментера;

$K_{зап}$ – коефіцієнт заповнення, 0,54

$$V_{роб} = 2\ 500 \times 0,54 = 1\ 350 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 5-10 % від об'єму поживного середовища. Приймаємо $X_{пм1} = 10\%$ або 0,1 частки.

Робочий об'єм ферментера $V_{роб1}$ складається з об'єму поживного середовища $V_{пс1}$ та об'єму посівного матеріалу $V_{пм1}$. З врахуванням дози посівного матеріалу $X_{пм1}$ робочий об'єм ферментера $V_{роб1}$ складе:

$$V_{роб1} = V_{пс1} + V_{пс1} \cdot X_{пм1}$$

Звідси, об'єму поживного середовища $V_{пс}$ буде:

$$V_{пс1} = V_{роб1} / (1 + X_{пм1}) = 1\ 350 / (1 + 0,1) = 1\ 227,3 \text{ л}$$

а об'єм посівного матеріалу $V_{пм1}$ складе:

$$V_{пм1} = V_{роб1} - V_{пс1} = 1\ 350 - 1\ 227,3 = 122,7 \text{ л}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати для засіву ферментера під час культивування мікроорганізмів у посівному апараті з робочим об'ємом $V_{роб2}$ з

врахуванням втрат при вирощуванні посівного матеріалу за рахунок краплевиносу $E_{па2} = 10\%$.

$$V_{роб2} = V_{пм1} / (1 - E_{па2}) = 122,7 / (1 - 0,1) = 136,3 \text{ л}$$

Найближчий за об'ємом посівний апарат має геометричний об'єм $V_{гпа} = 250$ л. Тоді коефіцієнт заповнення апарату складе:

$$K_{зап} = V_{роб2} / V_{гпа} = 136,3 / 250 = 0,55$$

що в межах прийнятого діапазону для посівних апаратів з барботером та мішалкою ($K_{зап} = 0,5-0,65$).

2) Для отримання посівного матеріалу в посівному апараті з робочим об'ємом $V_{роб2}$ необхідно приготувати наступну кількість поживного середовища $V_{пс2}$ з врахуванням дози посівного матеріалу $X_{пм2} = 10\%$ або 0,1 частки.

$$V_{пс2} = V_{роб2} / (1 + X_{пм2}) = 136,3 / (1 + 0,1) = 123,9 \text{ л,}$$

а об'єм посівного матеріалу $V_{пм2}$ складе:

$$V_{пм2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 136,3 - 123,9 = 12,4 \text{ л}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування мікроорганізмів в інокуляторі з робочим об'ємом $V_{роб3}$ з врахуванням втрат при вирощуванні посівного матеріалу за рахунок краплевиносу $E_{па3} = 10\%$.

$$V_{роб3} = V_{пм2} / (1 - E_{па3}) = 12,4 / (1 - 0,1) = 13,77 \text{ л}$$

Найближчий за об'ємом інокулятор має геометричний об'єм $V_{гін1} = 20$ л, однак, якщо обрати цей інокулятор, то його коефіцієнт заповнення складе:

$$K_{зап} = V_{роб3} / V_{гін1} = 13,77 / 20 = 0,68$$

що поза межами прийнятого діапазону для інокуляторів з барботером та мішалкою ($K_{зап} = 0,5-0,65$).

Якщо обрати наступний найближчий за розміром інокулятор, що має геометричний об'єм $V_{гін1} = 30$ л, то його коефіцієнт заповнення складе

$$K_{зап} = V_{роб3} / V_{гін1} = 13,77 / 30 = 0,45$$

що також не входить в межі прийнятого діапазону для інокуляторів з барботером та мішалкою ($K_{зап} = 0,5-0,65$).

Тоді обираємо інокулятор, що має геометричний об'єм $V_{гін1} = 25$ л, то його коефіцієнт заповнення складе

$$K_{зап} = V_{роб3} / V_{гін1} = 13,77 / 25 = 0,55$$

що в межах прийнятого діапазону для інокуляторів з барботером та мішалкою ($K_{зап} = 0,5-0,65$).

Оскільки, даний апарат є нестандартним, то будемо його замовляти.

3) Для отримання посівного матеріалу в інокуляторі з робочим об'ємом $V_{роб3}$ необхідно приготувати наступну кількість поживного середовища $V_{пс4}$ з врахуванням дози посівного матеріалу $X_{пм3} = 10\%$.

$$V_{пс3} = V_{роб3} / (1+X_{пм3}) = 13,77 / (1+0,1) = 12,5 \text{ л}$$

а об'єм посівного матеріалу $V_{пм4}$ складе:

$$V_{пм4} = V_{роб3} - V_{пс3} = 13,77 - 12,5 = 1,27 \text{ л}$$

Враховуючи втрати $E_{кол} = 0,01$ (частка), об'єм посівного матеріалу $V_{пм4}$ складе:

$$V_{пм4} = V_{пс3} / (1-E_{кол}) = 1,27 / (1-0,01) = 1,28 \text{ л.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час вирощування базидіоміцетів в качалочних колбах геометричним об'ємом $V_{колб} = 750$ мл. Коефіцієнт заповнення колб становить $K_{зап} = 0,2$. Кількість качалочих колб для засіву одного інокулятора складає:

$$N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} \times K_{зап}) = 1,28 / (0,75 \times 0,2) = 8,5$$

Приймаємо 9 качалочних колб.

4) Для отримання посівного матеріалу в качалочних колбах з робочим об'ємом $V_{роб4}$ необхідно приготувати наступну кількість поживного середовища $V_{пс4}$ з врахуванням дози посівного матеріалу $X_{пм3} = 10\%$.

$$V_{пс4} = V_{роб4} / (1+X_{пм4}) = 1,28 / (1+0,1) = 1,16 \text{ л,}$$

а об'єм посівного матеріалу $V_{\text{пм3}}$ складе:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб4}} - V_{\text{пс4}} = 1,28 - 1,16 = 0,126 \text{ л}$$

Для зручності результати розрахунку представимо у вигляді таблиці 3.3.

Таблиця 3.3.

**Об'єми апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та
виробничого біосинтезу**

| № стадії | Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{г}}$, л | Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$, частка | Робочий об'єм ферментера, $V_{\text{роб}}$, л | Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$, л | Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$, л |
|----------|---|--|--|---|--|
| <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> | <i>6</i> |
| 1. | 2 500 | 0,54 | 1 350 | 1 227 | 123 |
| 2. | 250 | 0,55 | 136,3 | 124 | 12,4 |
| 3. | 25 | 0,55 | 13,8 | 12,5 | 1,27 |
| 4. | 0,750×9 колб | 0,2 | 1,28 | 1,16 | 0,126 |

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу лакази у ферментері об'ємом 2,5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,54 буде проходити в 3 етапа, четвертим буде етап виробничого культивування.

Стадії культивування:

I стадія – вирощування в лабораторії (у колбах на качалці);

II стадія – вирощування в інокуляторі об'ємом 25 л;

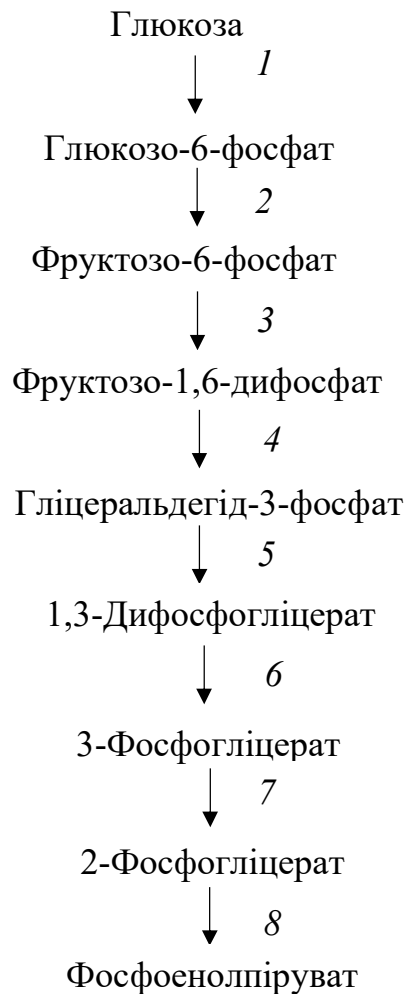
III стадія – вирощування в посівному апараті 250 л;

IV стадія – культивування у ферментері об'ємом 2,5 м³;

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Coriolus versicolor МТСС 138 використовує глюкозу та крохмаль як джерело вуглецю. Крохмаль розчеплюється амілазами до декстринів, мальтози, а потім до глюкози. Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes глюкоза забезпечує енергетичний метаболізм, вона перетворюється до пірувату, з якого утворюється ацетил-КоА, шлях перетворення наведено нижче на рис.4.1 (додаток 4) [29].



| | | | | | | | | | | |
|-----------|------|------------------------|--------|------|---|--|--|--------------------|------|---------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ</i> | | | | | |
| Зм. | Арк. | № документа | Підпис | Дата | <i>Розділ 4. Біосинтез цільового продукту</i> | | | | | |
| Розробив | | <i>Підгерська Т.О.</i> | | | | | | Літ. | Арк. | Акрюшив |
| Консульт. | | | | | | | | | 37 | 148 |
| Керівник | | <i>Карлаш Ю.В.</i> | | | | | | <i>Кафедра БТМ</i> | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | | | |
| Зав.каф. | | <i>Пирог Т.П.</i> | | | | | | | | |

↓ 9

Піруват

Рис. 4.1. Шлях катаболізму глюкози у Coriolus versicolor згідно KEGG

Ферменти: 1 – гексокіназа (КФ:2.7.1.1); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ:5.3.1.9); 3 – 6-фосфофруктокіназа (КФ:2.7.1.11); 4 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ:4.1.2.13); 5 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ:1.2.1.12); 6 – фосфогліцераткіназа (КФ:2.7.2.3); 7 – гліцератфосфомутаза (КФ:5.4.2.11) та фосфогліцератфосфомутаза (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

Цільовим продуктом даного мікроорганізму є фермент лаказа, що за своєю природою є білком.

У амінокислотній послідовності лакази містяться 10 консервативних гістидинів і один цистеїн.

Високо- і середньопотенціальні лакази в положенні T1 центру містять також залишок лейцину або фенілаланіну, а низькопотенціальні містять залишок метіоніну.

Бактеріальні лакази мають низький потенціал T1 центру. Грибні лакази мають високий або середній редокс потенціал.

Отже, проаналізувавши вище надану інформацію можна зробити висновок про те, що лаказа базидіального гриба *C. versicolor*, складається із таких амінокислот як гістидин, цистеїн, лейцин, фенілаланін [30].

Під час росту *C. versicolor* з використанням глюкози як джерела вуглецю, внаслідок катаболізму, шляхом гліколізу, утворюється піруват. (додаток 4). З пірувату утворюється ацетил-КоА, що залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК), що є важливим джерелом надходження інтермедіатів та попередників синтезу амінокислот (додаток 5) [31].

2-Оксоглутарат є попередником глютамату, глютаміну, проліну, аргініну. Оксалоацетат є попередником для синтезу лізину, аспартату, аспарагіну,

метионіну. З пірувату утворюються такі амінокислоти як: аланін, серин, гліцин, треонін, ізолейцин, лейцин та валін. З фосфогліцерату утворюється цистеїн. Еритрозо-4-фосфат та фосфоенолпіруват є попередниками синтезу фенілаланіну, тирозину, триптофану. Гістидин синтезується з фосфорибозилпірофосфату. Всі шляхи синтезу амінокислот з яких утворюється лаказа представлені в додатках (додатки 4-15) згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт лаказу виконана відповідно до Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes і представлена у вигляді загальної схеми (додаток 16) [32-41].

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.

Coriolus versicolor МТСС 138 є мезофілом і росте при температурі 28 °С, тому можливий ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами. Щоб цьому запобігти необхідно забезпечувати асептичні умови під час біосинтезу[4].

C. versicolor МТСС 138 синтезує фермент лаказу, що є екзометаболітом. Лаказа відноситься до вторинних метаболітів, оскільки, не є необхідною для росту або розмноження продуцента і виділяється назовні.

Вторинні метаболіти синтезуються саме в стаціонарній фазі при періодичному культивуванні, тому не дивлячись на ряд переваг безперервного культивування перед періодичним, немає сенсу створювати такі умови, при яких культура буде перебувати постійно в експоненційній фазі росту [42].

Даний біологічний агент належить до базидіальних грибів.

Для його культивування найбільш оптимальним є глибинний спосіб. Він є більш економічно вигідним, надає можливість масштабування виробничого процесу [43].

Глибинне культивування базидіоміцетів має ряд очевидних переваг перед поверхневим, так як дозволяє значно скоротити виробничі площі за рахунок компактності установки, виключити важку ручну працю, поліпшити гігієну праці, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва.

При глибинному культивуванні створюються сприятливі умови для доступу кисню і поживних речовин до всіх клітин міцелію, забезпечуються

| | | | | | | | | | | |
|------------------|-------------|------------------------|---------------|-------------|---|--|--|--------------------|-------------|----------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ</i> | | | | | |
| <i>Зм.</i> | <i>Арк.</i> | <i>№ документа</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | | | | | | |
| <i>Розробив</i> | | <i>Підгерська Т.О.</i> | | | <i>Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми</i> | | | | | |
| <i>Консульт.</i> | | | | | | | | <i>Літ.</i> | <i>Арк.</i> | <i>Акрюків</i> |
| <i>Керівник</i> | | <i>Карлаш Ю.В.</i> | | | | | | | 40 | 148 |
| <i>Н. Контр.</i> | | | | | | | | <i>Кафедра БТМ</i> | | |
| <i>Зав.каф.</i> | | <i>Пирог Т.П.</i> | | | | | | | | |

сприятливі умови для зростання і накопичення продуктів метаболізму, скорочується кількість твердих відходів.

Процес глибинного культивування забезпечує короткі терміни культивування, асептичність умов, збільшує кількість одержуваного продукту. Глибинне культивування базидіальних грибів є найбільш перспективним для цілей отримання ферментних препаратів[44].

Оскільки базидіальні гриби є аеробами, то культивування проводиться тільки в аеробних умовах.

Для культивування обираємо ферменстер з мішалкою та барботером. Для контролю за температурою під час культивування, ферменстер має бути обладнаний датчиком температури. Необхідно, щоб ферменстер мав датчик для контролю рН та датчик контролю піни. Ферменстер повинен мати порти для відбору проб, щоб здійснювати контроль виробництва. Для інтенсифікації масообмінних процесів та кращої гомогенізації культуральної рідини використовується перемішувач з частотою обертів 150 об/хв. Мішалка обладнана 4 стандартними дисковими турбінними імелерами, кожен з яких містить 6 плоских лопатей [26].

Аерація рідини сприяє піноутворенню, яке знижує якість ферментації, тому потрібно використовувати піногасіння. Досить ефективними є синтетичні піногасники, що випускаються для харчової промисловості, наприклад силікони [42].

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря.

Оскільки *Coriolus versicolor* МТСС 138 є грибом білої гнилі – еукаріотом, то процес його культивування потребує інтенсивної аерації. При цьому повітря, що подається на аерацію має бути стерильним [4].

З метою стерилізації повітря в боксах і лабораторіях, де проводять роботи з посівною культурою продуцента потрібно використовувати УФ-опромінення.

УФ випромінювання володіє протимікробною дією, що проявляється в деструктивно-модифікуючих пошкодженнях ділянок ДНК у геномі мікроорганізмів. Це призводить до загибелі клітин в першому чи наступних поколіннях.

Для знезараження використовують закриті опромінювачі (рециркулятори). В них бактерицидний потік від лампи розподіляється в обмеженому просторі й не має виходу назовні. Повітря очищається від мікроорганізмів за рахунок проходження через рециркулятор. Ці опромінювачі призначені для знезаражування повітря виробничих приміщень, де потрібно підтримувати чистоту повітря[45].

Для виробничого культивування і вирощування посівного матеріалу, стиснення та очищення аераційного повітря здійснюється за допомогою таких підсистем:

- очищення від пилу, а також стиснення;
- приведення повітря до термодинамічного стану з певною температурою та вологістю;
- відділення аерозолі у фільтрах грубого та тонкого очищення.

Таким способом вдається одержати аераційне повітря зі ступенем чистоти 99,9999%.

I підсистема. Атмосферне повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту на висоті двох-трьох метрів від даху промислової будівлі. Висота промислової будівлі становить 9,2 м (7,2 м висота стін, 0,5 м висота фундаменту та 1,5 м висота даху), а висота забору повітря – 12,2 м. Оскільки там менша концентрація мікроорганізмів. Далі повітря надходить у фільтри попереднього очищення, там воно очищається від пилу. Ці фільтри захищають компресори від забруднення, а також знижують кількість контамінуючої мікрофлори, що може

потрапити у другу підсистему. Далі повітря стискається у турбокомпресорі до 0,35-0,5 МПа. Температура повітря підвищується до 120-250 °С.

II підсистема. Для видалення вологи з повітря, температуру повітря потрібно знизити до «точки роси» в теплообміннику. Це здійснюють з метою запобігання осідання вологи на фільтрах, яка призводить до злипання волокон, а також зменшення ефективності роботи фільтра. Для того, щоб зменшити пульсації тиску повітря при роботі турбокомпресора, повітря подають у велику ємність, яка називається ресивер, там проходить видалення вологи та мастильної оливи з турбокомпресора. Далі повітря нагрівають парою до температури 50-70°С в теплообміннику для того, щоб забезпечити надійну роботу фільтрів наступних рівнів (другого і третього). При таких температурах не відбувається конденсація пари води на волокнах фільтра. Вологість повітря не повинна перевищувати 40% [42].

III підсистема. Ця підсистема включає в себе фільтри другого та третього рівнів очищення повітря. Фільтри другого рівня, це так звані, головні фільтри, являють собою набивні ємнісні фільтри з волокнистим матеріалом (скловолокно, базальтове волокно), тут повітря очищається до ступеня очищення $E = 95-98\%$. Потім повітря по колекторам надходить до індивідуальних фільтрів третього рівня, які розміщені перед кожним апаратом, незалежно від його місткості (ферментер, посівний апарат, інокулятор). В індивідуальних фільтрах для тонкого очищення часто використовують тканину Петрянова, яка складається з ультратонких полімерних волокон, що сформовані у вигляді тканини на марлевій підкладці. Також можна використовувати базальтове надволокно, базальтовий картон, фторопластові пластини[42]. Фільтри повинні забезпечувати ступінь очищення не менше $E = 99,996\%$ по метиленовому синьому.

Для забезпечення асептики, під час експлуатації фільтрів необхідна їх стерилізація. Вибір методу стерилізації, часу та температури стерилізації залежить від виду фільтрувального матеріалу. Досить ефективним способом є

нагрівання вологою парою і витримка при температурі 125 – 130 °С. Після стерилізації фільтрувальний матеріал сушать гарячим повітрям. Фільтрувальні матеріали, що не витримують таких високих температур (тканина Петрянова) стерилізують парами формаліну.

Очищення відпрацьованого повітря. Під час ферментації утворюється велика кількість відпрацьованого повітря, яке викидається в атмосферу. Разом з відпрацьованим повітрям в атмосферу потрапляє велика кількість різних органічних сполук. При цьому вологість повітря, що виходить із ферментера, наближається до 100%.

Для очищення відпрацьованого повітря використовують кілька методів. Одним із них є метод каталітичного допалювання, однак він є досить енергоємним. Відомим є метод із застосуванням сітчастих фільтрів. Фільтр має вигляд циліндричного корпусу з кришкою та днищем. У середині корпусу міститься плетіння з дроту діаметром 0,28 мм із нержавіючої сталі. Повітря проходить крізь фільтр, звільняється від крапель культуральної рідини з мікроорганізмами [42]. Крім того, використовують апарат – мокрий скруббер, де повітря очищають подачою технічної води, отриману стічну воду відправляють на очисні споруди.

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Біомой - мийний засіб, що містить синтетичні поверхнево активні речовини та протеолітичні ферменти. [46].

Біомой використовується для достерилізаційного очищення. Виробник НВ ТОВ «Фармакос» (Україна). Діюча речовина – алкілбензосульфатат натрію – 5,0 – 8,0 %.

Має вигляд порошку світлого відтінку. Виявляє змочувальні, мийні, емульгуючі властивості. Відповідно до вимог ГОСТ 12.1.007, належить до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру (4 клас безпеки). Робочі розчини готують у промаркованій тарі із будь-яких матеріалів шляхом розчинення у воді

при перемішуванні протягом 1-2 хв. Для приготування робочих розчинів використовують воду питну згідно ГОСТ 2874-82[47]

Рекомендується 0.15-0.3 % розчини температурою $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ для циркуляційного миття технологічного обладнання і комунікацій та миття скляної і полімерної тари[46].

Для приготування 1 л 0,3 % робочого розчину потрібно 3 г препарату розвести в 997 мл води. Робочий розчин можна використовувати протягом доби з моменту виготовлення за умови зберігання його кольору[47].

Кальцинована сода являє собою зневоднений вуглекислий натрій (Na CO). Має вигляд білого дрібнокристалічного порошку, який добре розчиняється у воді. Гарячі (55 ± 5 градусів Цельсію) розчини кальцинованої соди добре обмилюють жирові забруднення на поверхнях та руйнують білки. При зменшенні температури розчинів до (45 ± 5) градусів Цельсію їх мийна здатність різко падає.

Засіб належить до помірно небезпечних речовин (3 клас безпеки по ГОСТ 12.1.007). У нативному вигляді та концентрованих розчинах подразнює шкіру і слизову оболонку очей. Гарантійний термін зберігання 1 рік з дати виготовлення. Зберігають в пакуванні виробника в критих складських приміщеннях.

Рекомендується використовувати 0,5 % розчини кальцинованої соди температурою (45 ± 5) градусів Цельсію для ручного миття технологічного обладнання та інвентарю, а також (1-2) % розчини температурою (55 ± 5) градусів Цельсію для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій.

Розчини кальцинованої соди не призначені для миття обладнання, комунікацій та інвентарю, які виготовлені з алюмінію.

Каустична сода (їдкий натр, NaOH) являє собою безбарвну кристалічну речовину. Гігроскопічна. Добре розчиняється у воді. Водні розчини мають лужну реакцію. Гарячі (1-2) % розчини каустичної соди добре обмилюють жири,

гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. При зменшенні температури розчину мийні властивості засобу падають. Розчини каустичної соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію.

Засіб належить до високонебезпечних речовин (2 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). При попаданні на шкіру викликає хімічний опік. Подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів.

Гарантійний термін зберігання 1 рік з дати виготовлення. Зберігають в пакуванні виробника в складських неопалюваних приміщеннях.

Рекомендується використовувати 0,5 % розчини каустичної соди температурою (45 + - 5) градусів Цельсію для ручного миття технологічного обладнання та інвентарю, а також (1-2) % розчини температурою (55 + - 5) градусів Цельсію для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій.

Розчини каустичної соди не призначені для миття обладнання, комунікацій та інвентарю, які виготовлені з алюмінію[46].

Зараз є досить поширеними засоби, що одночасно використовуються як для миття так і дезінфекції, що дозволяє скоротити кількість оброблювальних засобів та заощадити кошти.

Хлорантоін засіб для дезінфекції та достерилізаційного очищення. Виробник НВ ТОВ «Фармакос» (Україна). Діюча речовина – дихлорантин – 21,5 – 23,5 %.[48].

Сипкий порошок світлих тонів з помірним запахом хлору. Робочі розчини не пошкоджують об'єкти вироблені з металу, скла, кахлю, дерева, фаянсу, порцеляни, добре змивається та не залишає нальоту. Використовується для миття поверхонь у приміщеннях (підлога, стіни, тверді меблі, віконні рами, підвіконя, двері, стелі) поверхонь обладнання та устаткування, прибирального інвентарю. Миття та дезінфекцію поверхонь проводять шляхом протирання або зрошення.

Має добрі змочувальні та мийні властивості. При нанесенні на шкіру належить до 4 класу мало небезпечних речовин.

Виявляє бактерицидні, віруліцидні, спороцидні та фунгіцидні властивості.

Рекомендується застосовувати 0.2 % розчини при кімнатній температурі для миття та дезінфекції шляхом протирання різних поверхонь, технологічного обладнання і комунікації, скляної і полімерної тари.

Для приготування 1 л 0,2 % робочого розчину потрібно 2 г препарату розвести в 998 мл води. Допускається зберігати невикористаний робочий розчин протягом 3 діб після виготовлення у тарі зі щільно закритою кришкою.

Поверхні приміщень протирають або зрошують з наступним дотриманням експозиції (30 хв). Після закінчення дезінфекції приміщення провітрюють 15 хв. Поверхні обладнання протирають чи зрошують з дотриманням експозиції. Після закінчення дезінфекції обладнання промивають водою[49].

Оскільки поверхню обладнання потрібно мити та дезінфікувати, то даний засіб може бути використаний з цією метою для обробки поверхонь обладнання, оскільки він поєднує в собі мийні та дезінфекційні властивості, то це дає можливість економити кошти.

Засіб дезінфекційний «Мікробак форте (Mikrobac forte)», має такі діючі речовини: бензил С12-18-алкілдиметиламоній хлорид - 18,6-21,2 %; N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3- діамін - 4,5-5,5 %. Виробник Німеччина, фірма «BODE Chemie GmbH». Засіб застосовують для миття та дезінфекції на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної, біотехнологічної, харчової промисловості[48].

Це прозора рідина від жовтуватого до слабо рожевого кольору з незначним запахом. Засіб добре змішується з водою. Розчини мають досконалі миючі властивості, видаляють забруднення органічного походження, білкові, жирові та інші. Робочі розчини не викликають корозії об'єктів, виготовлених з алюмінію,

латуні, міді, нержавіючої сталі, не пошкоджують керамічні поверхні, резини, скло та інші полімерні матеріали.

Засіб має бактерицидні, фунгіцидні, віруліцидні властивості.

За параметрами гострої токсичності згідно з ГОСТ 12.1007-76 при нанесенні на шкіру належить до 4 класу малонебезпечних речовин.

Робочі розчини засобу Мікробак форте готують шляхом розведення концентрату в холодній воді при перемішуванні. Розчин готують у промаркованій тарі з будь-яких матеріалів, яка закривається кришкою. Для зручності приготування робочих розчинів можуть використовуватися дозовані пакети на 20 мл. Розчиняючи вміст пакету у 8 л води, одержують робочий розчин з концентрацією 0,25%. Термін придатності робочих розчинів – 14 діб за умови зберігання у щільно закритій промаркованій тарі при кімнатній температурі. Допускається багаторазове використання робочих розчинів, протягом одного робочого дня (якщо їх зовнішній вигляд не змінився: зміна кольору, поява осаду, помутніння, зміна запаху). При перших ознаках зміни зовнішнього вигляду розчин необхідно замінити.

Використовуються для дезінфекції: поверхонь приміщень (підлоги, стелі, стіни, двері, підвіконня, тощо), поверхонь обладнання та поверхонь особливо чутливих апаратів, прибирального інвентарю.

Всі поверхні приміщень, приладів, обладнання, апаратури та інших об'єктів дезінфікують методом протирання або зрошення[50].

Дезінфікуючий засіб «Гембар» містить діючу речовину полігексаметиленгуанідін гідрохлорид - 25,0%[48].

Засіб дезінфікуючий «Гембар» випускається у формі рідкого концентрату. Це прозора рідина від безбарвного до світло-коричневого кольору.

Засіб «Гембар» за параметрами гострої токсичності 25% концентрованого продукту відноситься до 4 класу мало небезпечних речовин по ГОСТ 12.1.007 при нанесенні на шкіру.

Препарат має пролонговану бактерицидну, фунгіцидну, віруліцидну дію. Дезінфікуючий засіб «Гембар» використовують для дезінфекції:

- різних видів технологічного обладнання (резервуарів, ємностей, теплообмінників, пакування і фасування);
- трубопроводів, шлангів, стоків, жолобів;
- деталей обладнання, машин і установок, арматури;
- тканинних фільтруючих матеріалів та спецодягу;
- інвентарю, тари;
- транспортних засобів;
- поверхонь виробничих приміщень, холодильних камер і складських приміщень.

Робочі розчини засобу «Гембар» готують в промаркованих ємностях шляхом змішування засобу з водою. Для приготування робочих дезінфікуючих розчинів, необхідно використовувати водопровідну воду, що відповідає ГОСТ 2874 «Вода питна».

Оскільки «Гембар» забезпечує тривалий захист від реінфікування оброблених поверхонь (від 7 днів і більше), наступні санітарні обробки виробничих приміщень планують за результатами мікробіологічного моніторингу конкретного об'єкта[51].

Рекомендується використовувати 5.0 % розчини гембару для поточної дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері), прибирального інвентарю та санітарно-технічного обладнання [46].

Робочі розчини зберігають активність протягом 6 місяців[51].

Оскільки даний засіб має пролонговану дію, то будемо використовувати його для миття підлоги.

Таблиця 5.1

Узагальнена характеристика витрат мийючих та дезінфікуючих засобів для виробництва лакази

| Назва мийючого/ дезінфікуючого засобу | Об'єкт миття та/або дезінфекції | Концентрація робочого розчину, % | Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн | Вартість 1 л/кг робочого розчину мийного або дезінфікувального засобу, грн |
|---|---------------------------------------|--|---|--|
| Біомой | Обладнання, інвентар, комунікації | 0,3 | 174 ¹ | 0,52 |
| Кальцинована сода | Обладнання, інвентар, комунікації | 2 | 11 ² | 0,22 |
| Каустична сода | Обладнання, інвентар, комунікації | 2 | 22 ³ | 0,44 |
| Хлорантоін | Поверхні, стіни, вікна, двері | 0,3 | 376 ⁴ | 1,128 |
| Мікробак форте | Поверхні, стіни, вікна, двері | 0,25 | 558 ⁵ | 1,4 |
| Гембар | Підлога | 0,5 | 516 ⁶ | 10,32 |

Примітка:

1. <https://prom.ua/p3538341-biomoj-moyuschee-dezinfitsiruyuschee.html>
2. <https://prom.ua/ua/p225122562-soda-kaltsinovana-meshok.html?&primelead=My41>
3. <https://prom.ua/ua/p284267333-soda-kausticheskaya-natrij.html?&primelead=Mg>
4. <https://prom.ua/p1188103814-hlorantoin.html?&primelead=MS43>
5. https://unidepot.com.ua/p1186694090-mikrobak-forte.html?gclid=Cj0KCQjw28T8BRDbARIsAEOMBcx9QH7g28aLtXZKiwdGvzjgx1KHPH8yO7OF52W42_DIRPLxcCxh_uAaAtFPEALw_wcB
6. <https://prom.ua/p257133961-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-gembar.html>

Ціни наведені станом на 20.10.2020

Отже, проаналізувавши вище надану інформацію, для миття обладнання обираємо кальциновану соду, оскільки вона має значно кращі мийні властивості, ніж біомой і не така небезпечна як каустична сода і до того ж є найдешевшою.

Для миття та дезінфекції підлоги обираємо засіб, який володіє пролонгованою дією – «Гембар». Для миття та дезінфекції поверхонь та стін, вікон і дверей обираємо Хлорантоїн, оскільки він є дешевшим в порівнянні з іншими засобами (наприклад Мікробак форте) та виявляє бактерицидні, віруліцидні, спороцидні та фунгіцидні властивості і має гарні мийні властивості.

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого біосинтезу лакази *C. versicolor* МТСС 138 використовується середовище такого складу (г/л):

- Крохмаль – 15;
- Глюкоза – 10;
- Дріжджовий екстракт – 2,5;
- D , L-фенілаланін – 0,15;
- Аденін – 0,0275;
- KH_2PO_4 – 1 ;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5;
- CaCl_2 – 0,01;

Разом: $C_{\Sigma\phi} = 29,2$

Мікроелементи:

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01;
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,001;
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,001;
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001.
- 2,5-ксилідин – 0,12;
- pH – 5,0.

Для вирощування посівного матеріалу використовується дещо змінений склад поживного середовища:

- Глюкоза – 20;
- L – аспарагін – 2,5;
- D , L–фенілаланін – 0,15;
- Аденін – 0,0275;
- KH_2PO_4 – 1 ;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5;
- CaCl_2 – 0,01;
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01;

Разом: $C_{\Sigma\text{пм}} = 24,2$ г/л

Розчин мікроелементів (г/л): $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,002 = 0,004, готують окремо і додають до композиції Б перед стерилізацією.

- рН – 5,0 [4].

Для розрахунку компонентів поживного середовища по стадіях скористаємось таблицею 3.3. Розділу 3.

Таблиця 3.3.

Об'єми апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

| № стадії | Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{г}}$, л | Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$, частка | Робочий об'єм ферментера, $V_{\text{роб}}$, л | Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$, л | Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$, л |
|----------|---|--|--|---|--|
| <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> | <i>6</i> |
| 1. | 0,750×9 колб | 0,2 | 1,28 | 1,16 | 0,126 |
| 2. | 25 | 0,55 | 13,8 | 12,5 | 1,27 |
| 3. | 250 | 0,55 | 136,4 | 124 | 12,4 |
| 4. | 2 500 | 0,54 | 1 350 | 1 227 | 123 |

5.1.4.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Проаналізувавши склад поживного середовища для *C. versicolor* МТСС 138, ділимо його на такі композиції:

- **Композиція А:** глюкоза, L – аспарагін, D , L–фенілаланін, аденін (режим стерилізації: 112-115 °С, 30 хв, P=0,05 МПа).
- **Композиція Б:** MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O, CaCl₂ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, P=0,15 МПа).
- **Композиція В:** КН₂РО₄ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, P=0,15 МПа).

Глюкоза та амінокислоти (композиція А) є термолабільними речовинами і потребують м'якого режиму стерилізації. Солі композиції Б стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати (композиція В) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію. Стерилізацію композицій А, Б, В здійснюють в автоклаві. Відбирають проби на стерильність. У разі відсутності мікробіоти проводять змішування композицій в ламінарному боксі під факелом з подальшим розливом по качалочним колбам.

Окремо готують запасний розчин мікроелементів (з розрахунку на використання в трьох стадіях підготовки посівного матеріалу). Після приготування розчин мікроелементів додають до композиції Б перед стерилізацією на кожній стадії.

Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для колб.

Згідно таблиці 3.3. Розділ 3 об'єм поживного середовища становить $V_{\text{пс4}} = 1,16$ л. У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах загальні витрати компонентів на $V_{\text{пс4}}$ (л) складуть $G_{\text{кол}} = V_{\text{пск}} \cdot C_{\Sigma} = 1,16 \times 24,2 = 28$ г

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для колб.

Витрати води на приготування поживного середовища в колбах, л:

$$V_{\text{вкол}} = V_{\text{пск}} - (G_{\text{кол}}/1000) = 1,16 - (28/1000) = 1,132$$

Оскільки об'єм композицій невеликий їх стерилізують глухою парою в автоклаві, конденсат при розбавленні поживного середовища не враховуємо.

Воду на розчинення компонентів розподіляємо наступним чином:

- на приготування композиції А – 97 %;
- на приготування композиції Б – 1,0 %;
- на приготування композиції В - 2 %;

Разом: 100%

Таблиця 5.2.

Композиції для приготування та стерилізації 1, 160 л середовища для качалочних колб

| Компонент поживного середовища | Концентрація г/л | Вміст компонента у 1,160 л середовища, г | Вода, мл | Композиція | Об'єм, мл |
|--------------------------------------|------------------|--|----------|------------|-----------|
| <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3'</i> | <i>4</i> | <i>5</i> | <i>6'</i> |
| Глюкоза | 20 | 23,2 | 1 097 | А | 1 124 |
| L – аспарагін | 2,5 | 2,9 | | | |
| D , L–фенілаланін | 0,15 | 0,17 | | | |
| Аденін | 0,0275 | 0,03 | | | |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,5 | 0,58 | 12 | Б | 24 |
| CaCl ₂ | 0,01 | 0,01 | | | |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,01 | 0,01 | | | |
| КН ₂ РO ₄ | 1 | 1,16 | 23 | В | 51 |
| Разом * | 24,2 | 28 | 1 132 | | 1 160 |

Примітка: значення 3' = значення колонки 2 × V_{пск}; 6' =сума 3' + 4.

* розчин мікроелементів готується і добавляється до складу кожної композиції Б для вирощування інокулятоу перед стерилізацією поживного середовища.

5.1.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі.

Ділимо середовище на такі композиції:

- **Композиція А:** глюкоза, L – аспарагін, D , L–фенілаланін, аденін (режим стерилізації: 112-115 °С, 30 хв, P=0,05 МПа).
- **Композиція Б:** MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O, CaCl₂, KH₂PO₄ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, P=0,15 МПа).

Щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію солі композиції Б стерилізуємо з кислотою. Стерилізацію композицій А здійснюють в реакторі, а композиції Б здійснюють в автоклаві за рахунок малих об'ємів.

Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для інокулятора.

Згідно таблиці 3.3. об'єм поживного середовища становить $V_{\text{псз}} = 12,5$ л. У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах загальні витрати компонентів на $V_{\text{псз}}$ (л) складуть $G_{\text{ін}} = V_{\text{псз}} \cdot C_{\Sigma} = 12,5 \times 24,2 = 302,5$ г

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для інокулятора.

Кількість води визначають за наступною формулою $V_{\text{він}} = V_{\text{псз}} - G_{\text{ін}}$, де $V_{\text{кін}} = V_{\text{він}} \cdot K_{\text{кон}}$ - розбавлення виробничого поживного середовища конденсатом пари при його стерилізації, $K_{\text{кон}}$ – частка конденсату у загальній кількості води, що йде на приготування поживного середовища.

$$V_{\text{він}} = V_{\text{псз}} - (G_{\text{ін}}/1000) = 12,5 - (302,5/1000) = 12,2 \text{ л}$$

Розбавлення поживного середовища конденсатом пари при його стерилізації в інокуляторі (10%), л:

$$V_{\text{кін}} = V_{\text{він}} \cdot K_{\text{кон}} = 12,2 \times 0,1 = 1,22 \text{ л}$$

Кількість води, що йде на розчинення компонентів поживного середовища: $V_{\text{інв}} = V_{\text{він}} - V_{\text{кін}} = 12,2 - 1,22 = 10,98$ л.

Воду на розчинення компонентів та конденсату розподіляємо наступним чином:

- вода на приготування композиції А – 97 %; конденсат – 100%
- на приготування композиції Б – 3 %, конденсат - 0

Разом: 100%

Таблиця 5.3

Композиції для приготування та стерилізації 12,5 л середовища

| Компонент поживного середовища | Вміст, г/л | Вміст компонента у 12,5 л середовища, г | Вода, л | Конденсат, л | Композиція | Об'єм, л |
|--------------------------------------|------------|---|---------|--------------|------------|----------|
| Глюкоза | 20 | 250 | 10,66 | 1,22 | А | 12,223 |
| L – аспарагін | 2,5 | 31,25 | | | | |
| D , L – фенілаланін | 0,15 | 1,875 | | | | |
| Аденін | 0,0275 | 0,344 | | | | |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,5 | 6,25 | 0,32 | 0 | Б | 0,42 |
| CaCl ₂ | 0,01 | 0,125 | | | | |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,01 | 0,125 | | | | |
| KH ₂ PO ₄ | 1 | 12,5 | | | | |
| Разом* : | | 302,5 | 10,98 | 1,22 | | 12,5 |

* розчин мікроелементів готується і добавляється до складу кожної композиції Б для вирощування інокуляту перед стерилізацією поживного середовища.

Композицію Б підкислюють 0,6 н нестерильним розчином соляної кислоти з розрахунку 2 мл на 1 л розчину. Кількість 0,6 н розчину соляної кислоти для підкислення композиції В становить $0,4 \times 2 = 0,8$ мл.

Композиція А готується і стерилізується в окремому реакторі. Композицію Б готують в окремій колбі і стерилізують в автоклаві і передають до інокулятора.

5.1.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті.

Стерилізація поживного середовища, необхідного для цієї стадії, здійснюється в реакторах, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

- **Композиція А:** глюкоза, L – аспарагін, D , L–фенілаланін, аденін (режим стерилізації: 112-115 °С, 30 хв, P=0,05 МПа).
- **Композиція Б:** KH_2PO_4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, P=0,15 МПа, рН 4,0–4,5).

Стерилізація композиції Б відбувається з додаванням розчину НСІ для того, щоб солі не випали в осад.

Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для посівного апарата.

Згідно таблиці 3.3. об'єм поживного середовища становить $V_{\text{пс2}} = 124$ л. У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах загальні витрати компонентів на $V_{\text{пс3}}$ (л) складуть $G_{\text{па}} = V_{\text{пс2}} \cdot C_{\Sigma} = 123,9 \times 24,2 = 2\,999$ г

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для посівного апарата

Кількість води визначають за наступною формулою $V_{\text{впа}} = V_{\text{пс2}} - G_{\text{па}}$, де $V_{\text{кпа}} = V_{\text{впа}} \cdot K_{\text{кон}}$ - розбавлення виробничого поживного середовища конденсатом пари при його стерилізації, $K_{\text{кон}}$ – частка конденсату у загальній кількості води, що йде на приготування поживного середовища.

$$V_{\text{впа}} = V_{\text{пс2}} - (G_{\text{па}}/1000) = 124 - (3000/1000) = 121 \text{ л}$$

Розбавлення поживного середовища конденсатом пари при його стерилізації в інокуляторі (10%), л:

$$V_{\text{кпа}} = V_{\text{впа}} \cdot K_{\text{кон}} = 121 \times 0,1 = 12,1 \text{ л}$$

Кількість води, що йде на розчинення компонентів поживного середовища

$$V_{\text{пав}} = V_{\text{впа}} - V_{\text{кпа}} = 121 - 12,1 = 108,9 \text{ л.}$$

Воду на розчинення компонентів та конденсату розподіляємо наступним чином:

- вода на приготування композиції А – 12,1 %; конденсат – 8,3%
- на приготування композиції Б – 1,6 %, конденсат - 0
- вода в посівний апарат - 86,3 %, конденсат – 91,7%

Разом: 100%

Таблиця 5.4.

Композиції для приготування та стерилізації 124 л середовища

| Компонент поживного середовища | Вміст, г/л | Вміст компонента у 124 л середовища, г | Вода, л | Конденсат, л | Композиція | Об'єм, л |
|---|------------|--|---------|--------------|------------|----------|
| Глюкоза | 20 | 2 480 | 13,2 | 1,0 | А | 17 |
| L – аспарагін | 2,5 | 310 | | | | |
| D , L– фенілаланін | 0,15 | 18,6 | | | | |
| Аденін | 0,0275 | 3,4 | | | | |
| KH ₂ PO ₄ | 1 | 124 | 1,8 | 0 | Б | 2,0 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,5 | 62 | | | | |
| CaCl ₂ | 0,01 | 1,24 | | | | |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,01 | 1,24 | | | | |
| Стерилізація композиції Б у посівному апараті | | | 94 | 11,1 | | 105 |
| Разом* | | 3 000 | 108,9 | 12,1 | | 124 |

* розчин мікроелементів готується і добавляється до складу кожної композиції Б для вирощування інокуляту перед стерилізацією поживного середовища.

Композицію Б підкислюють 0,6 н нестерильним розчином соляної кислоти з розрахунку 2 мл на 1 л розчину. Кількість 0,6 н розчину соляної кислоти для підкислення композиції В становить $2 \times 2 = 4$ мл. Після стерилізації поживне

середовище в посівному апараті підлучають до оптимального рівня культивування продуцента (рН=5,0) попередньо простерилізованим 0,6 н розчином гідроксиду.

Композицію А готують та стерилізують в окремому реакторі і після цього передають у посівний апарат. Композицію Б готують в 3 л колбі і переливають у 250 л посівний апарат. Додають питну воду і в ньому ж стерилізують. Розчин мікроелементів додають в посівний апарат перед стерилізацією композиції Б.

5.1.4.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Середовище ділять на такі композиції:

- **Композиція А:** глюкоза, крохмаль, дріжджовий екстракт, D , L– фенілаланін, аденін (режим стерилізації: 112-115 °С, 30 хв, P=0,05 МПа).
- **Композиція Б:** MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄, CaCl₂, FeSO₄·7H₂O, MnSO₄·4H₂O, ZnSO₄·7H₂O (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, P=0,15 МПа, рН 4,0–4,5).
- **Композиція В:** CuSO₄·5H₂O(режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, P=0,15 МПа).
- **Композиція Г:** 2,5-ксилідин (холодна фільтрація).

Крохмаль композиції А попередньо необхідно заварити. Крохмаль суспендується у холодній воді, потім його нагрівають до температури 70 – 90 °С і, витримуючи при такій температурі упродовж 20 – 30 хв., проводять розварювання. Далі додають глюкозу та проводять стерилізацію.

Солі композиції Б змішують з хлоридною кислотою і розчиняють в реакторі об'ємом 15 л, після цього передають у ферментер.

Композиція В готується окремо, оскільки вона додається на 4 день культивування. До композиції Г входить термолабільна речовина, яку необхідно розчинити у 50% етанолі і стерилізувати «холодною стерилізацією» з діаметром пор не більше 0,22 мкм.

Розрахунок кількості компонентів поживного середовища виробничого ферментера.

Згідно таблиці 3.3. об'єм поживного середовища становить $V_{\text{пс2}} = 1\,227$ л. У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на $V_{\text{пс1}}$ (л) складуть

$$G_{\text{ф}} = V_{\text{пс1}} \cdot C_{\Sigma} = 1\,227,3 \times 29,32 = 35\,984,4 \text{ г} = 35,894 \text{ кг}$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого ферментера.

Кількість води визначають за наступною формулою $V_{\text{вф}} = V_{\text{пс1}} - G_{\text{ф}}$, де $V_{\text{кф}} = V_{\text{вф}} \cdot K_{\text{кон}}$ - розбавлення виробничого поживного середовища конденсатом пари при його стерилізації, $K_{\text{кон}}$ - частка конденсату у загальній кількості води, що йде на приготування поживного середовища.

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{пс1}} - (G_{\text{ф}}/1000) = 1227 - 35,894 = 1\,191 \text{ л}$$

Розбавлення поживного середовища конденсатом пари при його стерилізації в інокуляторі (10%), л:

$$V_{\text{кф}} = V_{\text{вф}} \cdot K_{\text{кон}} = 1191 \times 0,1 = 119 \text{ л}$$

Кількість води, що йде на розчинення компонентів поживного середовища:

$$V_{\text{фв}} = V_{\text{вф}} - V_{\text{кф}} = 1\,191 - 119 = 1\,072 \text{ л.}$$

Воду на розчинення компонентів та конденсату розподіляємо наступним чином:

- вода на приготування композиції А – 15 %; конденсат – 15%
- на приготування композиції Б – 0,7 %, конденсат - 0
- вода в ферментер - 84,3 %, конденсат в ферментері – 85%

Разом: 100%

Таблиця 5.5

Композиції для приготування та стерилізації 1,227 м³ середовища

| Компонент поживного середовища | Вміст, г/л | Вміст компонента у 1,227 м ³ середовища, кг | Вода, л | Конденсат, л | Композиція | Об'єм, л |
|--------------------------------------|------------|--|---------|--------------|------------|----------|
| Глюкоза | 10 | 12,3 | 159,5 | 18 | А | 211,7 |
| Крохмаль | 15 | 18,4 | | | | |
| Дріжджовий екстракт | 2,5 | 3,1 | | | | |
| D, L-фенілаланін | 0,15 | 0,18 | | | | |
| Аденін | 0,0275 | 0,03 | | | | |
| KH ₂ PO ₄ | 1 | 1,23 | 7,5 | 0 | Б | 9,3 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,5 | 0,61 | | | | |
| CaCl ₂ | 0,01 | 0,012 | | | | |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,01 | 0,012 | | | | |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 0,001 | 0,001 | | | | |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,001 | 0,001 | | | | |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,001 | 0,001 | | | | |
| 2,5-ксилідин | 0,12 | 0,147 | 1,85* | 0 | Г | 2 |
| Вода у ферментер | | | 905 | | | 905 |
| Конденсат у ферментері | | | | 101 | | 101 |
| Разом | | 35,89 | 1 072 | 119 | | 1 227 |

* - 50% розчин етанолу.

Композицію Б підкислюють 0,6 н нестерильним розчином соляної кислоти з розрахунку 2 мл на 1 л розчину. Кількість 0,6 н розчину соляної кислоти для підкислення композиції Б становить $9,3 \times 2 = 18,6$ мл. Після стерилізації поживне середовище у ферментері підлучнюють до оптимального рівня культивування продуцента (рН=5,0) попередньо простерилізованим 0,6 н розчином гідроксиду натрію.

5.1.4.5. Розрахунок мікроелементів для вирощування інокуляту.

Для вирощування інокуляту окремо готується 100 мл концентрованого розчину мікроелементів в розрахунку на 3 стадії. Це робиться у зв'язку з тим, що

кількість таких мікроелементів як: $MnSO_4 \cdot 4H_2O$; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; - є досить незначною.

Таблиця 5.6

Розрахунок вмісту мікроелементів в різних об'ємах поживного середовища

| Об'єм середовища, л | $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, г | $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, г | $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, г | Заг. маса, г | Об'єм, мл |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|-----------|
| 123,9 | 0,124 | 0,124 | 0,247 | 0,495 | 92 |
| 12,5 | 0,0125 | 0,0125 | 0,025 | 0,05 | 8 |
| 1,16 | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,004 | 0,1 |
| Разом | 0,137 | 0,137 | 0,274 | 0,548 | 100 |

5.1.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника.

Розчини для регуляції рН. Для нормального росту *C. versicolor* МТСС 138 діапазон оптимального рН = 5,0. При споживанні мікроорганізмами амінного азоту (джерелом, якого є дріжджовий екстракт) відбувається підлучнення культуральної рідини в результаті транспорту азоту симпортом з протоном[42]. Для корегування рН готують титрувальний розчин 6% HCl, а також 6 % розчин NaOH.

Розчин NaOH стерилізують при 131 °С протягом 40 хв. Він додається на стадії після стерилізації магнієвих, кальцієвих і фосфорних солей для доведення рН від 4,0 – 4,5 до 5,0, що є оптимальним для продуцента, а також на стадії після стерилізації 2,5-ксилідину.

Розчин 6 % HCl готується з концентрованої 38 % кислоти HCl і не стерилізується. Готовий розчин за потреби додається до інокулятора, посівного апарату та виробничого ферментера під час підлучнення культуральної рідини, внаслідок споживання амінного азоту.

Піногасник. Для зниження піноутворення використовують механічні та хімічні піногасники. В якості механічного піногасника виступає мішалка, однак

цей спосіб знищення піни є малоефективним, тому для підвищення ефекту варто застосовувати також хімічні піногасники. Хімічні піногасники можуть бути жировими та синтетичними. Зараз жирові піногасники все частіше замінюються на синтетичні. Оскільки жири можуть споживатися мікроорганізмами та змінювати рН середовища, обираємо синтетичні піногасники.

До синтетичних піногасників відносяться силікони, пропіноли, контрамін та поліформаль[42].

Для піногасіння обираємо силікони, оскільки вони є найбільш ефективними[52].

Силікони, або поліорганосилоксани - це кремнійорганічні рідкі високомолекулярні речовини.

Силікони мають рідкісні властивості — високу теплостійкість, характерну для кремнію (не розкладається при 300 °С), і еластичність, притаманну органічним полімерам. Використовуються вони як гідрофобізатори, піногасники, антикорозійне і антиадгезійне покриття, алопластичний матеріал, основи захисних мазей, носії АФІ[53].

Широко застосовують у багатьох галузях народного господарства, включаючи різні напрями медицини, у фармації, мікробіології, гематології, косметології, ветеринарії.

Специфічну властивість силіконів пригнічувати піноутворення використовують при ферментації антибіотиків, ферментів, виробництві екстрактів лікарських речовин, відгонці спирту із сумішей речовин, які дуже піняться. Застосування піногасників дозволяє помітно підвищити економічність технологічних процесів у виробництві та якість продукції, що виробляється.

Силікон відомий під назвою «Диметикон» в багатьох країнах. Диметикон має поверхнево-активні властивості, при додаванні в концентрації 0,5 %; проявляє властивості піногасника.

Демитикон може стерилізуватися впродовж 2 год при $t=160$ С.

Диметикони слід зберігати у герметично закритій тарі у прохолодному сухому місці[53].

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Культуральна рідина після вирощування мікроорганізмів глибинним способом має велику кількість баластних речовин. Виділення та очистка ферментів – це досить трудомісткий та дороговартісний процес.

В більшості галузей харчової промисловості, а також в текстильній, міховій, мікробіологічній і особливо в медичній, використовуються тільки очищені препарати ферментів, частково або повністю звільнені від баластних речовин[54].

Препарати Г10Х мають значно більш високу чистоту, ніж ГХ, Г3Х. Оскільки сфера застосування препаратів Г10Х охоплює різні харчові виробництва, галузі легкої і хімічної промисловості, то після синтезу лакази, відділення та очищення ферменту буде проводитися з метою досягнення саме того ступеня чистоти[55].

Індекс Г10Х мають препарати, отримані шляхом фільтрування чи центрифугування культуральної рідини, концентрування вакуум-випаровуванням чи ультрафільтрацією, осадження органічними розчинниками чи солями, сушіння в сублімаційній чи вакуум-сушильній [54].

Отже для отримання лакази Г10Х необхідно провести наступні операції:

1. Відділення біомаси.
2. Концентрування ферменту.
3. Осадження за допомогою солей або органічними розчинниками.
4. Фільтрація осаду.
5. Висушування.
6. Подрібнення.
7. Просіювання.
8. Стандартизація.

9. Фасування.

Лаказа випускається у вигляді сухого порошку. Так наприклад за кордоном торгова компанія Xi'an Saying Bio – Technology Co., Ltd. (Китай) виготовляє сухий фермент з активністю 5000 Од/г[10].

5.2.1. Відділення біомаси.

Першим етапом виділення ферменту є відділення культуральної рідини від біомаси продуцента. Існує кілька способів відділення біомаси:

- Фільтрування;
- Центрифугування.

Оскільки середовище для культивування продуцента є в'язким (містить крохмаль), а сам продуцент утворює розгалужений міцелій, то фільтрування може бути утрудненим. Так наприклад, при фільтрації деяких культуральних рідин, зокрема культуральній рідині актиноміцетів, що також мають розгалужений міцелій, питомий опір драглистого осаду, що утворюється, дуже великий. Навіть тонкий шар осаду, який залишається після того, що зрізається ножом, призводить до різкого зниження швидкості фільтрації.

Більш доцільним способом є центрифугування культури. *Центрифугування* - процес розділення рідких неоднорідних систем у полі дії відцентрових сил. У мікробіологічній промисловості центрифуги широко використовують для розділення суспензій на рідину й тверді фази, що містять мікроорганізми, ферменти, амінокислоти й інші продукти біосинтезу кристалічної або аморфної структур.

Центрифуги використовують в таких випадках:

- коли осад погано фільтрується;
- коли треба одержати біомасу, вільну від допоміжних фільтрувальних матеріалів;
- коли процес вимагає безперервності в умовах високої стерильності.

Істотний недолік центрифуг - негативна дія на клітини відцентрової сили

та їх перегрівання. Однак, у зв'язку з тим, що біомаса не має ніякого значення для подальшого відділення ферменту, так як лаказа – це позаклітинний фермент, що міститься в культуральній рідні, то цей недолік не враховується для даного випадку.

Головна перевага центрифуг - висока продуктивність і компактність обладнання.

Оскільки маємо грибну біомасу, то для відділення біомаси від культуральної рідини обираємо центрифугування. Біомасу центрифугують при 8000 об/хв ($8000 \times g$) протягом 20 хв або при 6000 об/хв протягом 30 хв[4,56].

В результаті центрифугування біомаса продуцента з нерозчинними залишками (біошрот) відділяється від супернатанту (фільтрату). Так як фермент є позаклітинним, то для подальшого виділення та очищення лакази використовуємо супернатант.

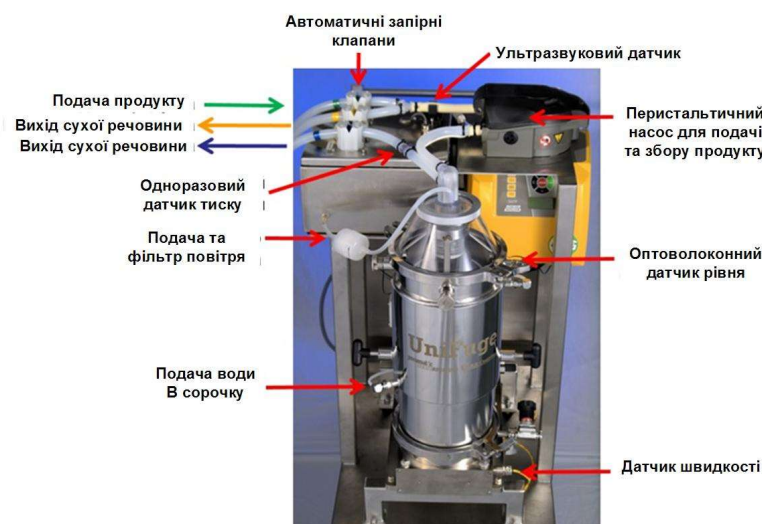


Рис.5.1. Конструкція фільтруючої центрифуги

5.2.2. Концентрування.

Для концентрування супернатанту, як правило, використовують два метода:

- концентрування вакуум-випаровуванням;

- ультрафільтрація.

Не дивлячись на наявність високопродуктивних вакуум-випарних апаратів, повністю усунути недоліки методу вакуум-випаровування не вдалося (втрата активності, випадіння осадів), тому цей метод все більше замінюється на ультрафільтрацію[54].

Ультрафільтрація – процес мембранного розділення розчинів високомолекулярних та низькомолекулярних сполук, а також фракціонування і концентрування високомолекулярних сполук, шляхом пропускання розчину через мембрану з середнім розміром пор 0,1 мкм. Він протікає під дією різниці тисків до і після мембрани. При використанні ультрафільтрації не тільки збільшується вихід готового продукту і поліпшується його якість, а й різко скорочується число стадій технологічного процесу при виробництві.

Якщо домішки мають невелику молекулярну масу, ультрафільтрація може використовуватися для отримання концентрату чистого продукту. Тоді ультрафільтрація є аналогом діалізу, але менш трудомістким процесом і більш економічним за часом. Як правило, високо проникливі ультрафільтраційні мембрани дозволяють проводити очищення в 10-100 разів швидше, ніж при аналогічному процесі діалізу.

Застосування ультрафільтрації для поділу речовин дає великі переваги:

- відпадає необхідність у хімікатах;
- досягається висока ступінь розділення, що дозволяє повторно використовувати розділені фази;
- процес не залежить від стабільності вихідного розчину, а також від роду і концентрації присутніх у ній електролітів;
- немає потреби в підводі тепла, тобто питомі витрати енергії невеликі;
- простота технологічної схеми та апаратури;
- компактність установки.

Отриманий супернатант після відділення біомаси представляє собою водний розчин високомолекулярних речовин (супутні білки та ферменту лакази з молекулярною масою 97 кДа.) та низкомолекулярні речовини (залишки солей як компоненти поживного середовища). Отже найефективнішим методом концентрування супернатанту буде ультрафільтрація, яка дозволить позбутися низкомолекулярних речовин та значної кількості води і отримати концентрат супутніх білків разом з лаказою[57]. Визначаємо діаметр пор лакази згідно рівняння Стокса: $D_{\text{мол}}=0,098 \times M^{0,38}=0,098 \times 97\,000^{0,38}=7,7$ нм або 0,007 мкм. (M – молекулярна маса в Да). Тоді розмір мембрани має бути 0,005 мкм або 5 нм.

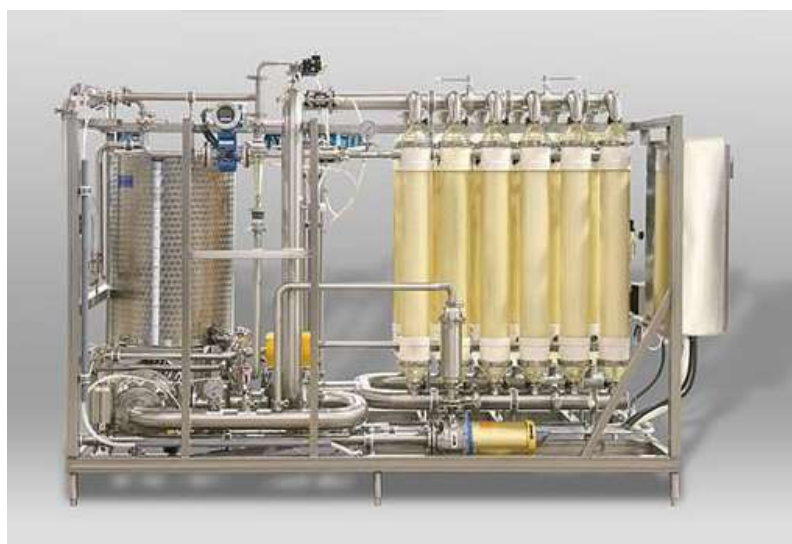


Рис.5.2. Загальний вигляд ультрафільтраційної установки

5.2.3. Осадження.

З метою подальшого виділення та очищення лакази далі концентрат осаджують за допомогою органічних розчинників.

Органічний розчинник, який використовують для осадження, має повністю змішуватися з водою а також не зв'язуватися з ферментом. Найчастіше для осадження використовують *етиловий спирт, ацетон, ізопропіловий спирт*. При виборі розчинника треба звертати увагу на його токсичність та вибухонебезпечність, можливість регенерації. З урахуванням цього

найпридатніші розчинником для осадження лакази є саме етанол та ізопропанол[58].

Для осадження лакази використовують етанол. Фермент осаджують в розчині з концентрацією спирту 60-80 % в реакторі з лопатевою мішалкою[59].

5.2.4. Фільтрація осаду.

В процесі осадження під дією етанолу утворюється осад лакази, який слід відділити від водно-спиртового розчину. Апаратами для відділення є друк-фільтри або нутч-фільтри та звичайні фільтр-преси. Враховуючи підвищену вибухонебезпечність таких розчинів відділення осаду слід проводити в герметичних апаратах. Такими апаратами є друк-фільтри, що працюють під надлишковми тиском ($\Delta P > P_{\text{атм}}$). Це фільтри періодичної дії[60].

Друк- фільтр – це фільтр, який має циліндричну оболонку і складається з двох частин - верхньої та нижньої половини, у верхній частині розміщено перфоровану перегородку з фільтрувальним матеріалом і в яку подають під тиском суспензію, та у нижній частині збирається фільтрат (рис.5.3).

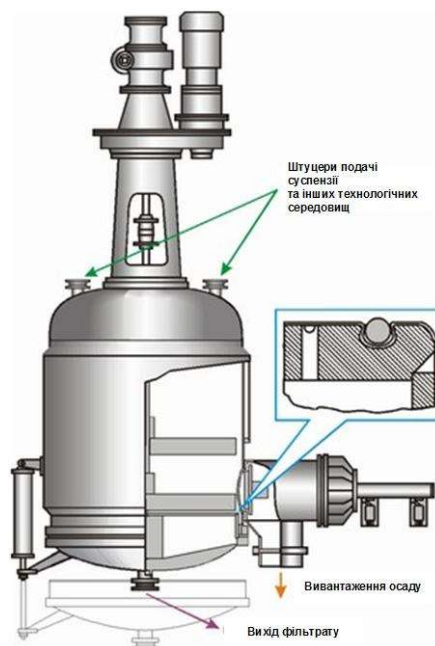


Рис.5.3. Конструкція друк-фільтра

Найбільш поширеним випадком застосування такого фільтраційного обладнання є випадки, коли мова йде про необхідність обробки ефірних, спиртових та інших органічних розчинників, які відрізняються досить низькою температурою кипіння.

Такі апарати мають достатньо велику фільтруючу поверхню, за рахунок чого вони мають високу продуктивність[61].

Отже для фільтрування осаду лакази обираємо друк-фільтр.

5.2.5. Висушування.

Одержаний вологий ферментний препарат з вологістю 65-75 % далі слід піддати остаточному подальшому висушуванню. Для одержання ферментних препаратів Г10Х застосовують вакуум-висушування або сублімаційне сушіння. Представлені методи висушування дозволяють суттєво понизити температуру висушування за рахунок вакууму[54].

При вакуум-висушуванні сушіння відбувається періодично. У шафу на полиці закладають вологий матеріал, створюють вакуум і починають обігрівати шафи парою через порожнини в плитах або електричним струмом[60].

Товщина шару осаду, що висушується повинна становити не більше 0,5 см. Висушування проводять при температурі 30 °С. Спочатку матеріал нагрівається до температури сушки, при цьому видаляється вся поверхнева волога. В другий період сушки відбувається видалення вологи з глибинних шарів.

Втрати активності при такій сушці становлять 6 -10%. Термін сушіння – від 8 до 16 годин. В вакуум – сушильних шафах сушать осад на листах целофану, тому що саме цей матеріал дозволяє після висушування препарату легко його відокремити. Єдиний недолік – невеликі об'єми сушильних шаф та довгий час висушування[54].

Безперечно сублімаційне сушіння має більше переваг, ніж вакуум-висушування. Але враховуючи те, що сублімаційне сушіння – це досить

дороговартісний процес, що вимагає наявності складної апаратури, то обираємо вакуум-висушування.



Рис. 5.4. Загальний вигляд вакуум-сушильної шафи.

5.2.6. Подрібнення.

Після висушування отримують суху лаказу у вигляді корок, які слід подрібнити і розтерти в порошок.

Подрібнення готових сухих ферментних препаратів можна здійснювати різними способами:

- Роздавлювання;
- Ударом;
- Розколюванням;
- Стиранням.

Вибір способу залежить від стану препарату та його властивостей, а головне, стійкості самих ферментів до процесу подрібнення і температури.

У ферментній промисловості використовують для цілі подрібнення: молоткові дробарки (млини), ударні млини – дезінтегратори і дисмембратори, кульові і стрижневі млини.

При подрібненні ферментних препаратів необхідно пам'ятати про наступні правила і застереження:

1. Подрібнення не повинне супроводжуватися підвищенням температури;
2. Подрібнення повинне забезпечити необхідний розмір частинок;
3. Конструкція млина має бути такою, щоб препарат не збагачувався сторонніми компонентами, що погіршать якість готового ферменту[54].

Існує декілька видів подрібнення.

Таблиця 5.7

Види подрібнення

| Види помелу | Величина частинок після подрібнення, мм |
|-------------|---|
| Грубий | $d_k = 0,1-5$ |
| Середній | $d_k = 0,05-0,1$ |
| Тонкий | $d_k = 0,001-0,05$ |
| Надтонкий | $d_k < 0,001$ |

Лаказу подрібнюємо до середнього помелу.

Для середнього та дрібного подрібнення середньо-твердих та крихких матеріалів застосовуються ударні млини. Враховуючи невелику кількість лакази для подрібнення, доцільно обрати ударний лабораторний млин, який подрібнює матеріал до розмірів 0,1 мм [62].

5.2.7.Просіювання.

Подрібнювання матеріалу завжди неоднорідне за розміром часток. Із цієї причини доводиться відокремлювати крупніші або дрібніші частки від основної маси. Цей процес має назву просіювання, грохочення або ситова класифікація. У результаті просіювання вихідний матеріал розділяється на дві фракції: просів (матеріал, що пройшов крізь сітку) і відсів (що затримався на ситі) [63].

Враховуючи те, що кількість лакази є досить малою, то для просіювання обираємо лабораторне (переносне сито) з діаметром пор 0,1 мм.

5.2.8. Стандартизація.

В процесі виділення та очищення ферменту отримують сухий порошок, активність якого може сильно варіювати від партії до партії, а також вона, зазвичай, більша, ніж активність стандартного препарату. З метою приведення її до стандартної величини проводять процес стандартизації. *Стандартизація* – це процес доведення активності препарату до стандартної, відповідно вимогам ДСТУ, ТУ або замовника, шляхом добавлення до сухого порошку ферменту різних нейтральних наповнювачів. Частіше це крохмаль, лактоза, харчова сіль та інші матеріали. Основна вимога – відсутність взаємодії фермента та наповнювача[64].

Необхідно також враховувати здатність наповнювача до сорбції водних парів. Наприклад, крохмаль та лактоза запобігають зволоженню ферментного препарату. Хлориди калію і натрію навпаки сприяють зволоженню ферменту і як наслідок втрачається активність ферменту, тому у разі їх використання необхідна герметична упаковка препарату. При змішуванні готового сухого препарату з наповнювачем необхідно, щоб вони мали однаковий ступінь подрібнення і вологість не більше 10 – 12%.

Стандартизація препарату хлористим натрієм і крохмалем в рівних кількостях дозволяє зберігати його без втрат активності до двох років[58].

Враховуючи вище сказане, КСІ та NaCl обирати не доцільно, а крохмаль як наповнювач спричинить проблеми в майбутньому, при розведенні лакази для відбілюючого засобу.

В якості наповнювача також використовують титан діоксиду. Це білий аморфний негігроскопічний порошок без смаку та запаху. Є повністю безпечним та нетоксичним при потраплянні в шлунок, його часто використовують в кулінарії. Має відбілюючі властивості. Надзвичайно стійкий в умовах високих

температур завдяки міцному зв'язку між тетравалентним іоном титану та двовалентними іонами кисню.

Обираємо саме цей наповнювач, так як він не притягує вологу і частково підсилить відбілюючі властивості лакази[65].

Змішування лакази із наповнювачем здійснюємо за допомогою барабанного змішувача. Барабанні змішувачі являють собою циліндричні, призматичні або зіркоподібні (хрестоподібні) камери, що обертаються навколо горизонтальної осі, яка приводиться у рух за допомогою електромотора через пасову передачу. Внутрішня поверхня барабана полірується або вистилається гладенькою жерстю, щоб виключити прилипання порошку. Для поліпшення ефекту перемішування на стінках улаштовують так звані відбійники — вертикальні, спіральні або прямокутні лопаті, розташовані під кутоім до напрямку обертання. Барабани обертаються зі швидкістю 6-8 об/хв. і призначені для змішування тільки сипучих матеріалів. Вони є досить простими за своєю конструкцією[63].

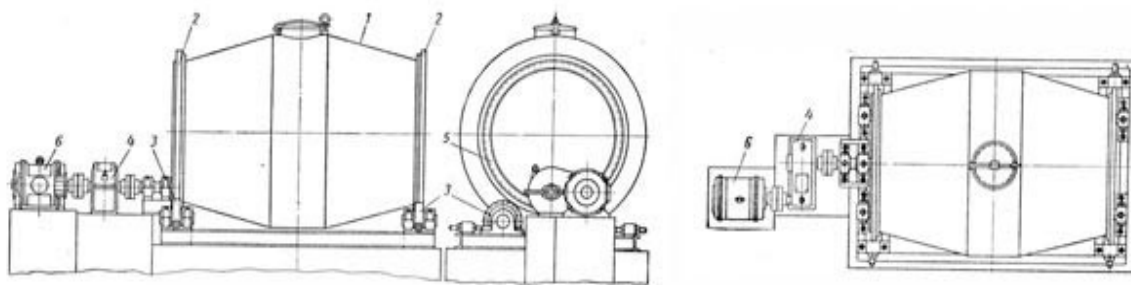


Рис.5.5. Барабанний змішувач

1 – барабан; 2 – бандажі; 3 – опорні ролики; 4 – редуктор; 5 – зубчасте колесо; 6 – двигун.

5.2.9. Фасування та пакування.

В залежності від сфери використання фермент фасують у невеликі пакети з поліетилену або фольги, а далі запаковують в туби або картонні коробки[15-16].

Фасування та пакування буде здійснюватись вручну, у зв'язку з малими об'ємами ферменту (6 кг).

Готовий ферментений препарат слід зберігати в сухому місці, без потрапляння прямих сонячних променів. Фермент зберігає свою активність набагато довше, при зберіганні при температурі нижче 25 °С. Продукт не можна заморожувати[66].

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

У зв'язку з наявністю стадії осадження цільового продукту, передбачається підготовка водно-спиртового розчину для осадження. А також необхідна підготовка водно-спиртового розчину для промивання осаду під час фільтрації на друк-фільтрі, для запобігання його забивання. Весь розчин готується разом з 96 % етанолу та води і надходить на потрібні стадії.

5.4. Підбір технологічного обладнання для доферментаційних стадій

5.4.1. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування та стерилізації поживного середовища.

1. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 2,5 м³

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,7$:

$$V_{Аг} = V_A / K_{зб} = 211,7 / 0,7 = 302,5 \text{ л}$$

Вибираємо з додатку найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{нр} = 400 \text{ л}$.

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

$$N_p = V_{Аг} / V_{нр} = 302,5 / 400 = 0,75 \text{ приймаємо } 1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора: $K_{зр} = V_A / (V_{нр} \cdot N_p) = 211,7 / (400 \cdot 1) = 0,53$.

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), замовляємо у виробника інший геометричний об'єм реактора – 250 л. Тоді уточнений коефіцієнт заповнення становитиме

$$K_{зр} = 211,7/(250 \cdot 1) = 0,84$$

Отже, приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1.

б) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції Б. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,7$:

$$V_{Вг} = V_{В}/K_{зб} = 9,3/0,7 = 13,3 \text{ л}$$

Вибираємо з додатку найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{нр} = 20 \text{ л}$.

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

$$N_{р} = V_{Вг}/V_{нр} = 20/20 = 1. \text{ Приймаємо} - 1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора: $K_{зр} = V_{В}/(V_{нр} N_{р}) = 9,3/(20 \cdot 1) = 0,47$. Оскільки даний реактор є з великий, замовляємо реактор об'ємом 15 л.

в) Композиція В готується в лабораторному посуді та стерилізується в автоклаві, тому розрахунок ємнісної апаратури для неї не проводиться.

г) Композиція Г готується в лабораторному посуді і стерилізується «холодною» стерилізацією, тому розрахунок ємнісної апаратури для неї не проводиться.

е) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування піногасника для ферментера.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,7$:

$$V_{пг} = V_{п}/K_{зб} = 6,75/0,7 = 9,6 \text{ л}$$

Вибираємо з додатку найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{нр} = 10 \text{ л}$.

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

$N_p = V_{\text{пр}}/V_{\text{нр}} = 9,6/10 = 0,96$. Приймаємо – 1 од.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора: $K_{зр} = V_{\text{п}}/(V_{\text{нр}} N_p) = 6,75/(10 \cdot 1) = 0,7$.

2. *Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 250 л.*

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,7$:

$$V_{\text{Аг}} = V_{\text{А}}/K_{зб} = 17/0,7 = 24,3 \text{ л}$$

Вибираємо з додатку найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 30 \text{ л}$.

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

$$N_p = V_{\text{Аг}}/V_{\text{нр}} = 20/30 = 0,66 \text{ приймаємо } 1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора: $K_{зр} = V_{\text{А}}/(V_{\text{нр}} N_p) = 17/(30 \cdot 1) = 0,56$.

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), замовляємо у виробника інший геометричний об'єм реактора – 20 л. Тоді уточнений коефіцієнт заповнення становитиме

$$K_{зр} = 17/(20 \cdot 1) = 0,85$$

Отже, приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1.

б) Композиція Б готується в лабораторному посуді та стерилізується в автоклаві, тому розрахунок ємнісної апаратури для неї не проводиться.

3. *Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 25 л.*

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,7$:

$$V_{\text{Аг}} = V_{\text{А}}/K_{зб} = 12,223/0,7 = 17,46 \text{ л}$$

Вибираємо з додатку найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 20$ л

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить: $N_p = V_{\text{АГ}}/V_{\text{нр}} = 17,46/20 = 0,87$. Приймаємо -1 од.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{\text{зр}} = V_{\text{А}}/(V_{\text{нр}} N_p) = 12,223/(20 \cdot 1) = 0,61$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), замовляємо у виробника інший геометричний об'єм реактора – 15 л. Тоді уточнений коефіцієнт заповнення становитиме

$$K_{\text{зр}} = 12,223/(15 \cdot 1) = 0,81$$

Отже, приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1.

Композиції В готуються в лабораторному посуді та стерилізуються в автоклаві, тому розрахунок ємнісної апаратури для них не проводиться.

Також, окремо готується розчин мікроелементів 100 мл для посівного апарата, інокулятора та колб. Оскільки його готують в лабораторному посуді та стерилізують в автоклаві, тому розрахунок ємнісної апаратури не проводиться.

5.5. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях

I. Маса абсолютно сухої біомаси (АСБ) в культуральній рідині становить, кг:

$$G_{\text{асб}} = V_{\text{кр}} \times X_{\text{кр}} = 1,150 \times 10 = 11,5$$

II. Маса абсолютно сухого ферменту (АСФ) в культуральній рідині становить, кг:

$$G_{\text{асф}} = V_{\text{кр}} \times P_{\text{кр}} = 1,150 \times 0,78 = 0,9$$

III. Кількість абсолютно сухих речовин в культуральній рідині, що пішли на подальшу переробку, кг:

$$G_{\text{сркр}} = G_{\text{асб}} + G_{\text{асф}} = 11,5 + 0,9 = 12,4$$

1. Маса КР, що йде на подальшу переробку складає, кг:

$$G_{кр} = V_{кр} \times \rho_{кр} = 1,150 \times 1050 = 1\,208$$

при густині КР $\rho_{кр} = 1010 \dots 1100$ кг/м³. Приймаємо $\rho_{кр} = 1050,0$

2. Маса КР складається з маси сухих речовин та води $G_{кр} = G_{сркр} + G_{в}$, тоді маса води в КР становить, кг:

$$G_{в} = G_{кр} - (G_{асб} + G_{аф}) = 1\,208 - (11,5 + 0,9) = 1\,196$$

3. Загальна активність КР при активності $A_{кр1} = 820$ Од/мл:

$$A_{кр} = A_{кр1} \times 10^6 \cdot V_{кр} = 820 \cdot 10^6 \times 1,150 = 9,4E+08$$

5.5.1 Центрифугування культуральної рідини

Втрати продукту при центрифугуванні $E_{цф} = 0,05$.

1. Загальна кількість волого осадку, що видаляється з $V_{кр}$ при вологості осадку $W_{ос} = (65-85\%)$, приймаємо $W_{ос} = 0,70$, складе, кг:

$$G_{осб} = G_{асб} / (1 - W_{ос}) = 11,5 / (1 - 0,7) = 38,3$$

2. Маса розчиненого цільового продукту у фільтраті з врахуванням втрат при центрифугуванні, кг:

$$G_{аф1} = G_{аф} \times (1 - E_{цф}) = 0,9 \times (1 - 0,05) = 0,855$$

3. Кількість води у фільтраті, кг:

$$G_{вф} = G_{в} \times (1 - E_{фТ}) - G_{асб} \times (W_{ос} / (1 - W_{ос})) = 1\,196 \times (1 - 0,05) - 11,5 \times (0,7 / (1 - 0,7)) = 1\,109$$

4. Кількість фільтрату після центрифугування, кг:

$$G_{фТ} = G_{аф1} + G_{вф} = 0,855 + 1\,109 = 1\,110$$

5. Втрати при центрифугуванні, кг:

$$G_{втц} = G_{кр} - G_{фТ} - G_{осб} = 1\,208 - 1\,110 - 38,3 = 59,7 \text{ кг}$$

6. Активність фермента у фільтраті з урахуванням втрат активності $A_{ц} = 0,02$ при центрифугуванні $A_{ц}$, од/мл:

$$A_{фТ} = A_{кр1} - (A_{кр1} \times A_{ц}) = 820 - (820 \times 0,02) = 804$$

7. Об'єм фільтрату при густині фільтрату $\rho_{ф} = 1010$ (1010... 1050 кг/м³), л

$$V_{фТ} = G_{фТ} \times 1000 / \rho_{ф} = 1\,110 \times 1000 / 1\,010 = 1\,099$$

5.5.2. Концентрування розчину цільового продукту методом ультрафільтрації

Приймаємо ступінь концентрування $K_{уф} = 14$, втрати при ультрафільтрації, частка $E_{уф} = 0,05$.

1. Маса абсолютно сухого ферменту після ультрафільтрації з врахуванням втрат, кг:

$$G_{аф\text{уф}} = G_{аф1} \times (1 - E_{уф}) = 0,855 \times (1 - 0,05) = 0,812$$

2. Маса води в концентраті після ультрафільтрації з врахуванням втрат, кг:

$$G_{в\text{уф}} = G_{вф} \times (1 - E_{уф}) / K_{уф} = 1\,109 \times (1 - 0,05) / 14 = 75,3$$

3. Маса концентрату, кг

$$G_{кон} = G_{аф\text{уф}} + G_{в\text{уф}} = 0,812 + 75,3 = 76,1$$

4. Маса пермеату $G_{пм}$ після ультрафільтрації з врахуванням втрат, кг:

$$G_{пм} = (G_{фт} - G_{кон}) \times (1 - E_{уф}) = (1110 - 76,1) \cdot (1 - 0,05) = 982,2 \text{ кг}$$

5. Втрати при ультрафільтрації, кг

$$G_{вт\text{у}} = G_{фт} - G_{кон} - G_{пм} = 1110 - 76,1 - 982,2 = 51,7$$

6. Активність фермента в концентраті з урахуванням втрат $A_{уф} = 0,02$, од/мл:

$$A_{кон} = A_{фт} \times K_{уф} - (A_{фт} \times A_{уф} \times K_{уф}) = 804 \times 14 - (804 \times 0,02 \times 14) = 11031$$

7. Об'єм концентрату цільового продукту при густині концентрату $\rho_{кон} = 1150$ (1100... 1200 кг/м³), л:

$$V_{кон} = G_{кон} \times 1000 / \rho_{кон} = 76,1 \times 1000 / 1150 = 66,2$$

6. Вміст сухих речовин в концентраті становить, мас. %

$$C_{P_{кон}} = G_{аф\text{уф}} \times 100 / G_{кон} = 0,812 \times 100 / 76,1 = 1,1$$

5.5.3. Осадження ферменту 70 % етанолом.

1. Співвідношення концентрату лакази та етанолу 1: 1,67 ($C_{ет} = 1,67$).

Кількість 70% етанолу, кг:

$$G_{ет} = G_{кон} \times 1,67 = 76,1 \times 1,67 = 127,1$$

Кількість суспензії, кг: $G_{с\text{у}\text{с}} = G_{кон} + G_{ет} = 76,1 + 127,1 = 203,2$

1. Маса абсолютно сухого ферменту після осадження з врахуванням втрат

$$E_{oc} = 0,58, \text{ кг}$$

$$G_{афос} = G_{афуф} \times (1 - E_{oc}) = 0,812 \times (1 - 0,58) = 0,341$$

2. Активність фермента після осадження з урахуванням втрат $A_{oc} = 0,6$; од/г

$$A_{осф} = A_{кон} - (A_{кон} \times A_{oc}) = 11031 - (11031 \times 0,6) = 4412$$

5.5.4. Фільтрування осадженого ферменту на друк-фільтрі

1. Маса абсолютно сухого ферменту після фільтрування з врахуванням втрат ($E_{ф} = 0,05$), кг:

$$G_{аффт} = G_{афос} \times (1 - E_{ф}) = 0,341 \times (1 - 0,05) = 0,324$$

2. Маса волого ферменту після фільтрування з врахуванням ступеня вологості осаду $W_{oc} = 60-80\%$, приймаємо $W_{oc} = 0,7$, кг:

$$G_{осф} = G_{аффт} / (1 - W_{oc}) = 0,324 / (1 - 0,7) = 1,1$$

3. Маса фільтрату (водно-спиртової суміші) з врахуванням втрат ($E_{ф} = 0,05$), кг:

$$G_{фт2} = (G_{сус} - G_{осф}) \times (1 - E_{ф}) = (203,2 - 1,1) \times (1 - 0,05) = 192$$

4. Втрати при фільтруванні, кг

$$G_{втф2} = G_{сус} - G_{осф} - G_{фт2} = 203,2 - 1,1 - 192 = 10,1$$

5. Промивка осаду 70% етанолом (1:2). Кількість 70% етанолу, кг:

$$G_{ет2} = G_{осф} \times 2 = 1,1 \times 2 = 2,2$$

6. Кількість фільтрата (водно-спиртової суміші), кг

$$G_{ф2} = (G_{осф} - G_{аффт}) + G_{ет2} = (1,1 - 0,324) + 2,2 = 2,9$$

7. Активність фермента в осаді після фільтрації з урахуванням втрат $A_{ф} = 0,03$, од/г:

$$A_{оф} = A_{осф} - (A_{осф} \times A_{ф}) = 4412 - (4412 \times 0,03) = 4280$$

5.5.5. Сушіння осадженого ферменту у вакуум-сушільній шафі.

1. Маса абсолютно сухого ферменту після сушіння з врахуванням втрат $E_{сш} = 0,11$; кг $G_{асф} = G_{аффт} \times (1 - E_{сш}) = 0,324 \times (1 - 0,11) = 0,288$

2. Маса сухого фермента з врахуванням залишкової вологи $W_{гп} = 10\%$ (0,1), кг:

$$G_{сф} = G_{асф} / (1 - W_{гп}) = 0,288 / (1 - 0,10) = 0,32$$

3. Маса видаленої вологи, кг

$$W_{\text{вш}} = G_{\text{оф}} - G_{\text{сф}} = 1,1 - 0,32 = 0,78$$

4. Втрати фермента під час сушіння, кг

$$G_{\text{всш}} = G_{\text{оф}} - G_{\text{асф}} - W_{\text{вш}} = 1,1 - 0,288 - 0,78 = 0,032$$

4.Активність сухого фермента з урахуванням втрат активності при сушці $A_{\text{сш}} = 0,10$; од/г:

$$\begin{aligned} A_{\text{сф}} &= (A_{\text{оф}} \times G_{\text{оф}} / G_{\text{сф}}) - (A_{\text{оф}} \times A_{\text{сш}} \times G_{\text{оф}} / G_{\text{сф}}) = \\ &= (4280 \times 1,1 / 0,32) - (4280 \times 0,10 \times 1,1 / 0,32) = 13241 \end{aligned}$$

5.5.6. Подрібнення сухого фермента (втрати при подрібненні $E_{\text{пд}} = 0,5 \%$), кг

$$G_{\text{пдф}} = G_{\text{сф}} \times (1 - E_{\text{пд}}) = 0,32 \times (1 - 0,005) = 0,318$$

Втрати при подрібненні $G_{\text{вп}} = G_{\text{сф}} - G_{\text{пдф}} = 0,32 - 0,318 = 0,002 \text{ кг} = 2 \text{ г}$

5.5.7. Просіювання подрібненого сухого фермента (втрати при просіюванні $E_{\text{пр}} = 0,5 \%$), кг

$$G_{\text{прс}} = G_{\text{пдф}} \times (1 - E_{\text{пр}}) = 0,318 \times (1 - 0,005) = 0,317$$

Втрати при просіюванні $G_{\text{впр}} = G_{\text{пдф}} - G_{\text{прс}} = 0,318 - 0,317 = 0,001 \text{ кг} = 1 \text{ г}$

5.5.8. Розрахунок кількості наповнювача (TiO_2) до стандартної активності $A_{\text{ст}} = 5000$ при отриманні ферментного препарату в умовних кг.

1. Витрати наповнювача, кг:

$$G_{\text{нап}} = G_{\text{цу}} - G_{\text{сф}} \cdot (A_{\text{сф}} - A_{\text{ст}}) / (A_{\text{ст}}) = 6,98 - 0,317 \cdot (13241 - 5000) / (5000) = 6,46$$

2.Кількість готового сухого продукту, умов.кг:

$$G_{\text{стп}} = G_{\text{сш}} / C_{\text{стп}} + G_{\text{нап}} = 0,317 + 6,46 = 6,78$$

5.5.9. Фасування готового продукту.

Маса 1 упаковки, кг $G_{\text{уп1}} = 1,00$

1. Кількість умовного продукту з врахування втрат при фасуванні $E_{\text{уп}} = 0,01$, кг:

$$G_{\text{уп}} = G_{\text{стп}} \cdot (1 - E_{\text{уп}}) = 6,78 \cdot (1 - 0,01) = 6,71$$

2. Кількість упаковок N:

$$N = G_{\text{уп}} / G_{\text{уп1}} = 6,71 / 1,00 = 6,0$$

Похибка розрахунку, %

$$\Delta = |G_{\text{цу}} - G_{\text{уп}}| \cdot 100 / G_{\text{цу}} = (6,98 - 6,71) \cdot 100 / 6,98 = 3,87 \%$$

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Вихідними даними для складання таблиці специфікацій обладнання, контрольно-вимірювальних приладів (КВП) та систем автоматизації з їх технічними характеристиками є розрахунок обладнання наведений в розділі 5, підрозділах 5.4. та 5.5.

Апаратурні схеми наведені в графічній частині проекту.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки одержання лакази культивуванням *Coriolus versicolor*

| Позиція | Найменування | Кількість | Технічна характеристика (виробник) |
|---------|-------------------------------|-----------|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| ПЗ-1 | Повітрязабірник | 1 | Обладнаний металевією решіткою для видалення механічних часток. Продуктивність 100 л/хв. |
| Ф-2 | Фільтр грубої очистки повітря | 1 | Фільтруючий матеріал – поліестер, швидкість фільтрування 100 м ³ /год, Е = 90% |
| К-3 | Компресор | 1 | Компресор Einhell TC-AC 190/24/8 (Німеччина), продуктивність 100 м ³ /год |
| Т-4 | Теплообмінник-охолоджувач | 1 | Теплообмінник-охолоджувач фірми «4Power» продуктивність 100 м ³ /год |
| Р-5 | Ресивер | 1 | Ресивер зварний сталевий «Харпромтех» (Україна) з максимальним робочим тиском 1,0 МПа |

| | | | | | | | | | | |
|-----------|------|-----------------|--------|------|--------------------------------------|--|--|-------------|------|---------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ</i> | | | | | |
| Зм. | Арк. | № документа | Підпис | Дата | Розділ 6. Специфікація обладнання | | | | | |
| Розробив | | Підгерська Т.О. | | | | | | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Консульт. | | | | | | | | | 83 | 148 |
| Керівник | | Карлаш Ю.В. | | | | | | Кафедра БТМ | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | | | |
| Зав.каф. | | Пирог Т.П. | | | | | | | | |

Продовження табл.6.1

| | | | |
|---|---|---|---|
| Т-6 | Теплообмінник-нагрівач | 1 | Теплообмінник-нагрівач фірми Realvent (Росія), продуктивність 100 м ³ /год |
| Ф-7 | Фільтр тонкої очистки | 1 | Фільтруючий матеріал з високоякісного вологостійкого склопаперу. Е = 99,995 %, швидкість фільтрування 100 м ³ /год |
| Ф-8 Ф-11 Ф-13 Ф-17 Ф-19 Ф-28 | Фільтр індивідуальної очистки | 6 | Фільтри ФТОВ (Росія), фільтруючий матеріал – ультратонке скловолокно, Е = 99,999 % |
| РЗ-9 | Реактор-змішувач об'ємом 15 л для приготування та стерилізації композиції А для інокулятора | 1 | Реактор-змішувач об'ємом 15 л з сорочкою нагріву. Матеріал нержавіюча сталь AISI 304 |
| Н-10 Н-16 Н-25 | Насос відцентровий | 4 | Насос відцентровий Раско серії NMS (Бельгія). Продуктивність 15 м ³ /год |
| Ін-12 | Інокулятор об'ємом 25 л | 1 | Біореактор об'ємом 25 л. Оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм |
| Д-14 Д-20 Д-23 | Дозатор об'ємно-ваговий | 4 | Ваговий дозатор ФС-75. Фірма ТехноМашСтрой (Україна). Продуктивність 1-50 кг |
| РЗ-15 | Реактор-змішувач об'ємом 20 л для приготування та стерилізації композиції А для посівного апарата | 1 | Реактор-змішувач об'ємом 20 л. Оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм, нержавіюча сталь AISI 304 |
| Па-18 | Посівний апарат об'ємом 250 л | 1 | Апарат об'ємом 250 л Оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. |

Продовження табл.6.1

| | | | |
|--------|---|---|--|
| РЗ-21 | Реактор-змішувач об'ємом 250 л для приготування та стерилізації композиції А для ферментера | 1 | Реактор-змішувач із нержавіючої сталі об'ємом 250 л з перемішуючим пристроєм та сорочкою нагріву, нержавіюча сталь AISI 304. |
| Н-22 | Насос гвинтовий | 1 | Дозуючі гвинтові насоси фірми Bellin серії E (Італія). Продуктивність – 3 м ³ /год. |
| РЗ-24 | Реактор-змішувач об'ємом 15 л для приготування композиції В для ферментера | 1 | Реактор-змішувач об'ємом 15 л для розчинення солей, фірми Romm, з мішалкою та з сорочкою нагріву, нержавіюча сталь AISI 304. |
| М-26 | Мірник об'ємом 10 л для приготування та стерилізації піногасника для ферментера | 1 | Мірник об'ємом 10 л. Оснащений паровою сорочкою, нержавіюча сталь AISI 304. |
| Н-27 | Насос перистальтичний | 1 | Насос перистальтичний серії Dynamik LR, швидкість потоку до 15 л/год. |
| ФР-29 | Ферментер об'ємом 2,5 м ³ | 1 | Біореактор об'ємом 2500 л. Оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Нержавіюча сталь. Є датчик температури, піни, рН, O ₂ , нержавіюча сталь AISI 304. |
| З-30 | Збірник культуральної рідини | 1 | Збірник для культуральної рідини об'ємом 1,6 м ³ , обладнаний паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм, матеріал нержавіюча сталь AISI 304 |
| Н-31 | Насос відцентровий | 1 | Насос відцентровий Раско серії NMS (Бельгія). Продуктивність 15 м ³ /год |
| Ц-32 | Центрифуга фільтрувальна | 1 | Промислова центрифуга СЕРА Z 81. Продуктивність 100-200 л/год. Максимальна швидкість центрифугування 16 000 об/хв. Оснащена регулятором швидкості та цифровим індикатором. Нержавіюча сталь. |
| УФУ-33 | Ультрафільтраційна установка | 1 | Установка продуктивністю 1 м ³ /год. Розмір пор мембрани 5 нм. |
| М-34 | Мірник | 1 | Мірник об'ємом 160 л. Нержавіюча сталь AISI 304. |
| Р-35 | Реактор хімічний | 1 | Реактор об'ємом 200 л. з перемішувальним пристроєм, без сорочки нагріву. Нержавіюча сталь AISI 304. |

Закінчення табл.6.1

| | | | |
|-------|-----------------------|---|--|
| Р-36 | Реактор для осадження | 1 | Реактор хімічний об'ємом 250 л з перемішувальним пристроєм (лопатевою мішалкою). Нержавіюча сталь AISI 304. |
| Н-37 | Насос відцентровий | 1 | Насос відцентровий Cdlf4-50, продуктивність 168 л/год, матеріал нержавіюча сталь AISI 304. Країна-виробник Китай. |
| Ф-38 | Друк-фільтр | 1 | Друк-фільтр на замовлення об'ємом $V_p=0,01$ м ³ від фірми ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.». Робочий надлишковий тиск, $P= 0,6$ МПа. Допустима температура стінки в корпусі від -20 до +200 °С. |
| СВ-39 | Вакуум-сушарка | 1 | Вакуум-сушильна шафа на замовлення до 5 кг завантаження від фірми Стандарт-М. Температура нагріву від +5 до +200°С. Автоматичне регулювання та підтримка температури. Вбудований аналоговий вакуумметр. Камера і полки – нержавіюча сталь AISI 304. Цифрова настройка температури з точністю в один градус |
| М-40 | Млин | 1 | Лабораторний млин ударної дії SK 100. Швидкість 2850 об/хв. Матеріал нержавіюча сталь - AISI 304. Об'єм приймальної посудини до 5 л. Кінцева тонкість помелу 100 мкм (0,1 мм). |
| С-41 | Сито | 1 | Сито лабораторне (переносне) для просіювання лакази. Розмір пор 0,1 мм. |
| ЗБ-42 | Барабанний-змішувач | 1 | Змішувач-барабанний. Маса одного завантаження до 11 кг, тривалість одного циклу перемішування 7-10 хв. Продуктивність 85 кг/год. |
| СП-43 | Стіл пакувальний | 1 | Стіл для ручного фасування та пакування ферменту в поліетиленові пакети. |

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема виробництва ферменту лакази включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів, підготовка та стерилізація піногасника, підготовка розчину спирту для осадження ферменту, підготовка та стерилізація поживного середовища) технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, виробничий біосинтез, відділення біомаси, концентрування, осадження, фільтрація, висушування, подрібнення, просіювання, стандартизація), а також стадія фасування та пакування і стадія знешкодження відходів.

Технологічні схеми наведено в графічній частині проекту.

ДР 1. Підготовка стерильного аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря необхідно здійснювати в місцях де кількість мікроорганізмів є меншою. Для цього забір повітря здійснюють на певній висоті – 2-3 м над висотою промислової будівлі.

Оскільки висота промислової будівлі становить 9,2 м (7,2 м висота стін, 0,5 м висота фундаменту та 1,5 м висота даху), то забір повітря буде здійснюватися на висоті 12,2 м за допомогою повітрозбірника ПЗ-1.

ДР 1.2. Очищення повітря від пилу і механічних часточок

На даній стадії повітря очищається від різних пилових та механічних домішок за допомогою фільтра грубої очистки Ф-2. Ступінь очищення становить 90%.

| | | | | | | | | |
|------------------|-------------|------------------------|---------------|-------------|---|--------------------|-------------|----------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ</i> | | | |
| <i>Зм.</i> | <i>Арк.</i> | <i>№ документа</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | <i>Розділ 7. Опис технологічної схеми</i> | <i>Літ.</i> | <i>Арк.</i> | <i>Акрушів</i> |
| <i>Розробив</i> | | <i>Підгерська Т.О.</i> | | | | | | |
| <i>Консульт.</i> | | | | | | | <i>87</i> | <i>148</i> |
| <i>Керівник</i> | | <i>Карлаш Ю.В.</i> | | | | <i>Кафедра БТМ</i> | | |
| <i>Н. Контр.</i> | | | | | | | | |
| <i>Зав.каф.</i> | | <i>Пирог Т.П.</i> | | | | | | |

ДР 1.3. Стиснення повітря

Наступним етапом підготовки повітря є його стискання у компресорі К-3 до 0,35-0,5 МПа. При цьому температура повітря підвищується до 120-250 °С.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Щоб забезпечити видалення вологи з повітря, температуру повітря знижують до «точки роси» в теплообміннику-охолоджувачі Т-4. При цьому температура становить 25-30 °С. Це необхідно для запобігання осідання вологи на фільтрах, що може призвести до злипання волокон і зменшення ефективності фільтра. Далі за допомогою резивера Р-5 повітря стабілізується, його волога знижується до 60-70 %.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Наступним етапом є нагрівання повітря до 50-70 °С для забезпечення надійної роботи фільтрів другого і третього рівнів. Це відбувається в теплообміннику-нагрівачі Т-6.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Далі повітря очищають за допомогою головного фільтра або фільтра тонкої очистки Ф-7. Ступінь очистки повітря становить $E = 99,995 \%$.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Остання стадія очистки повітря від забруднення – це очистка в індивідуальному фільтрі Ф-8. Ступінь очищення повітря становить $E=99,999 \%$.

ДР 2. Приготування титрувальних розчинів

ДР 2.1. Приготування титрувальних розчинів для підтримки сталого рН під час культивування

ДР 2.1.1. Приготування 6% НСІ для підтримки сталого рН під час культивування.

Оскільки в результаті споживання амінного азоту *C. versicolor* МТСС 138 відбувається підлучнення культуральної рідини, то для підтримки рН на оптимальному рівні для продуцента (рН=5,0) необхідно приготувати 6% розчин

HCl. 6 % розчин HCl готується із стерильної води та 38 % розчину HCl. Кислота не потребує стерилізації. Готовий розчин за потреби додається до інокулятора Ін-12 об'ємом 25 л, посівного апарата Па-18 об'ємом 250 л та виробничого ферментера ФР-29 об'ємом 2,5 м³ під час підключення культуральної рідини за сигналом датчика рН.

ДР 2.1.2. Підготовка 6 % NaOH для підтримки сталого рН під час культивування.

Для підключення середовища використовують 6 % розчин NaOH. Розчин NaOH готують з використанням дистильованої води. Розчин стерилізують при 131 °C протягом 40 хв (P=0,15 МПа). Він додається до Ін-12, Па-18 та ФР-29 на стадіях після стерилізації магнієвих, кальцієвих і фосфорних солей для доведення рН від 4,0 – 4,5 до 5,0, що є оптимальним для продуцента, а також на стадії після стерилізації 2,5-ксилідину.

ДР 2.2. Приготування титрувальних розчинів для стерилізації солей

Для того, щоб мати можливість стерилізувати магнієві, кальцієві і фосфорні солі разом, необхідно довести рН до 4,0 – 4,5. Для цього використовують 0,6 н розчин HCl.

ДР 2.2.1. Приготування розчину HCl для стерилізації солей для інокулятора об'ємом 25 л.

Солі композиції В підкислюються 0,6 н нестерильним розчином соляної кислоти з розрахунку 2 мл на 1 л розчину. Кількість 0,6 н розчину соляної кислоти для підкислення композиції Б становить $0,4 \times 2 = 0,8$ мл. Розчин передають до ДР 5.3.2., де буде проходити стерилізація солей.

ДР 2.2.2. Приготування розчину HCl для стерилізації солей в посівному апараті об'ємом 250 л.

Солі композиції В підкислюються 0,6 н нестерильним розчином соляної кислоти з розрахунку 2 мл на 1 л розчину. Кількість 0,6 н розчину соляної кислоти

для підкислення композиції Б становить $2 \times 2 = 4$ мл. Розчин передають до ДР 5.4.2., де буде проходити стерилізація солей.

ДР 2.2.3. Приготування розчину HCl для стерилізації солей у ферментері об'ємом 2,5 м³.

Солі композиції В підкислюються 0,6 н нестерильним розчином соляної кислоти з розрахунку 2 мл на 1 л розчину. Кількість 0,6 н розчину соляної кислоти для підкислення композиції В становить $9,3 \times 2 = 18,6$ мл. Розчин передають до реактора РЗ-24 стадії ДР 5.5.2.

ДР 3. Приготування та стерилізація піногасника

ДР 3.1. Приготування та стерилізація синтетичного піногасника для інокулятора

Для піногасіння ми обираємо силікони, оскільки вони є досить ефективними. Піногасник подається при появі піни на кожній стадії культивування в концентрації 0,5% [53].

Для інокулятора кількість піногасника буде становити 56 мл. Його стерилізують в автоклаві у колбі об'ємом 100 мл. Режим стерилізації 160 °C протягом 2 год. Піногасник подають до інокулятора Ін-12 на стадію ТП 6.5.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація синтетичного піногасника для посівного апарата

Для посівного апарата кількість піногасника буде становити 681 мл. Його стерилізують в автоклаві у колбі об'ємом 1 л при температурі 160 °C протягом 2 год. Подають до посівного апарата Па-18 на стадію ТП 6.6

ДР 3.3. Приготування та стерилізація синтетичного піногасника для ферментера

Для ферментера кількість піногасника буде становити 6,75 л. Піногасник стерилізують в мірнику М-26 об'ємом 10 л та за допомогою насоса перистальтичного Н-27 подають у ферментер ФР-29 при появі піни (до ТП 7.1).

ДР 4. Підготовка спирту

ДР 4.1. Підготовка водно-спиртового розчину етанолу

Для осадження та промивання осаду лакази використовуємо 70 % розчин етанолу, який готується на питній воді та 96 % етанолі. Для осадження ферменту потрібно 127,1 кг розчину етанолу, а для промивання осаду – 1,8 кг етанолу. Тобто загальна кількість розчину, яку необхідно приготувати становить 129 кг.

Переводимо кг в л. Густина 70 % розчину етанолу становить $\rho=0,883$ кг/л. Отже кількість 70 % розчину спирту в л становить: $129/0,883=161,25$ л. Для приготування 1 л 70 % розчину етанолу потрібно 729,2 мл 96 % етанолу та 297,2 мл води. Розраховуємо кількість 96 % етанолу: $0,7292 \times 161,25 = 117,6$ л або 94 кг спирту потрібно для приготування 161,25 л. Розраховуємо кількість води: $0,2972 \times 161,25 = 47,9$ л або 47,9 кг води потрібно. Під час змішування води і спирту зменшується об'єм суміші в порівнянні з арифметичною сумою вихідних речовин. В реактор Р-35 об'ємом 200 л вносимо спочатку воду, а після цього додаємо спирт з мірника М-34 об'ємом 160 л. Розчин подається в необхідній кількості на стадії ТП 10.1 до реактора Р-36 та ТП 11.1. до друк-фільтра Ф-38.

ДР 5. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 5.1 Приготування розчину мікроелементів

У зв'язку із малою концентрацією мікроелементів їх готуємо окремо для культивування в колбах на качалках, інокуляторі та посівному апараті у вигляді концентрованого розчину. Зважуємо на аналітичних вагах компоненти згідно *табл. 7.1*. Засипаємо їх у колбу на 200 мл, добавляємо дистильовану воду у кількості $100 - 5,48 = 94,52$ мл. Ретельно перемішуємо до розчинення. Добавляємо розчин мікроелементів до композицій Б у кількості згідно *табл. 7.1*

Таблиця 7.1

Розрахунок вмісту мікроелементів в різних об'ємах поживного середовища

| Об'єм середовища, л | MnSO ₄ ·4H ₂ O, г | ZnSO ₄ ·7H ₂ O, г | CuSO ₄ ·5H ₂ O, г | Заг. маса, г | Об'єм, мл |
|---------------------|---|---|---|--------------|-----------|
| 123,9 | 0,124 | 0,124 | 0,247 | 0,495 | 92 |
| 12,5 | 0,0125 | 0,0125 | 0,025 | 0,05 | 8 |
| 1,16 | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,004 | 0,1 |
| Разом | 0,137 | 0,137 | 0,274 | 0,548 | 100 |

Відходами даного етапу є пакувальні матеріали від компонентів для приготування розчину, вони надходять на утилізацію до ЗВ17.2, а також мийні та промивні води, що надходять на знешкодження до ЗВ17.3

ДР 5.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Вміст компонентів для приготування 1, 160 л середовища наведено в табл.

7.2

Таблиця 7.2

Композиції для приготування та стерилізації 1,160 л середовища для качалочних колб

| Компонент поживного середовища | Концентрація г/л | Вміст компонента у 1,160 л середовища, г | Вода, мл | Композиція | Об'єм, мл |
|--------------------------------------|------------------|--|----------|------------|-----------|
| <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3'</i> | <i>4</i> | <i>5</i> | <i>6'</i> |
| Глюкоза | 20 | 23,2 | 1 097 | А | 1 124 |
| L – аспарагін | 2,5 | 2,9 | | | |
| D, L–фенілаланін | 0,15 | 0,17 | | | |
| Аденін | 0,0275 | 0,03 | | | |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,5 | 0,58 | 12 | Б | 24 |
| CaCl ₂ | 0,01 | 0,01 | | | |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,01 | 0,01 | | | |
| KH ₂ PO ₄ | 1 | 1,16 | 23 | В | 51 |
| Разом | 24,2 | 28 | 1 132 | | 1 160 |

Відходами даного етапу є пакувальні матеріали від компонентів ПС, вони надходять на утилізацію до ЗВ17.2, а також мийні та промивні води, що надходять до ЗВ17.3

ДР 5.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 23,2 г глюкози, 2,9 г L – аспарагіну, 0,17 г D, L–фенілаланіну та 0,03 г аденіну. Наважки переносять у колбу об'ємом 2 л і додають 1 097 мл дистильованої води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевым корком, стерилізують в автоклаві при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 хв ($P=0,05\text{ МПа}$).

ДР 5.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,58 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 0,01 г CaCl_2 . Наважки переносять у колбу об'ємом 100 мл і додають 12 мл дистильованої води, сюди ж додають розчин мікроелементів (від ДР 5.1) в кількості 0,1 мл, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевым корком, стерилізують в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 хв ($P=0,15\text{ МПа}$).

ДР 5.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 1,16 г KH_2PO_4 . Наважку переносять у колбу об'ємом 100 мл і додають 23 мл дистильованої води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевым корком, стерилізують в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 хв.

Качалочні колби попередньо миють та стерилізують сухим жаром протягом 2 год при $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ у сухому стерилізаторі[67].

Після цього приготовлений та простерилізований об'єм поживного середовища, в ламінарному боксі під факелом зливаємо у колбу об'ємом 2 л, перемішуємо і розливаємо у 9 простерилізованих качалочних колб об'ємом 750 мл по 126 мл, закриваємо ватно-марлевым корком.

ДР 5.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 25 л.

Для культивування в інокуляторі об'ємом 25 л, з робочим об'ємом 13,77 л, необхідно приготувати 12,5 л поживного середовища.

Вміст компонентів для приготування 12,5 л середовища показано у *табл. 7.3.*

Таблиця 7.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 12,5 л середовища

| Компонент поживного середовища | Вміст, г/л | Вміст компонента у 12,5 л середовища, г | Вода, л | Конденсат, л | Композиція | Об'єм, л |
|--------------------------------------|------------|---|---------|--------------|------------|----------|
| Глюкоза | 20 | 250 | 10,66 | 1,22 | А | 12,223 |
| L – аспарагін | 2,5 | 31,25 | | | | |
| D , L – фенілаланін | 0,15 | 1,875 | | | | |
| Аденін | 0,0275 | 0,344 | | | | |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,5 | 6,25 | 0,32 | 0 | Б | 0,42 |
| CaCl ₂ | 0,01 | 0,125 | | | | |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,01 | 0,125 | | | | |
| KH ₂ PO ₄ | 1 | 12,5 | | | | |
| Разом : | | 302,5 | 10,98 | 1,22 | | 12,5 |

Відходами даного етапу є пакувальні матеріали від компонентів ПС, вони надходять на утилізацію до ЗВ17.2, а також мийні та промивні води, що надходять на знешкодження до ЗВ17.3.

ДР 5.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 250 г глюкози, 31,25 г L – аспарагіну, 1,875 г D , L–фенілаланіну та 0,344 г аденіну. Наважки переносять в реактор РЗ-9 об'ємом 15 л і додають 10,66 л води, перемішують. Стерилізують в при t = 112 °С 30 хв (P=0,05 МПа). Після цього за допомогою відцентрового насоса Н-10 передають в інокулятор Ін-12.

ДР 5.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 6,25 г MgSO₄·7H₂O, 0,125 г FeSO₄·7H₂O та 0,125 г CaCl₂, 12,5 г KH₂PO₄. У колбу об'ємом 1 л вносимо кислоту від ДР 2.2.1,

наважки солей та 320 мл дистильованої води, перемішуємо. Сюди ж вносимо розчин мікроелементів (від ДР 5.1) в кількості 8 мл. Колбу закривають ватно-марлевым корком, стерилізують в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 хв ($P=0,15\text{ МПа}$).

Після стерилізації композиції В її вміст зливаємо в ламінарному боксі під факелом в попередньо простерилізовану колбу з носиком об'ємом 1 л і передаємо до інокулятора Ін-12 за допомогою простерилізованої силіконової трубки, самоплином, під факелом, приєднавши трубку до вентиля.

ДР 5.4. Приготування та стерилізація поживного середовища вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 250 л

Для культивування в посівному апараті об'ємом 250 л, з робочим об'ємом 136,3 л необхідно приготувати 124 л поживного середовища.

Вміст компонентів для приготування 124 л середовища наведено у *табл. 7.4*.

Таблиця 7.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 124 л середовища

| Компонент поживного середовища | Вміст, г/л | Вміст компонента у 124 л середовища, г | Вода, л | Конденсат, л | Композиція | Об'єм, л |
|---|------------|--|---------|--------------|------------|----------|
| Глюкоза | 20 | 2 480 | 13,2 | 1,0 | А | 17 |
| L – аспарагін | 2,5 | 310 | | | | |
| D, L– фенілаланін | 0,15 | 18,6 | | | | |
| Аденін | 0,0275 | 3,4 | | | | |
| KH_2PO_4 | 1 | 124 | 1,8 | 0 | В | 2,0 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,5 | 62 | | | | |
| CaCl_2 | 0,01 | 1,24 | | | | |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,01 | 1,24 | | | | |
| Стерилізація композиції В у посівному апараті | | | 94 | 11,1 | | 105 |
| Разом | | 3 000 | 108,9 | 12,1 | | 124 |

Відходами даного етапу є пакувальні матеріали від компонентів ПС, вони надходять на утилізацію до ЗВ17.2, а також мийні та промивні води, що надходять на знешкодження до ЗВ17.3.

ДР 5.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через ваговий дозатор Д-14 подають 2 480 г глюкози, на технічних вагах зважують 310 г L – аспарагіну, 18,6 г D , L–фенілаланіну та 3,4 г аденіну. Компоненти додають в реактор РЗ-15 об'ємом 20 л, доливають 13,2 л води, перемішують. Стерилізують в при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 хв ($P=0,05\text{ МПа}$). Після цього за допомогою відцентрового насоса Н-16 передають в посівний апарат Па-18.

ДР 5.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 124 г $\text{KН}_2\text{PО}_4$, 62 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,24 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 1,24 г CaCl_2 . У колбу об'ємом 3 л вносимо 0,6 н розчин HCl в кількості 4 мл (від ДР 2.2.2.), вносять наважки солей, додають 2 л води, сюди ж вносять розчин мікроелементів (від ДР 5.1) в кількості 92 мл. Суміш солей перемішують. Розчин передаємо в посівний апарат Па-18 та додаємо 94 л води. Стерилізують при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 хв ($P=0,15\text{ МПа}$).

ДР 5.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування у ферментері об'ємом 2,5 м³

Для культивування у ферментері об'ємом 2,5 м³, з робочим об'ємом 1,350 м³, необхідно приготувати 1,227 м³ поживного середовища.

Вміст компонентів для приготування 1,227 м³ середовища наведено у *табл. 7.5*.

Таблиця 7.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1,227 м³ середовища

| Компонент поживного середовища | Вміст, кг/м ³ | Вміст компонента у 1,227 м ³ середовища кг | Вода, л | Конденсат, л | Композиція | Об'єм, л |
|--------------------------------|--------------------------|---|---------|--------------|------------|----------|
| Глюкоза | 10 | 12,3 | 159,5 | 18 | А | 211,7 |
| Крохмаль | 15 | 18,4 | | | | |

Продовження табл.7.5

| | | | | | | |
|--------------------------------------|------------|-------|-------|-----|---|-------|
| Дріжджовий екстракт | 2,5 | 3,1 | | | | |
| D, L-фенілаланін | 0,15 | 0,18 | | | | |
| Аденін | 0,027 5 | 0,03 | | | | |
| KH ₂ PO ₄ | 1 | 1,23 | 7,5 | 0 | Б | 9,3 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,5 | 0,61 | | | | |
| CaCl ₂ | 0,01 | 0,012 | | | | |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,01 | 0,012 | | | | |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 0,001 | 0,001 | | | | |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,001 | 0,001 | | | | |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,001 | 0,001 | 0,040 | 0 | В | 0,041 |
| 2,5-ксилідин | 0,12 | 0,147 | 1,85* | 0 | Г | 2 |
| Вода у ферментер | | | 905 | | | 905 |
| Конденсат у ферментері | | | | 101 | | 101 |
| Разом | | 35,89 | 1 072 | 119 | | 1 227 |

Відходами даного етапу є пакувальні матеріали від компонентів ПС, вони надходять на утилізацію до ЗВ17.2, а також мийні та промивні води, що надходять на знешкодження до ЗВ17.3.

ДР 5.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через ваговий дозатор Д-20 подають 18,4 кг крохмалю в реактор РЗ-21 об'ємом 250 л, додають 159,5 л води, перемішують. Крохмаль суспендується у холодній воді, потім нагрівають вміст реактора до температури 70 – 90 °С подачею пари у сорочку апарату і, витримуючи при такій температурі упродовж 20 – 30 хв., проводять розварювання. Після цього через ваговий дозатор додають 12,3 кг глюкози, 3,1 кг дріжджового екстракту, перемішують. На технічних вагах зважують 30 г аденіну та 180 г D, L-фенілаланіну. Наважки переносять у той же реактор, перемішують. Стерилізують в при $t = 112$ °С 30 хв ($P=0,05$ МПа). Після цього передають у ферментер ФР-29 за допомогою гвинтового насоса Н-22.

ДР 5.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Через ваговий дозатор Д-27 подають 1,23 кг KH_2PO_4 , у реактр РЗ-28 об'ємом 15 л. На технічних вагах зважують 610 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12 г CaCl_2 , 1 г $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. У реактор об'ємом 15 л вносять HCl в кількості 18,6 мл (від ДР 2.2.3.), додають наважки солей та воду в кількості 7,5 л, перемішують. Розчин передають у ферментер ФР-29 за допомогою відцентрового насоса Н-25 та додають 905 л води, перемішують. Суміш солей стерилізують при $t = 131\text{ }^\circ\text{C}$ 40 хв ($P=0,15\text{ МПа}$).

ДР 5.5.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 1 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Наважку переносять у колбу на 100 мл та додають дистильовану воду до загального об'єму 41 мл. Колбу закривають ватно-марлевим корком та стерилізують в автоклаві при $t = 131\text{ }^\circ\text{C}$ 40 хв ($P=0,15\text{ МПа}$).

Після стерилізації композиції В її вміст зливаємо в ламінарному боксі під факелом в попередньо простерилізовану колбу з носиком об'ємом 1 л і передаємо до ферментера ФР-29 на 96 годині культивування за допомогою простерилізованої силіконової трубки, самоплином, під факелом, приєднавши трубку до вентиля.

ДР 5.5.4. Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних вагах зважують 147 г 2,5-ксилідину. Наважку переносять у колбу на 3 л і додають 1,85 л 50% етанолу. Суміш перемішують і проводять «холодну стерилізацію», оскільки речовина є термолабільною. Суміш пропускають через мембранний фільтр, з діаметром пор 0,22 мкм.

Після стерилізації композиції Г її вміст зливаємо в ламінарному боксі під факелом в попередньо простерилізований балон об'ємом 3 л і передаємо до ферментера ФР-29 на 96 годині культивування.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *C. versicolor* МТСС 138 зберігають у пробірках зі скошеним агаризованим середовищем, на картопляно-декстрозному агарі (КДА). Це найпоширеніший метод зберігання штамів. Переваги цього способу – це простота і доступність. Пересіви здійснюють через 2-3 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 6.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Колекційну культуру, що зберігається у пробірках з КДА, розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі з агаризованим середовищем і вирощують при температурі 28°C впродовж 72 год.

ТП 6.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі

Отримані ізолювані колонії (від ТП 6.2.) пересівають петлею в пробірки зі скошеним КДА (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Вирощують гриби при 28 °С впродовж 72 годин.

ТП 6.4. Вирощування культури в колбах на качалках

У пробірку з робочою культурою *C. versicolor* МТСС 138, вирощену на КДА, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану клітинну суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем (від ДР 5.2.). Для засіву однієї колби використовують клітинну суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивують на качалках (150 об/хв) при температурі 28 °С і рН 5,0 протягом 72 год. Всі операції по засіву качалочних колб проводять в ламінарному боксі під факелом. Мийні та промивні води, що утворюються на даній стадії, надходять до ЗВ17.3 для утилізації.

ТП 6.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 25 л

В боксі в асептичних умовах у попередньо простерилізовану спеціальну колбу з носиком об'ємом 1 л зливають розчини композиції Б (від ДР 5.3.2.) і отриманий розчин асептично через простерилізовану силіконову трубку,

самоплином, під факелом, передають у інокулятор Ін-12, сюди ж передають композицію А з реактора РЗ-9 (від ДР 5.3.1.). Вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-м розчином NaOH (від ДР 2.1.2) рН середовища за показником датчика рН до 5,0. Також в асептичних умовах вносять 1,27 л посівного матеріалу (від ТП 6.4.). Піногасник подається від ДР 3.1. За сигналом датчика рН відбувається подача HCl від (від ДР 2.1.1.) або NaOH (від ДР 2.1.2.). В процесі вирощування відбувається постійна подача стерильного стисненого повітря до культуральної рідини (від ДР 1.7). Тривалість процесу складає 72 год при температурі 28 °С, рН 5,0, частота обертів мішалки 150 об/хв. Відпрацьоване повітря, яке містить спори гриба надходить на стадію знешкодження газоподібних відходів ЗВ17.1. Мийні та промивні води, що утворюються на даній стадії, надходять до ЗВ17.3 для утилізації.

ТП 6.6. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 250 л

В асептичних умовах у простерилізований посівний апарат Па-18 об'ємом 250 л, де вже містяться солі композиції Б (від ДР 5.4.2)., передають композицію А (від ДР 5.4.1) з реактора РЗ-15 об'ємом 20 л. Вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-м розчином NaOH (від ДР 2.1.2) рН середовища за показником датчика рН до 5,0. Також в асептичних умовах вносять 12,4 л посівного матеріалу з інокулятора Ін-12 об'ємом 25 л (від ТП 6.5.) через трубу перетискування. Піногасник подається від ДР 3.2. За сигналом датчика рН відбувається подача HCl від (від ДР 2.1.1.) або NaOH (від ДР 2.1.2.). В процесі культивування подається стерильне стиснене повітря до культуральної рідини в асептичних умовах (від ДР 1.7). Тривалість процесу складає 72 год при температурі 28 °С, рН 5,0, частота обертів мішалки 150 об/хв. Відпрацьоване повітря, яке містить спори гриба надходить на стадію знешкодження газоподібних відходів ЗВ17.1. Мийні та промивні води, що утворюються на даній стадії, надходять до ЗВ17.3 для утилізації.

ТП 7. Біосинтез

7.1. Виробниче культивування

Виробниче культивування здійснюють у ферментері ФР-29 з об'ємом 2,5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,54. Робочий об'єм ферментера 1,35 м³.

У ферментер, де міститься простерилізований розчин солей (від ДР 5.5.2), передають за допомогою гвинтового насоса Н-22 простерилізовану композицію А (від ДР 5.5.1) з реактора РЗ-21 об'ємом 250 л. Вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-м розчином NaOH (від ДР 2.1.2) рН середовища за показником датчика рН до 5,0. Також передають посівний матеріал об'ємом 122,7 л з посівного апарата Па-18 (від ТП 6.6.) за допомогою труби перетискування. За сигналом датчика піни відбувається подача піногасника за допомогою перистальтичного насоса Н-31 з мірника М-26 (від ДР 3.3). За сигналом датчика рН відбувається подача HCl (від ДР 2.1.1.) або NaOH (від ДР 2.1.2.). В процесі культивування в асептичних умовах відбувається постійна подача стисненого стерильного повітря до культуральної рідини (від ДР 1.7). На 96 годині в асептичних умовах вносять композицію В (від ДР 5.5.3.) Також вносять композицію Г (від ДР 5.5.4.). Тривалість процесу складає 144 год при температурі 28 °С, рН 5,0, частота обертів мішалки 150 об/х. Відпрацьоване повітря, яке містить спори гриба надходить на стадію знешкодження газоподібних відходів ЗВ17.1. Мийні та промивні води, що утворюються на даній стадії, надходять до ЗВ17.3 для утилізації.

ТП 8. Відділення біомаси

ТП 8.1. Центрифугування

Зі збірника культуральної рідини З-30 в кількості 1 150 л. за допомогою насоса Н-31 культуральна рідина надходить до центрифуги Ц-32. Культуральну рідину в кількості 1 208 кг (1 150 л) центрифугують при 8000 об/хв (8000 × g) протягом 20 хв або при 6000 об/хв протягом 30 хв. В результаті ми отримуємо 1 110 кг (1 099 л) супернатанту, що іде до збірника ультрафільтраційної

установки УФУ-33 на стадію ТП9.1. З цього 1 109 кг– це вода, а 0,855 кг – це розчинений фермент. Втрати становлять 55,7 кг. Загальна кількість волого осаду, що видаляється з культуральної рідини становить 38,3 кг. Осад іде на знешкодження твердих відходів до ЗВ 17.2.

Активність ферменту у супернатанті становить 804 од/мл.

ТП 9. Концентрування супернатанту

ТП9.1. Концентрування супернатанту ультрафільтрацією

Концентрування здійснюється шляхом пропускання супернатанту від ТП 8.1 крізь мембрану ультрафільтраційної установки УФУ-33. Розміри пор мембрани 5 нм. В процесі ультрафільтрації отримуємо 76,1 кг (66,2 л) концентрату, що іде до реактора для осадження Р-36 на стадію ТП 10.1. Відходом даного етапу є 982,2 кг пермеату, що надходить до ЗВ17.3. Втрати становлять 51,7 кг.

Активність ферменту становить 11 031 од/мл.

ТП 10. Осадження

ТП 10.1. Осадження лакази етанолом

Осадження відбувається в реакторі з лопатевою мішалкою Р-36 об'ємом 250 л. До 76,1 кг (66,2 л) концентрату ферменту отриманого від ультрафільтраційної установки УФУ-33 на стадії ТП 9.1. додаємо 70 % розчин спирту отриманий від реактора Р-35 стадії ДР 4.1 в кількості 127,1 кг (144 л). В результаті ми отримуємо 203,2 кг (210 л) суспензії, що надходить на стадію ТП 11.1.

Активність ферменту становить 4 412 од/мл.

ТП 11. Відділення осаду фільтрацією

ТП 11.1. Фільтрація осаду лакази

В результаті осадження лакази, утворюється осад ферменту, що потрібно відділити від водно-спиртового розчину. Для цього використовуємо друк-фільтр Ф-38, що дає змогу провести захищений режим фільтрації даного

пожежонебезпечного осаду, так як він містить пари етанолу. Осад лакази від реактора Р-36 надходить до друк-фільтра Ф-38 за допомогою насоса Н-37. Промивка осаду 70% етанолом відбувається у співвідношенні 1:2, кількість етанолу становить 1,8 кг (2 л). Етанол надходить від реактора Р-35 стадії ДР 4.1. В результаті ми отримуємо ферментний препарат з вологістю 60 % в кількості 0,9 кг, який іде на стадію ТП 12.1. Втрати становлять 10,1 кг. Кількість фільтрату становить 192 кг. Його направляють на регенерацію. Маса вологого ферменту становить 1,1 кг.

Активність фермента в осаді після фільтрації 4 280 од/г.

ТП 12. Видалення вологи висушуванням

ТП 12.1. Висушування лакази

Процес висушування лакази здійснюється у вакуум-сушильній шафі СВ-39. Вологий фермент від друк-фільтра Ф-38 стадії ТП 11.1 вручну розкладають на листах целофану, після цього його закладають у шафу на полиці. Товщина шару осаду має бути не більше 0,5 см. Включають шафу (вакуум) і починають проводити обігрів. Температура сушіння 30 °С. Висушування проводиться до тих пір поки вологість ферменту не стане 10 %. В результаті ми отримуємо сухий фермент маса якого становить 0,320 кг з активність 13 241 од/г, що надходить на стадію ТП 13.1. Втрати становлять 0,032 кг. Маса видаленої вологи – 0,78 кг. Процес супроводжується виділенням відпрацьованого повітря, що містить часточки лакази, тому відпрацьоване повітря направляємо на знешкодження до ЗВ17.1.

ТП 13. Подрібнення

ТП 13.1. Подрібнення лакази на лабораторному ударному млині

Після етапу сушіння від ТП 12.1, 0,32 кг лакази у вигляді сухих корок потрібно подрібнити в ступці і засипати для подальшого більш тонкого подрібнення до лабораторного ударного млина М-40. Млин подрібнює фермент

до помелу середнього розміру. Діаметр частинок після подрібнення становить $d_k = 0,1$ мм. Втрати при подрібненні становлять 2 г. Після подрібнення фермент в кількості 318 г надходить на стадію ТП 14.1 для просіювання.

ТП 14. Просіювання

ТП 14.1. Просіювання порошку лакази на лабораторному ситі

Подрібнений фермент, отриманий після ударного лабораторного млина М-40 стадії ТП 13.1, просіюють на лабораторному переносному ситі С-41 вручну. Діаметр пор в ситі має становити до 0,1 мм. Втрати становлять 1 г. Відсів передають на попередню стадію для більш тонкого подрібнення. Далі просіяний фермент в кількості 317 г передається на стадію ТП 15.1.

ТП 15. Стандартизація

ТП 15.1. Змішування порошку лакази з наповнювачем

В якості наповнювача використовуємо титан діоксиду. Змішування лакази із наповнювачем здійснюємо за допомогою барабанного змішувача для сипких порошків, частота обертів якого становить 6-8 об/хв. В барабанний змішувач ЗБ-42 надходить порошок лакази від ТП 14.1 в кількості 0,317 кг, туди ж додається наповнювач в кількості 6,46 кг. Тривалість одного циклу перемішування становить 7-10 хв.

Активність стандартизованого ферменту має становити 5000 од/г. Фермент в кількості 6,78 кг надходить на фасування і пакування на стадію ПМВ16.1.

Відходами даного етапу є пакувальні матеріали від наповнювача, вони надходять на утилізацію до ЗВ17.2.

ПМВ 16. Фасування та пакування

ПМВ 16.1. Фасування та пакування готового ферменту

Стандартизований сухий фермент надходить від ТП 15.1. Фасування та пакування здійснюється вручну. Пакування здійснюється на пакувальному столі СП-43. На вагах відважується по 1 кг ферменту і запаковується у поліетиленові

пакети. За один цикл необхідно упакувати 6,78 кг ферменту. В результаті ми отримаємо 6 упаковок по 1 кг. Запаковані пакети складаються у картонні туби або коробки і відправляються на склад готової продукції.

ЗВ 17. Знешкодження відходів

ЗВ 17.1. Знешкодження газоподібних відходів

Для того, щоб очистити відпрацьоване повітря, яке утворюється в процесі культивування застосовують систему «циклон + фільтр сітчастий». Відділення від повітря крапельної вологи призводить до видалення з рідиною до 90% клітин та їх спор[68].

ЗВ 17.2. Знешкодження твердих відходів

Для утилізації твердих відходів, таких як пакувальні матеріали, в яких зберігалась сировина для приготування поживного середовища, їх необхідно попередня відсортувати та передати до пунктів переробки вторинної сировини.

Для переробки та утилізації міцелію гриба використовується метод вермикультивування[69].

ЗВ 17.3. Знешкодження рідких відходів

Очистка стічних вод здійснюється за допомогою модульних установок типу БТ, що працюють з використанням біотенка[70].

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічному контролю піддається поживне середовище, посівний матеріал та культуральна рідина.

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ здійснюють шляхом посіву проби простерилізованого поживного середовища на чашки Петрі з такими агаризованими поживними середовищами: СА – для виявлення грибів і дріжджів та МПА – для виявлення бактерій.

Чашки Петрі стерилізують за допомогою сухого жару, розливають в них по 20-30 мл розплавленого поживного середовища. Чашки витримують протягом 2-3 діб при температурі 30 °С кришками донизу до повного застигання середовища. Посіви проводять шляхом відбору стерильною піпеткою 0,1 мл з об'єма проби простерилізованого поживного середовища і нанесення цієї проби на поверхню певного поживного середовища. Пробу рівномірно розподіляють по поверхні середовища використовуючи стерильний шпатель Дригальського. Чашки з посівами завертають у папір і поміщають у термостат, інкубують при температурі 30-32 °С. Посіви аналізують, починаючи з 6-8 години. На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізму [45].

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу проводять такими методами: розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами і шляхом мікроскопіювання культури, використовуючи метод «роздавлена крапля». Метою є визначення мікробіологічної чистоти посівного матеріалу, тобто відсутність сторонньої мікробіоти.

| | | | | | | | | |
|------------------|-------------|------------------------|---------------|-------------|---|-------------|-------------|--------------------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ</i> | | | |
| <i>Зм.</i> | <i>Арк.</i> | <i>№ документа</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | <i>Розділ 8. Контроль виробництва</i> | <i>Літ.</i> | <i>Арк.</i> | <i>Акрушів</i> |
| <i>Розробив</i> | | <i>Підгерська Т.О.</i> | | | | | <i>106</i> | <i>148</i> |
| <i>Консульт.</i> | | | | | | | | |
| <i>Керівник</i> | | <i>Карлаш Ю.В.</i> | | | | | | |
| <i>Н. Контр.</i> | | | | | | | | |
| <i>Зав.каф.</i> | | <i>Пирог Т.П.</i> | | | | | | <i>Кафедра БТМ . . .</i> |

Перевіряють як посівний матеріал на кожній стадії вирощування, так і культуральну рідину в процесі виробничого біосинтезу.

Посівну культуру або культуральну рідину розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) – для виявлення дріжджів і грибів.

Культуральні ознаки. *Coriolus versicolor* МТСС 138 добре культивується на щільних поживних середовищах. Утворює густий розгалужений, септований міцелій, з численними пряжками одиночного типу. На сусло-агарі (СА) - штам володіє помірним зростанням; формує присадкуватий шкірястий повітряний міцелій з яскраво вираженими концентричними колами; край колонії рівний, злегка піднятий [16].

Мікроскопіювання проводять методом «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному спиртом предметному склі. На скло наносять невелику краплю посівного матеріалу або культуральної рідини. Краплю розподіляють по склу використовуючи бактеріальну петлю. Мазок висушують на повітрі, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Далі на сухий препарат скляною паличкою наносять 1–2 краплини імерсійного масла. Після завершення роботи імерсійний об'єктив протирають ватою, змоченою етиловим спиртом [71].

Якщо у зразку не міститься сторонньої мікробіоти, то під час мікроскопіювання можна побачити міцелій септований, тонкий, незабарвлений з пряжками [16].

Генеративні гіфи важко помітні, тонкостінні, септовані, з пряжками, 2-4 мкм в діаметрі. Скелетні гіфи товстостінні, не розгалужені, не септовані, довгі, 4-6 мкм в діаметрі. Базидії довжиною 10-15 мкм і шириною 4-5 мкм. Спори циліндричні довжиною 5,5-6,0 мкм і шириною 1,5-2,5 мкм, гладенькі [17].

8.2.Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю доферментаційних процесів та біосинтезу лакази

| Номер контрольної точки та назва стадії | Об'єкт контролю та показник, що визначається | Засоби та методи контролю | Періодичність перевірки та відбору проб | Нормативна характеристика показника |
|--|---|---|--|---------------------------------------|
| <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> |
| Кт 1.2 <i>Очищення повітря від пилу і механічних часточок</i> | Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків | Манометр, перевірка ступеня очищення відповідно до паспорту фільтра | Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення | E = 90 %, тиск відповідно до паспорту |
| Кт 1.3 <i>Стиснення повітря</i> | Стиснене повітря, температура, тиск | Манометр, термометр | Після стиснення повітря | P=0,35–0,5 МПа t=120–250 °C |
| Кт 1.4 <i>Охолодження повітря та видалення вологи</i> | Охоложене повітря, температура Повітря після видалення зайвої вологи | Термометр технічний Психрометричний метод | Після охолодження повітря Після видалення зайвої вологи | t = 25–40 °C W=60-70 % |
| Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i> | Нагріте повітря, температура | Термометр технічний | Після нагрівання повітря | t = 50-70 °C |
| Кт 1.6 <i>Очищення повітря в головному фільтрі</i> | Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків | Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра | Після очистки повітря в фільтрі тонкого очищення | E = 99,995% |

Продовження табл.8.1

| | | | | |
|---|---|--|--|--|
| Кт, Км 1.7 <i>Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i> | Очищене повітря, ступінь очищення | Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра | Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі | E = 99,999% Відсутність мікробіоти |
| Кх, Км 2.1.1 <i>Приготування 6% НСІ для підтримки сталого рН під час культивування.</i> | Концентрація, відсутність мікробіоти. | Мікробіологічний контроль | Контролюють концентрацію Відсутність мікробіоти | C=6% Відсутність мікробіоти |
| Кт, Кх, Км 2.1.2 <i>Підготовка 6 % розчину NaOH для підтримки сталого рН під час культивування.</i> | Тиск, час, температура, концентрація, відсутність мікробіоти. | Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль | Під час стерилізації безперервно вимірюють температуру, тиск, контролюють концентрацію, відсутність мікробіоти перевіряють після стерилізації. | P = 0,15 МПа, t = 131°C, τ = 40 хв, C=6 % відсутність мікробіоти |
| Кх 2.2.1 <i>Приготування розчину НСІ для стерилізації солей в інокуляторі об'ємом 25 л.</i> | Концентрація, відсутність мікробіоти | Мікробіологічний контроль | Контролюють концентрацію Відсутність мікробіоти | C=0,6 н Відсутність мікробіоти |
| Кх 2.2.2 <i>Приготування розчину НСІ для стерилізації солей в інокуляторі об'ємом 250 л.</i> | Концентрація, відсутність мікробіоти | Мікробіологічний контроль | Контролюють концентрацію Відсутність мікробіоти | C=0,6 н Відсутність мікробіоти |
| Кх 2.2.3 <i>Приготування розчину НСІ для стерилізації солей у ферментері об'ємом 2,5 м³.</i> | Концентрація, відсутність мікробіоти | Мікробіологічний контроль | Контролюють концентрацію Відсутність мікробіоти | C=0,6 н Відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 3.1 | Силіконовий піногасник, | Годинник, термометр, | Під час стерилізації безперервно | t = 160 °C, |

Продовження табл.8.1

| | | | | |
|---|---|--|--|--|
| <i>Підготовка та стерилізація синтетичного піногасника для інокулятора</i> | час, температура, відсутність мікробіоти | мікробіологічний контроль | визначається температура, після стерилізації визначається відсутність мікробіоти | $\tau = 2$ год, відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 3.2 <i>Підготовка та стерилізація синтетичного піногасника для посівного апарата</i> | Силіконовий піногасник, час, температура, відсутність мікробіоти | Годинник, термометр, мікробіологічний контроль | Під час стерилізації безперервно визначається температура, після стерилізації визначається відсутність мікробіоти | $t = 160$ °С, $\tau = 2$ год, відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 3.3 <i>Підготовка та стерилізація синтетичного піногасника для ферментера</i> | Силіконовий піногасник, час, температура, відсутність мікробіоти | Годинник, термометр, мікробіологічний контроль | Під час стерилізації безперервно визначається температура, після стерилізації визначається відсутність мікробіоти | $t = 160$ °С, $\tau = 2$ год, відсутність мікробіоти |
| Кх 4.1 <i>Підготовка водно-спиртового розчину етанолу</i> | Водно-спиртовий розчин етанолу, концентрація | Хімічний контроль | Після приготування | W=70 % |
| Кт, Км 5.2.1 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках</i> <i>Приготування та стерилізація композиції А</i> | Композиція А Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти | Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль | Під час стерилізації безперервно визначається температура, тиск, мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації | P = 0,05 МПа, $t = 112$ °С, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти |

Продовження табл.8.1

| | | | | |
|---|---|---|---|--|
| <p>Кт, Км 5.2.2. <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках</i></p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції Б</i></p> | <p>Композиція Б Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти</p> | <p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p> | <p>Під час стерилізації безперервно визначається температура, тиск, мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації</p> | <p>P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p> |
| <p>Кт, Км 5.2.3. <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках</i></p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції В</i></p> | <p>Композиція В Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти</p> | <p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p> | <p>Під час стерилізації безперервно визначається температура, тиск, мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації</p> | <p>P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p> |
| <p>Кт, Км 5.3.1. <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 25 л.</i></p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції А</i></p> | <p>Композиція А Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти</p> | <p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p> | <p>Під час стерилізації безперервно визначається температура, тиск, мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації</p> | <p>P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p> |
| <p>Кт, Км 5.3.2. <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 25 л.</i></p> | <p>Композиція Б Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти</p> | <p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p> | <p>Під час стерилізації безперервно визначається температура, тиск мікробіологічний</p> | <p>P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p> |

Продовження табл.8.1

| | | | | |
|---|---|--|--|--|
| <i>Приготування та стерилізація композиції Б</i> | | | контроль здійснюється після стерилізації | |
| Кт, Км 5.4.1. <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 250 л</i> <i>Приготування та стерилізація композиції А</i> | Композиція А Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти | Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль | Під час стерилізації безперервно визначається температура, тиск, мікробіологічний контроль | P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти |
| Кт, Кх, Км 5.4.2. <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 250 л</i> <i>Приготування та стерилізація композиції Б</i> | Композиція Б Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти | Манометр, термометр, рН-метр годинник, мікробіологічний контроль | Під час стерилізації безперервно визначається температура, тиск, мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації | P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, рН=4,0-4,5 відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 5.5.1. <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування у ферментері об'ємом 2,5 м³</i> <i>Приготування та стерилізація композиції А</i> | Композиція А Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти | Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль | Під час стерилізації безперервно визначається температура, тиск, мікробіологічний контроль | P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти |
| Кт, Кх, Км 5.5.2. <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для</i> | Композиція Б Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти | Манометр, термометр, годинник, | Під час стерилізації безперервно визначається | P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, |

Продовження табл.8.1

| | | | | |
|--|---|--|--|---|
| культивування у ферментері об'ємом 2,5 м ³ Приготування та стерилізація композиції Б | | рН-метр, мікробіологічний контроль | температура, мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації | рН=4,0-4,5 відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 5.5.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування у ферментері об'ємом 2,5 м ³ Приготування та стерилізація композиції В | Композиція В Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти | Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль | Під час стерилізації безперервно визначається температура, мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації | P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 5.5.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування у ферментері об'ємом 2,5 м ³ Приготування та стерилізація композиції Г | Композиція Г Діаметр пор фільтра, відсутність мікробіоти | Манометр | Діаметр пор фільтруючого елемента визначають за методом точки бульбашки, мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації | Ø = 0,22 мкм, відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 6.1 Підтримання колекційної культури | Колекційна культура <i>Coriolus versicolor</i> МТСС 138 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій | Термометр, мікробіологічний контроль | Мікробіологічний контроль та пересіви культури проводять через 2-3 місяці | t = 2-4 °С, τ = 2-3 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти |

Продовження табл.8.1

| | | | | |
|---|--|---|---|--|
| <p>Кт, Км 6.2 <i>Одержання робочої культури на агаризованому середовищі</i></p> | <p>Колекційна культура <i>Coriolus versicolor</i> МТСС 138 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій</p> | <p>Термометр, мікробіологічний контроль</p> | <p>Мікробіологічний контроль проводять через кожні 8 год</p> | <p>t = 28 °С, τ = 3 доби, відсутність сторонньої мікробіоти</p> |
| <p>Кт, Км 6.3 <i>Вирощування культури на агаризованому середовищі</i></p> | <p>Колекційна культура <i>Coriolus versicolor</i> МТСС 138 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій</p> | <p>Термометр, годинник мікробіологічний контроль</p> | <p>Мікробіологічний контроль проводять через кожні 8 год</p> | <p>t = 28 °С, τ = 3 доби, відсутність сторонньої мікробіоти</p> |
| <p>Кт, Км 6.4 <i>Вирощування культури в колбах на качалках</i></p> | <p>Посівний матеріал, Температура, час вирощування, частота обертів качалки, відсутність сторонньої мікробіоти</p> | <p>Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, мікробіологічний контроль</p> | <p>Протягом всього часу вирощування контролюється та автоматично підтримується частота обертів та температура, через кожні 8 годин проводять мікроскопіювання</p> | <p>t = 28 °С, τ = 72 год, w = 150 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p> |
| <p>Кт, Кх, Км 6.5 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 25 л</i></p> | <p>Посівний матеріал, Температура, час вирощування, частота обертів мішалки,</p> | <p>Термометр технічний, годинник, технічний тахометр,</p> | <p>Протягом всього часу вирощування контролюється та автоматично</p> | <p>t = 28 °С, τ = 72 год, w = 150 об/хв, рН = 5,0</p> |

Закінчення табл.8.1

| | | | | |
|---|---|--|---|---|
| | морфологія, відсутність сторонньої мікробіоти | датчик рН, датчик піноутворення мікроскоп | підтримується частота обертів, температура, рівень піни та рН, через кожні 8 годин проводять мікроскопіювання | відсутність сторонньої мікробіоти |
| Кт, Кх, Км 6.6 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 250 л</i> | Посівний матеріал, Температура, час вирощування, частота обертів мішалки, морфологія, відсутність сторонньої мікробіоти | Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення мікроскоп | Протягом всього часу вирощування контролюється та автоматично підтримується частота обертів, температура, рівень піни та рН, через кожні 8 годин проводять мікроскопіювання | t = 28 °С, τ= 72 год, w = 150 об/хв, рН = 5,0 відсутність сторонньої мікробіоти |
| Кт, Кх, Км 7.1 <i>Виробниче культивування</i> | Культуральна рідина, Температура, час вирощування, частота обертів мішалки, морфологія, відсутність сторонньої мікробіоти, активність ферменту, концентрація ферменту | Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення мікроскоп | Протягом всього часу вирощування контролюється та автоматично підтримується частота обертів температура, рівень піни та рН, через кожні 8 годин проводять мікроскопіювання | t = 28 °С, τ= 72 год, w = 150 об/хв, рН = 5,0, Р=0,78 мг/мл відсутність сторонньої мікробіоти А = 820 Од/мл |

8.3. Показники росту і синтезу лакази

8.3.1. Концентрація біомаси.

Біомасу відділяють центрифугуванням при 8000 об/хв протягом 20 хв[4].

Для визначення концентрації біомаси міцелій гриба висушують у сушильній шафі при температурі 105°C до постійної маси. Концентрацію біомаси розраховують у грамах абсолютно сухої речовини на 1 л середовища (додаток 17) [72].

8.3.2. Концентрація лакази.

Відділення біомаси відбувається за допомогою центрифугування при 8000 об/хв протягом 20 хв. Для подальших досліджень використовують супернатант культуральної рідини.

Методика визначення лаказної активності.

Присутність лакази визначають за зміною кольору при додаванні о-толідину (4,4'-діаміно-3,3'-диметилбіфеніл). Після додавання о-толідину на край колонії відбувається зміна кольору із зеленого до синього, що свідчить про утворення інтермедіату лакази (додаток 18) [73].

Лаказну активність визначають спектрофотометрично при довжині хвилі $\lambda = 420$ нм за величиною окиснення ферменту АВТС (2,2'-азинобіс (3-етилбензгіазолін-6-сульфонова кислота) як субстратом. Для дослідження використовують супернатант культуральної рідини, що отримують після центрифугування. Готують реакційну суміш, що містить 0,8 мл аліквоти культуральної рідини і 0,4 мл 1 мМ АВТС, 1,2 мл 0,1 М гліцерину та НСІ буферу (рН 3). В результаті взаємодії суміші, за рахунок окиснення АВТС лаказою, з'являється блакитно-зелений колір. В якості контролю використовують реакційну суміш без культуральної рідини, яка є безбарвною (розчин порівняння). Першу кювету заповнюють розчином порівняння, другу – реакційною сумішшю з лаказою. Будують графік. Одну одиницю активності

ферменту визначають як кількість ферменту, необхідного для окислення 1,0 мкмоль АВТS за хв. Активність лакази в культуральній рідині має становити 820 Од/мл (додаток 3) [4].

Концентрацію білка визначають за методом Бредфорда, використовуючи альбумін сироватки великої рогатої худоби як стандарт (додаток 1) [26].

Метод Бредфорда визначення білка включає зв'язування кумасі діамантового синього G-250 з білком. Зв'язування барвника з білком спричиняє зміщення максимуму поглинання барвника з 465 до 595 нм, при цьому відстежується збільшення поглинанням при 595 нм. Цей аналіз є дуже відтворюваним та швидким, завдяки тому, що процес зв'язування барвника практично закінчується приблизно за 2 хв з хорошою стійкістю кольору протягом 1 години. Немає ніяких втручань з боку катіонів, таких як натрій або калій, та вуглеводів, таких як сахароза.

Метод ґрунтується на тому, що барвник кумасі діамантовий синій G-250 при зв'язуванні з білком переходить із червоного кольору в синій [74].

Вимірювання кількості білка проводять спектрофотометричним методом при довжині хвилі 595 нм. Калібрувальну криву будують, використовуючи як стандарт розчин альбуміну сироватки бика (БСА) [75].

Реагенти. Кумасі діамантовий синій G-250 та 2-Меркаптоетанол були отримані від Sigma. Тритон X-100 був отриманий від Schwartz / Mann. Додецилсульфат натрію отримано від BDH Chemicals Ltd., Пул, Англія. Гемосол отримували від Scientific Products. Всі інші реагенти є загальнодоступними [74].

Приготування білкового реагенту. Кумасі діамантовий синій G-250 (100 мг) розчиняють в 50 мл 95% -го етанолу. Додають 100 мл 85%- го розчину фосфорної кислоти та об'єм отриманого розчину доводять до 1 л (кінцева концентрація кумасі G250 складала 0,01 %, етанолу – 4,7 %, ортофосфатної кислоти – 8,5%).

Білковий аналіз (стандартний метод). Беруть до 0,1 мл розчину білка (супернатант культуральної рідини), за допомогою піпетки переносять його в пробірки розміром 12 x 100 мм. Додають 0,1 мл фосфатного буфера. П'ять мл білкового реагенту додають до складу пробірки та вміст змішують.

Через 2 хв. визначають поглинання суміші при довжині хвилі 595 нм на спектрофотометрі. Будують графік залежності поглинання A_{595} від концентрації стандарту. Концентрацію білка (фермента) визначають по калібрувальній кривій [74].

Для визначення концентрації білка методом Бредфорда, використовують спектрофотометри (рис 8.1). Концентрація лакази має становити 0,78 мг/мл.



а)

б)

Рис.8.1. а) Спектрофотометр UNICO SpectroQuest 2800;

б) Спектрофотометр скануючий двопробеневий ULAB S 261UV

8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Глюкоза і крохмаль є джерелом вуглецю, а дріжджовий екстракт – джерелом амінного азоту.

Біомасу відділяють центрифугуванням як описано вище. Супернатант використовують для подальших досліджень [4].

Методика визначення концентрації джерела азотного живлення.

Вміст амінного азоту у ферментаційному середовищі та культуральній рідині визначають методом формольного титрування (додаток 19)[76].

Суть методу полягає у блокуванні формальдегідом вільних аміногруп при рН=7,0, а також титруванні NaOH еквівалентної кількості карбоксильних груп. Початок і кінець титрування фіксують потенціометрично.

Реактиви, що використовуються: очищена вода, розчин NaOH 0,1М чи HCl 0,1М, нейтральний розчин формалін, 10 %-й розчин NaOH.

У стакан місткістю 50 мл вносять 2 мл дослідного розчину ПС і доливають водою очищеною об'єм до мітки 20 мл. рН змінюють потенціометрично до значення 7,0 за допомогою розчину NaOH 0,1М або HCl 0,1М. До нейтрального розчину додають 2 мл нейтрального формаліну (рН доводять до 7,0 10 %-им розчином NaOH), змішують та титрують потенціометрично до значення рН 9,1 використовуючи розчин NaOH 0,1М.

Вміст амінного азоту в пробі (в мг%) рахують за формулою:

$$X = V \cdot K \cdot 1,4 \cdot 100 / 2$$

де, V – кількість розчину NaOH 0,1М в мл, що використовується для титрування зразка; K – поправка до титру розчину NaOH 0,1М;

1,4 – кількість амінного азоту в мг, еквівалентна 1 мл розчину NaOH 0,1М;

2 – об'єм зразка, мл [77].

Методика визначення концентрації джерела вуглецевого живлення.

Найбільш поширеним класичним методом визначення редукуючих цукрів є метод Бертрана. Однак він має певні недоліки, через які є досить трудомістким, зокрема використання великої кількості реактивів та через окислення оксиду міді (I) на повітрі. Великого поширення набув також ебуліостатичний метод визначення редукуючих речовин. Він виключив недолік методу Бертрана стосовно окиснення міді, однак не став менш трудомістким, так як при його виконанні необхідно підтримувати задану швидкість титрування. Однак, згодом був розроблений менш трудомісткий фотометричний метод, який усунув недоліки визначення редукуючих речовин, що були присутні в двох попередніх.

Суть методу полягає у реєстрації змін світлопоглинання мідно-лужного розчину в результаті реакції з аналізуючим розчином, що містить цукри (супернатант культуральної рідини).

Оптичну щільність розчинів при 620 нм виміряють на фотоколориметрі в кюветах (товщина робочого шару 1 см) відносно дистильованої води.

Для проведення даного методу визначення необхідно приготувати по 500 мл розчину 1 (до 8,65 г пентагідрату сульфату міді (II) додають дистильовану воду) і розчин 2 (25 г сегнетової солі, 2 г жовтої кров'яної солі і 37,5 г NaOH розчиняють у дистильованій воді).

В пробірці перемішують 2 мл розчину 1 і 2 та 2 мл аналізованого розчину, що містить редуруючі речовини (супернатант культуральної рідини). Після цього пробірку із сумішшю нагрівають впродовж 3 хв на киплячій бані. Далі суміш фотометрують. Проводили холосте визначення, при якому мідно-лужний розчин з додаванням аналізованого розчину не нагрівали, а одразу фотометрували, тобто виміряли початкову оптичну щільність реакційної суміші при 670 нм. Рівняння для визначення вмісту редуруючих цукрів (мг/мл) буде виглядати наступним чином:

$$РЦ = R \frac{A_{\text{кон}} - A_{\text{роб}} + 0,012}{0,2946}$$

R –ступінь розбавлення досліджуваного розчину; $A_{\text{кон}}$ – оптична густина холостого розчину; $A_{\text{роб}}$ – оптична густина робочого розчину; 0,012 – поправка, яка пов'язана зі збільшенням поглинання при 670 нм мідно-лужного розчину при нагріванні протягом 3 хв; 0,2946 – тангенс кута нахилу градууювальної кривої (додаток 20) [78].

8.4. Показники якості готового продукту

8.4.1. Визначення лаказної активності.

На всіх стадіях виділення та очищення лакази проводять аналіз її активності.

Реактиви:

- 1) о-діанізідиновий реактив: 50 мл 0,4 М фосфатного буфера, рН 5,9, 2 мл 1% спиртового розчину о-діанізідину і дистильованої води до 200 мл (реактив зберігають до 2 тижнів в посуді з темного скла на холоді);
- 2) 0,05% свіжоприготований розчин перекису водню;
- 3) розчин ферменту (культуральна рідина);
- 4) 50% розчин сірчаної кислоти.

У пробірки об'ємом 10 мл наливають 0,1-0,5 мл розчину ферменту, 3 мл о-діанізідинового реактиву, води до обсягу 4,8 мл і 0,2 мл 0,05% H_2O_2 . Попередньо всі розчини повинні бути нагріті до 20 °С. В останню чергу додають H_2O_2 , і пробірки занурюють у водяну баню (20 °С). Інкують 5 хв. Реакцію припиняють, додаючи 50% сірчану кислоту до обсягу 10 мл. Інтенсивність забарвлення вимірюють на фотоелектроколориметрі із зеленим фільтром (540 нм) в 10-міліметровій кюветі проти стандарту, який містить всі інгредієнти, що додаються в такій послідовності: вода, сірчана кислота, розчин ферменту, H_2O_2 . Активність визначають за значенням коефіцієнта мікромолярної екстинкції, що дорівнює 0,0128. Кількість перетворень H_2O_2 за 5 хв визначають за формулою:

$$C = A \times V_1 / 0,128 \times 1000 \times V_2 \times t,$$

де

C- активність лакази;

A - екстинкція;

V_1 - обсяг пофарбованої проби (мл);

0,128 - коефіцієнт мікромолярних екстинкції;

1000 - коефіцієнт для перерахунку з мілілітрів в літри;

V_2 - об'єм розчину ферменту (мл);

t - час реакції.

Одиниця активності лакази відповідає кількості ферменту, що каталізує перетворення 1 мкмоль H_2O_2 за 1 хв в оптимальних умовах [79].

8.4.2. Визначення активності лакази в сухому препараті.

У стаканчик для зважування поміщають аналізовану пробу сухого ферментного препарату масою 0,1 г і суспендують в невеликій кількості дистильованої води. Суспензію кількісно переносять в мірну колбу місткістю 100 мл, доводять обсяг до мітки дистильованою водою при температурі 20 ° С і ретельно перемішують.

Приготований розчин є основним розчином ферментного препарату.

Термін зберігання розчину в закритому скляному посуді при температурі 20 ° С - не більше 2 год [80].

Для подальшого визначення див. попередню методику, пункт 8.4.1.

Активність лакази у сухому готовому продукті має становити 5000 Од/г.

8.4.3. Визначення вологості готового продукту.

Апаратура, матеріали та реактиви: Ваги лабораторні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г. Шафа сушильна лабораторна з температурою нагріву до 200 ° С. Термометри ртутні скляні. Ексикатор діаметром 250 мм. Бюкси скляні.

Підготовка. При висушуванні проб в бюксах нижня частина контрольного термометра повинна знаходитися на рівні бюкс. Показання контрольного термометра є визначальними для настройки температури в шафі. Вентиляційні отвори сушильної шафи при сушінні проб повинні бути відкриті. Ваги повинні бути встановлені в сухому приміщенні з постійною температурою на міцному столі без вібрацій. Ваги і важки (гирі) повинні бути перевірені. Результати всіх зважувань реєструють в грамах з точністю до четвертого десяткового знака.

Для кожного аналізу повинні бути підготовлені три бюкси однакових діаметрів і висоти. Слід застосовувати бюкси висотою не більше 45 мм.

Бюкси і їх кришки повинні бути пронумеровані, знежирені, вимиті, висушені при 100-150 ° С, протягом 20-30 хв, охолоджені до кімнатної температури і перебувати в ексикаторі з вологовловлювачем.

Хід роботи. Для визначення вологості використовують 3 проби не менше 0,1 г. Для цього обирають бюкси діаметром від 20 до 25 мм. В приміщенні з вологість не більше 50 %, порошкоподібну пробу поміщають в попередньо зважену бюксу. Бюкси з пробами закривають кришками, зважують, знімають кришки і поміщають в сушильну шафу на полицю. Початком сушки вважається досягнення температури 105 ° С по контрольному термометру. Тривалість висушування становить 60 хв. Після закінчення сушки, бюкси швидко закривають кришками і переносять їх в ексікатор для охолодження до кімнатної температури протягом не менше 30 хв, після чого бюкси зважують і результати з точністю до четвертого десяткового знаку реєструють.

Вологість визначають у % по формулі:

$$X=(m_1-m_2/m_1-m_0)\times 100$$

де m_0 – маса бюкси без проби, г;

m_1 – маса бюкси з пробою до зважування, г;

m_2 – маса бюкси з пробою після зважування, г.

Обчислення вологості кожної проби проводять з точністю до третього десяткового знака. За остаточний результат випробування приймають середнє арифметичне результатів трьох паралельних визначень. Допустимі розбіжності між результатами паралельних визначень не повинні перевищувати 0,5%. Обчислення середнього арифметичного результатів трьох визначень проводять з округленням до однієї значущої цифри після коми[81]. Вологість готового продукту має становити 10 %.

РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

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

Для автоматизації обираємо ділянку сушіння цільового продукту. В якості об'єктів автоматизації даної ділянки виступають: збірник проміжного продукту та вакуум-сушарка. Однак, враховуючи те, що осад після фільтрації на друк-фільтрі одразу завантажується на піддони вакуум-сушильної шафи, то наявність збірника не потрібна. Отже, автоматизації підлягає лише вакуум-сушильна шафа. Основні параметри, які необхідно контролювати – це температура сушіння, тиск в апараті та контроль ваги на вході і виході з апарату.

Висушування проводять при температурі близько 30 °С та тиску не більше 136 Па. Підігрів здійснюється за допомогою електроенергії, оскільки шафа для висушування продукту - лабораторна. Це пов'язано з тим, що кількість продукту невелика (майже 1 кг), тому немає необхідності в промислових сушарках. Завантаження та вивантаження продукту відбувається вручну, клапанів і насосів немає. Кінцева вологість висушеного ферменту має становити 10% [54].



Рис.9.1. Машинно-апаратурна схема технологічного процесу

| | | | | |
|--|-------------|------------------------|---------------|----------------|
| <i>НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ</i> | | | | |
| <i>Зм.</i> | <i>Арк.</i> | <i>№ документа</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> |
| <i>Розробив</i> | | <i>Підгерська Т.О.</i> | | |
| <i>Консульт.</i> | | <i>Клименко О.М.</i> | | |
| <i>Керівник</i> | | <i>Карлаш Ю.В.</i> | | |
| <i>Н. Контр.</i> | | | | |
| <i>Зав.каф.</i> | | <i>Пирог Т.П.</i> | | |
| <i>Розділ 9. Автоматизація ділянки виробництва</i> | | | | |
| | | <i>Літ.</i> | <i>Арк.</i> | <i>Акрюків</i> |
| | | | <i>124</i> | <i>148</i> |
| <i>Кафедра БТМ - .</i> | | | | |

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

1. Контроль і регулювання температури у технологічному апараті шляхом впливу на нагрівальний елемент.
2. Контроль тиску у технологічному апараті по місцю.
3. Контроль ваги продукту, що входить в апарат.
4. Контроль ваги продукту на виході з апарату.

Відповідно до переліку розглянутих задач системи керування заповнена таблиця 9.1. При цьому будемо притримуватись рішення, що у роботі буде розглянута система автоматизація у якій центральним управляючим пристроєм є мікропроцесорний контролер, а спостереження за ходом виконання технологічного процесу 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.

Таблиця 9.1

Завдання на розробку системи автоматизації

| № з.п. | Машина, агрегат, установка | Параметр, місце відбору сигналу | Припустиме значення параметра | Вид автоматизації | Характери контролю чи управління | Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії |
|--------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------|--|---|
| 1 | Технологічний апарат | Температура в апараті | 30 °С | Контроль | Відображення, реєстрація | АРМ оператора |
| | | | | Регулювання | Стабілізація | Вплив на нагрівальний елемент |
| 2 | Технологічний апарат | Тиск в апараті | 136 Па | Контроль | Відображення, реєстрація, сигналізація | АРМ оператора |

| | | | | | | |
|---|----------------------|-----------------------------------|----------|----------|--------------------------|---------------|
| 3 | Технологічний апарат | Вага продукту на вході в апарат | 1,1 кг | Контроль | Відображення, реєстрація | АРМ оператора |
| 4 | Технологічний апарат | Вага продукту на виході з апарату | 0,320 кг | Контроль | Відображення, реєстрація | АРМ оператора |

9.2. Опис схеми автоматизації та специфікація засобів автоматизації

Функціональна схема автоматизації включає в себе такі контури:

1. В першому контурі автоматичного контролю та управління необхідно контролювати та регулювати значення температури технологічного апарату (сушарки), регламентоване значення якого 30 °С. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрації) цих змін в його архіві. Для регулювання температури передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок впливу на нагрівальний елемент сушарки (позиція 1б). Контроль та регулювання температури в сушарці здійснюється за допомогою місцевого первинного перетворювача для вимірювання температури – термометра опору (позиція 1а).

2. В другому контурі автоматичного контролю та управління необхідно контролювати тиск в апараті, який має регламентоване значення 136 Па. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрації) цих змін в його архіві. Також встановлено сигналізацію, яка повідомить оператора-технолога, внаслідок відхилення параметра від заданого значення. Контроль тиску здійснюється за допомогою датчика, що розташований по місцю (позиція 2а).

3. Третій та четвертий контури ідентичні. В цих контурах необхідно контролювати вагу продукту на вході в апарат (позиція 3а) та на виході з апарату(позиція 4а) за допомогою датчиків ваги.

Специфікація

| Порядковий номер | № позиції за схемою | Найменування та технічна характеристика | Тип, модель | Виробник |
|------------------|---------------------|--|---------------|---------------------------|
| <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> |
| 1 | 1а | Термометр опору, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, градуювальна характеристика Pt100, діапазон вимірювань: - 80...+600 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 25бар, приєднання G1/2 | ТСП (Pt100) | ПАО „Тера”, Україна |
| 2 | 1б | Тиристорний перетворювач. Керуючий сигнал аналоговий від 0 ± 7 V. Діапазон регулювання 1:10000 | SDC1-47 | «ARTECH» Болгарія |
| 3 | 2а | Тензометричний перетворювач тиску, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, діапазон вимірювання - 0,4...60МПа, під'єднання G1/2, клас точності 0,25, вихідний сигнал аналоговий | ПД-И-30 | ПАО „Склоприбор”, Україна |
| 4 | 3а | Датчик ваги WL260 SP-S AA матеріал виготовлення: алюміній, номінальне навантаження 3 кг | WL260 SP-S AA | Siemens |
| 5 | 4а | Датчик ваги WL260 SP-S AA матеріал виготовлення: алюміній, номінальне навантаження 3 кг | WL260 SP-S AA | Siemens |

Отже за рахунок автоматизації ділянки сушіння цільового продукту, а саме вакуум-сушильної шафи, ми маємо можливість автоматично регулювати та контролювати температуру, тиск та вагу продукту на вході і виході . За рахунок автоматизації збільшується продуктивність праці, покращується якість готового продукту та керування самого процесу.

РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

1. Підготовка стерильного аераційного повітря

На цьому етапі відбувається підготовка повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу. Оскільки повітря надходить до інокулятора, посівного апарата та ферментера, то даний етап не враховуємо до загального об'єму газоподібних відходів.

2. Приготування титрувальних розчинів

Дана стадія передбачає підготовку 6 % розчину НСІ для підтримки сталого рН під час культивування (рН=5,0) та титрувальних розчинів 0,6 н НСІ та 6 % NaOH для стерилізації солей. Розчин для регуляції рН подається на стадіях вирощування інокуляту та під час виробничого біосинтезу. На даному етапі виробництва, рідкі відходи утворюються лише тоді, коли підготовлені розчини не відповідають нормативним показникам та рівню асептики. Тому відходи титрувальних розчинів не враховуємо до загального об'єму рідких відходів.

3. Підготовка та стерилізація піногасника

В якості піногасника обираємо силікон, стерилізація якого буде здійснюватися в мірнику зі змійовиком та сорочкою. Піногасник подається за потреби на всіх етапах підготовки посівного матеріалу та під час виробничого біосинтезу. Відходи піногасника не враховуємо до загального об'єму рідких відходів.

| | | | | | | | | | |
|------------------|-------------|------------------------|---------------|-------------|--|-------------|-------------|--------------------|------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ</i> | | | | |
| <i>Зм.</i> | <i>Арк.</i> | <i>№ документа</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | <i>Розділ 10. Охорона довкілля</i> | <i>Літ.</i> | <i>Арк.</i> | <i>Акрушів</i> | |
| <i>Розробив</i> | | <i>Підгерська Т.О.</i> | | | | | | <i>128</i> | <i>148</i> |
| <i>Консульт.</i> | | | | | | | | | |
| <i>Керівник</i> | | <i>Карлаш Ю.В.</i> | | | | | | | |
| <i>Н. Контр.</i> | | | | | | | | | |
| <i>Зав.каф.</i> | | <i>Пирог Т.П.</i> | | | | | | <i>Кафедра БТМ</i> | |

4. Підготовка спирту

На даному етапі здійснюється підготовка етанолу для осадження лакази та промивання осаду ферменту під час фільтрування. Весь спирт надходить на стадії осадження та фільтрування лакази, тому відходи підготовки спирту не враховуємо до загального об'єму рідких відходів.

5. Підготовка та стерилізація поживного середовища

На цьому етапі існує імовірність невідповідності сировини поставленим вимогам, тому можливе її відбракування. Також твердими відходами цього етапу можуть бути пакувальні матеріали сировини, що необхідна для приготування поживного середовища. *Отже даний етап є місцем емісії твердих відходів.*

Також перед приготуванням обов'язково здійснюється підготовка та миття обладнання в якому буде відбуватись приготування середовища, тому відходами даного етапу будуть мийні та промивні води. *Отже даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

6. Підготовка посівного матеріалу

Даний етап передбачає отримання великої кількості посівного матеріалу за допомогою колб, інокулятора та посівного апарата. Посівний матеріал з колб застосовується для засіву інокулятора, посівний матеріал з інокулятора використовують для засіву посівного апарата, а з посівного апарату засівають ферментер, то відходи від посівного матеріалу не враховуємо до загального об'єму рідких відходів. *Однак, враховуємо мийні та промивні води, що утворюються на даному етапі.*

Оскільки *Coriolus versicolor* МТСС 138 – гриб білої гнилі є еукаріотом, тобто аеробом, то під час культивування відбувається постійна подача аераційного повітря до поживного середовища. І відповідно з'являється великий об'єм відпрацьованого повітря, яке містить спори гриба. *Передбачаємо те, що даний етап є місцем емісії великої кількості газоповітряних відходів.*

7. Біосинтез

На цьому етапі відбувається накопичення лакази та утворення великої кількості культуральної рідини. Так як на цьому етапі культуральна рідина потрапляє до збірника, то рідкі відходи не враховуємо. Однак на виході з ферментера виділяється відпрацьоване повітря, що містить спори гриба. *Тому передбачаємо даний етап як місце емісії великого об'єму газоповітряних відходів.*

8. Відділення біомаси

На даному етапі відбувається відділення біомаси від культуральної рідини шляхом центрифугування. Оскільки лаказа є позаклітинним ферментом, то використовуємо лише культуральну рідину для подальшого виділення ферменту. Тому рідкі відходи не враховуємо. Після центрифугування утворюється біошрот (біомаса продуцента та нерозчинні залишки), *тому даний етап є місцем емісії твердих відходів.*

9. Концентрування супернатанту

Далі йде етап концентрування ультрафільтрацією. На наступний етап потрапляє концентрат в якому міститься фермент, а відходами є пермеат. *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

10. Осадження

Далі концентрат осаджують за допомогою органічних розчинників. Для осадження лакази використовують етанол. Фермент осаджують в розчині з концентрацією спирту 70 %. Даний етап не передбачає утворення рідких відходів.

11. Відділення осаду фільтрацією

Наступним етапом є фільтрація за допомогою друк-фільтра. На подальших етапах використовується вологий осад ферментного препарату, а відходами є рідина, яка відфільтровується. *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

12. Видалення вологи висушуванням

Одержаний вологий ферментний препарат піддається подальшому висушуванню в вакуум-сушильній шафі. Процес супроводжується виділенням відпрацьованого повітря, що містить часточки лакази. *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії газоподібних відходів.*

13. Подрібнення

Лаказа після висушування подрібнюється на лабораторному ударному млині і в повному обсязі передається на наступну стадію. Тому даний етап не входить до загального об'єму твердих відходів.

14. Просіювання

Фермент після подрібнення просіюється. В результаті утворюється просів, що надходить на наступну стадію та відсів, що повертається на стадію подрібнення. Тому даний етап не входить до загального об'єму твердих відходів.

15. Стандартизація

На цій стадії фермент в повному обсязі змішується з наповнювачем. Відходами даного етапу можуть бути пакувальні матеріали, в яких наповнювач потрапляє на виробництво. *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії твердих відходів.*

16. Фасування та пакування

Після стандартизації фермент фасують і пакують вручну. Залишок нерозфасованого ферменту зберігається до наступного циклу. Тому даний етап не входить до загального об'єму твердих відходів.

10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.

До складу рідких відходів входить певна кількість біогенних елементів, що залишилися в культуральній рідині. Це залишки фосфору, азоту, деяких мікроелементів. Очищення стічних вод від біогенних елементів є дуже важливим

і актуальним завданням, так як біогенні речовини - причина багатьох небажаних явищ.

Видалення біогенних елементів із стічних вод потрібно в зв'язку з тим, що з'єднання азоту і фосфору викликають процес евтрофікації водойм. Евтрофікація - процес зростання біологічної рослинності водойм, який відбувається внаслідок перевищення балансу поживних речовин. Він супроводжується надмірним розвитком водоростей зелених, синьо-зелених і діатомових, переважанням небажаних видів планктону, порушенням життєдіяльності риб. Продукти метаболізму водоростей дають воді неприємний запах, можуть викликати шкірні алергічні реакції та шлунково-кишкові захворювання у людей і тварин. При своєму розкладанні водорості виділяють у воду поліпептиди, аміак і проміжні продукти білкового розпаду. В воді відзначається вміст фенолів (канцерогенів), що в 3-4 рази перевищують ГДК.

Видалення біогенних елементів потрібно також при створенні оборотних і замкнених систем водопостачання промислових підприємств. Наявність сполук фосфору і азоту викликає біологічне обростання трубопроводів, колекторів та іншого каналізаційного обладнання.

Очистка таких стічних вод можлива за допомогою використання модульних установок типу БТ, що працюють з використанням біотенка (рис 10.1). Стічна вода, що подається від насосної станції (насосна станція не входить в комплект поставки), послідовно проходить три зони. У зоні 1 забезпечується попереднє механічне очищення, ущільнення і стабілізація осаду, який періодично відкачується. У зоні 2, обладнаної системою дріднобульбашкової аерації і блоками плоскісного завантаження, протікають процеси біологічного очищення в аеробно-анаеробних умовах. У зоні 3 відбувається відділення активного мулу в режимі тонкошарового відшаровування і його транспортування в першу зону. Очищенна вода відводиться через усереднювальний лоток і знезаражуються на УФ-установках[70].

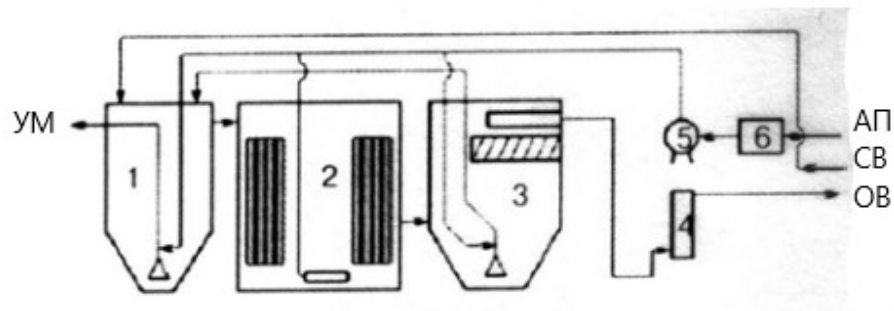


Рис.10.1. Схема модульної установки типу БТ:

1 - відстійник-ущільнювач; 2 - біотенк; 3 - вторинний відстійник з блоками тонкошарового відстоювання; 4 - УФ-установка; 5 - повітродувка; 6 - повітряний фільтр; СВ - стічна вода; ОВ - очищена вода; АП - атмосферне повітря, УМ-ущільнений активний мул;

10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.

Для утилізації твердих відходів – пакувальних матеріалів, їх необхідно попередньо відсортувати та передати до пунктів переробки вторинної сировини.

До твердих відходів належить міцелій гриба. Продукент не є потенційним збудником захворювань людини чи тварин і відходи від культивування не потребують деконтамінації. Продукент належить до класу безпеки BSL (*Biosafety Level*) 1 [82].

На сучасному ринку лікувально-профілактичних препаратів збільшується попит на препарати, створені на основу міцелію вищих базидіальних грибів. Такі препарати містять природні біологічно активні комплекси, а не окремі біологічно активні речовини, виділені з міцелію або культуральної рідини. Таким чином міцелій гриба можна поставляти на переробку до підприємств, що займаються виробництвом таких препаратів. Так наприклад, з *C. versicolor* виділяють полісахариди PSK та PSP, що виявляють імуномодулювальні властивості і використовуються у лікувальній практиці як протипухлинні засоби[83].

Функціональні препарати, на основі міцелію вищих базидіальних грибів, що містять природні біологічно активні комплекси, сьогодні знайшли застосування у дієтичному харчуванні[84].

Також для переробки та утилізації міцелію гриба можна використовувати метод вермикультивування. Необхідною умовою є додавання гною до загальної кількості органічних відходів. Таким чином черв'яки будуть споживати міцелій і накопичувати свою біомасу.

В США, в Каліфорнії був виведений гібрид дощових черв'яків під назвою дощовий каліфорнійський черв'як, що в порівнянні зі звичайними живуть довше в 3-5 разів і пристосовані до життя та розмноження в промислових умовах. Протеїн черв'яків використовується для годівлі тварин, а вермикомпост (біогумус) – в технологіях вирощування сільськогосподарських культур[69].

10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів.

Газоподібні викиди різного промислового походження за об'ємом, складом речовин та їх концентраціями є небезпечним та потужним джерелом забруднення навколишнього середовища. При мікробіологічному очищенні викидів, шкідливі компоненти вибірково утилізуються різними штамми мікроорганізмів, які можуть бути дисперговані в промивній рідині (абсорбенті) або іммобілізовані на поверхні насадок у вигляді біологічної плівки. Завдяки здібності мікроорганізмів до адаптації, цей універсальний принцип використовується для утилізації широкого спектру забруднюючих речовин повітря.

Шляхом біохімічного окиснення в клітинах мікроорганізмів забруднюючі повітря речовини найчастіше розкладаються до вуглекислого газу та води. Відомо, що установки біологічної очистки повітря є екологічно чистими, дешевими та простими в експлуатації.

В даний час для біологічного очищення повітря використовується три основних типи установок: біофільтри, біоскрубери і біореактори з омиваним шаром. Газоподібні з'єднання, що підлягають очищенню, проходячи через шар

біокатализатора. в установках всіх трьох типів, адсорбуються водним середовищем (плівковою вологою, аерозолем), а потім піддаються мікробіологічній деструкції [85].

Біофільтрація є способом обробки, при якій газ, що очищається, проходить через шар мікроорганізмів, зосереджених в пористому носії твердї фази. Залежно від типу носія реалізуються способи з інертним матеріалом (цеолітом, керамзитом і т. д.), ґрунтом, торфом або використовуються компости. Можуть застосовуватися інші носії органічного і неорганічного походження належної вологості і температури. Типовим прикладом очищення за допомогою рідкої фази є спосіб барботування газів через рідину з активним мулом.

При контакті газів, що містять компоненти забруднюючих речовин з абсорбентом або фільтруючим шаром відбувається розчинення і емульгування цих компонентів у воді (у разі біоабсорбції), а також адсорбція на фільтруючому шарі (у разі біофільтрації).

Розчинені і емульсовані у воді компоненти забруднень віддаляються з рідкої фази і фільтруючого шару за рахунок адсорбції (поглинання) їх мікроорганізмами.

Адсорбовані компоненти забруднень піддаються біохімічному окисненню у живих клітинах (стадія регенерації біологічного сорбенту), стають живленням для мікроорганізмів і служать для їх розмноження. Таким чином можна очищати повітря від залишків лакази, що залишається в повітрі після сушіння [85].

Для того, щоб очистити відпрацьоване повітря, яке утворюється в процесі культивування на практиці застосовують систему «циклон + фільтр сітчастий». Відділення від повітря крапельної вологи призводить до видалення з рідиною до 90% клітин та їх спор. Циклон виконує функції краплевіддільника, а фільтр, який представляє собою багат шаровий тканинний патрон з тонких сталевих ниток, забезпечує доочищення повітря. При очищенні відпрацьованого повітря, що має високу вологість, добре зарекомендували себе металокерамічні фільтри, які

застосовуються у вигляді парного автоматизованого комплексу: один фільтр робочий, інший - регенерується продуванням паром. Перемикання фільтрів здійснюється в автоматичному режимі при збільшенні гідравлічного опору фільтра до певної (заданої) величини [86].

На рис. 10.2 представлений ще один спосіб очистки повітря від спор. Очищення повітря в розглянутій схемі буде проходити в два етапи: Перший – затримання вегетативних клітин і спор на волокнистому фільтрі Петрянова фланцевої конструкції зі змінною фільтруючою касетою (матеріал - БСТВ, полістерол або перхлорвініл). Проскакування частинок для цього фільтра може складати 0,01-0,1%. Тому вважаємо необхідним наявність другої стадії очистки. Для знищення спор, що проникають за фільтр, пропонується використовувати обробку повітря водяною паром. Установка передбачає парову камеру з інжекцією гострої пари, і подальший охолоджувач для відділення конденсату пари. У холодильнику водяна пара конденсується, а очищене повітря продовжує рух по технологічному ланцюгу. Конденсат стікає в камеру нагріву, де за рахунок підведення тепла відбувається утворення пари, що подається на стерилізацію повітря[87].

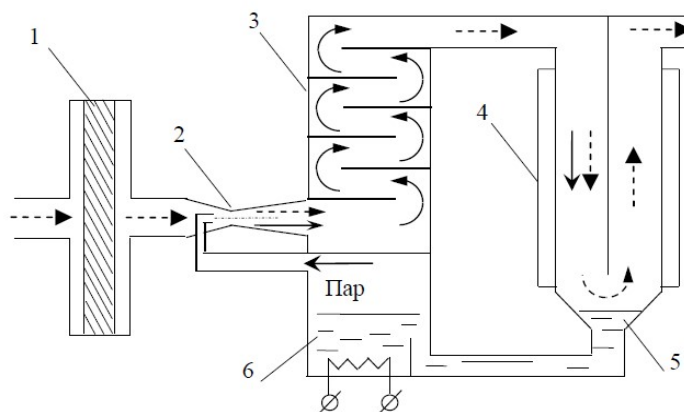


Рис.10. 2. Очищення повітря на основі фізичних методів:

1 - фільтр, 2 - дифузор, 3 - термокамера витримки, 4 - холодильник, 5 – збірник конденсату, 6 - нагрівач

10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Враховуючи незначну кількість твердих відходів у вигляді пакувальних матеріалів, спосіб зменшення їх кількості не пропонується.

Для миття обладнання обираємо систему СІР-мийки, що значно скорочує витрати мийних розчинів та дозволяє розчини кальцинованої соди застосовувати повторно після проведення фільтрування.

Для того, щоб зменшити кількість газоподібних відходів, для сушіння лакази обираємо вакуум-висушування. Оскільки тривалість висушування становить 8-16 год, що є значно меншим в порівнянні з сублимаційним сушінням то це дає можливість зменшити кількість відпрацьованого повітря. Також для зменшення відпрацьованого повітря доцільніше обирати сушильні установки з економною витратою повітря[54].

СПИСОК ВИКОРИСТОНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Демків О. М., Банах С. Я., Притула С. В., Гайда Г. З., Гончар М. В. Скринінг штамів мікроскопічних грибів – продуцентів лакази. *Scientific Journal «ScienceRise: Biological Science»*. 2016, 3(3): 64-69.
2. Вітковська К. В., Милашко О. Г., Ольвінська Ю. О., Погорєлова Т. В., Самотоєнкова О. В. та інші. Статистика – інструмент соціально-економічних досліджень: збірник наукових студентських праць. Випуск 5. Частина І. – Одеса, ОНЕУ. – 2019. – 245 с.
3. Сукач Г. І., Ніколайчук Л. Г. Проблема дослідження якості та безпечності текстильних товарів. 2014, 14 (22): 97-101.
4. Revankar M. S., Lele S.S. Increased production of extracellular laccase by the white rot fungus *Coriolus versicolor* MTCC 138. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2006, 22:921-926. doi:10.1007/s11274-006-9136-2
5. Christopher L. P., Yao B., Ji Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Frontiers in energy research*. 2014, 2(12): 1-13. doi:10.3389/fenrg.2014.00012.
6. Patil N. D., Chopade L. R., Narkhede K. P., Chaudhari B. L., Mahajan R. T. Bioprocess optimization of laccase production through solid substrate fermentation using *Perenniporia tephropora* - L168 and its application in bioremediation of triaryl-methane dye. *Biotechnology Progress*. 2019. doi:10.1002/btpr.2916.

| | | | | | | | |
|------------------|-------------|------------------------|---------------|-------------|---------------------------------------|-------------|----------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ</i> | | |
| <i>Зм.</i> | <i>Арк.</i> | <i>№ документа</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | <i>Список використаної літератури</i> | | |
| <i>Розробив</i> | | <i>Підгерська Т.О.</i> | | | | | |
| <i>Консульт.</i> | | | | | | | |
| <i>Керівник</i> | | <i>Карлаш Ю.В.</i> | | | | | |
| <i>Н. Контр.</i> | | | | | | | |
| <i>Зав.каф.</i> | | <i>Пирог Т.П.</i> | | | <i>Літ.</i> | <i>Арк.</i> | <i>Акрушів</i> |
| | | | | | 138 | 148 | |
| | | | | | <i>Кафедра БТМ</i> | | |

7. Трубіціна Л. І. Двухдомные лакказы бактерий рода *Streptomyces*: клонирование, экспрессия, характеристика ферментов: Автореф. дис. канд. біол. наук. Пушино, 2017. 147 с.
8. Wang Z., Ren D., Zhao Y., Huang C., Zhang S., Zhang X. та інші. Remediation and improvement of 2,4-dichlorophenol contaminated soil by biochar-immobilized laccase. *Environmental Technology*. 2019. doi:10.1080/09593330.2019.1677782.
9. Савинова О. С. Получение рекомбинантных минорных изоферментов лакказ базидиомицета *Trametes hirsuta* 072 в *Penicillium canescens* и их сравнительная характеристика: Автореф. дис. канд. біол. наук. Москва, 2019. 156 с.
10. Source CAS 80498-15-3 Высокое качество Laccase фермент [Электронный ресурс] Режим доступа: m.alibaba.com <https://m.russian.alibaba.com/p-detail/CAS-80498-15-3-High-Quality-62223461511.html?spm=a2706.8168334.1998817009.17.391942d4JEYPLw>
11. Лисова З.А. Характеристика изоформ лакказы гриба *Cerrena unicolor*: Автореф. дис. канд. біол. наук. Пушино, 2011. 24 с.
12. Морозова О. В. Лакказы базидиальных грибов, лакказа-медыаторные системы и возможности их использования: Автореф. дис. канд. хім. наук. Москва, 2006. 28 с.
13. Chauhan P. S., Kumarasamy M., Sosnik A., Danino D. Enhanced Thermostability and Anticancer Activity in Breast Cancer Cells of Laccase Immobilized on Pluronic-Stabilized Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019. doi:10.1021/acsami.9b11877.
14. Verma A., Dhiman K., Shirkot P. Optimization for Laccase Production by *Pseudomonas putida* LUA15.1 using Response Surface Methodology. *J. of pure and applied microbiology*, 2015, 9(2): 1247-1256.

15. Lin F. Y., Lai Y. K., Yu H. C., Chen N. Y. Effects of *Lycium barbarum* extract on production and immunomodulatory activity of the extracellular polysaccharopeptides from submerged fermentation culture of *Coriolus versicolor*. *Food Chemistry*. 2008, 110: 446–453.
16. Громовых Т. И., Жилинская Н. В., Садыкова В. С. Штамм макромицета *Trametes versicolor*, используемый в качестве продуцента для получения биологически активных противогрибковых препаратов. *Едрид*. 2015, 216.
17. Жилинская Н. В. Противомикробные свойства базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (vill.: fr.) bond. et sing., *Fomitopsis pinicola* (sw.: fr) p. karst. и *Trametes versicolor* (l.: fr.) Lloyd: оценка перспектив использования в технологии пищевых продуктов: Автореф. дис. канд. биол. наук. Москва, 2015. 195 с.
18. Клечак І.Р., Митропольська Н.Ю., Антоненко Л.О., Нишпорська О.І. Особливості росту *Coriolus versicolor* у глибинній культурі. *Наукові вісті НТУУ "КПІ". Проблеми біотехнології*. 2009, 1: 128-133.
19. Зерова М. Я. Визначник грибів України / М. Я. Зерова, Г. Г. Радзівський, С. В. Шевченко // Базидіоміцети. – Т. 5, кн. 1. – К. : Наук. думка, 1972., с 188
20. Русинова Т. В. Разработка технологии биосинтеза фермента лакказы базидиальными грибами рода *Trametes*: Автореф. дис. канд. тех. наук. Москва, 2007. 191 с.
21. Землянська О. В., Оніщенко Н. О., Заходи безпеки при отриманні розчинів гіпохлориту натрію. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://confopcb.iee.kpi.ua/proc/article/download/195423/195787>
22. Кобищан А.Д. Шляхи удосконалення методів вибілювання лляних тканин. *Науковий вісник НЛТУ України*. 2012, 22(8): 110-115.
23. Информационно технический справочник по наилучшим доступным технологиям. Производство текстильных изделий (промывка,

- отбеливание, мерсеризация, крашение текстильных волокон, отбеливание, крашение текстильной продукции). – М:Бюро НТД, 2017. – 376 с.
24. Pat. RU2000119782A Method for removing an excess dye with camera or dyed fabric or yarn/ Туре Дамхус, Уве Фогт. - Publ. 27.12.2003.
25. Лаказа з активністю 5 000 од/г. [Електронне джерело]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/LACCASE-CAS-80498-15-3-with_1600057337005.html?spm=a2700.galleryofferlist.0.0.6c795ec0Vj7xdQ.
26. Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., Haltrich D. Increased production of laccase by the wood degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002, 30:529-536
27. Archibald F., Roy B. Production of Manganic Chelates by Laccase from the Lignin Degrading Fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Applied and environmental microbiology*. 1992, 58 (5):1496-1499.
28. Roy-Arcand L., Archibald F.S. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*. 1991, 13 (3): 194-203.]
29. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Trametes versicolor*. [Електронний ресурс] // KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. – 2020. – Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?tv00010
30. Осипов Е. М. Структурно-функціональна характеристика хлорид-резистентної лаккази з *Botrytis aclada*: Автореф. дис. канд. хим. наук. Москва, 2016. 108 с
31. Citrate cycle (TCA cycle) - *Trametes versicolor*. [Електронний ресурс] // KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. – 2020. – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/tvs00020>
32. Alanine, aspartate and glutamate metabolism - *Trametes versicolor*. [Електронний ресурс] // KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

- 2020. – Режим доступа: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?tv00250
33. Arginine biosynthesis - *Trametes versicolor*. [Электронный ресурс] // KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. – 2020. – Режим доступа: <https://www.genome.jp/pathway/tvs00220>
34. Arginine and proline metabolism - *Trametes versicolor*. [Электронный ресурс] // KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. – 2020. – Режим доступа: <https://www.genome.jp/pathway/tvs00330>
35. Lysine biosynthesis - *Trametes versicolor*. [Электронный ресурс] // KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. – 2020. – Режим доступа: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?tv00300
36. Cysteine and methionine metabolism - *Trametes versicolor*. [Электронный ресурс] // KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. – 2020. – Режим доступа: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?tv00270
37. Glycine, serine and threonine metabolism - *Trametes versicolor*. [Электронный ресурс] // KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. – 2020. – Режим доступа: <https://www.genome.jp/pathway/tvs00260>
38. Valine, leucine and isoleucine biosynthesis - *Trametes versicolor*. [Электронный ресурс] // KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. – 2017. – Режим доступа: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?tv00290
39. Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis - *Trametes versicolor*. [Электронный ресурс] // KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. – 2020. – Режим доступа: <https://www.genome.jp/pathway/tvs00400>
40. Pentose phosphate pathway - *Trametes versicolor*. [Электронный ресурс] // KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. – 2020. – Режим доступа: <https://www.genome.jp/pathway/tvs00030>

41. Histidine metabolism - *Trametes versicolor*. [Електронний ресурс] // KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. – 2020. – Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?tv00340
42. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія. / Пирог Т.П., Ігнатова О.А. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
43. Чайка О.В., Федотов О. В. Культурально-морфологічні характеристики ксилотрофних базидіоміцетів у глибинній культурі. *Біологічний вісник*. 2013, 1: 128-146.
44. Русинова Т. В. Разработка технологии биосинтеза фермента лакказы базидиальными грибами рода *Trametes*: Автореф. дис. канд. тех. наук. Москва, 2007. 191 с.
45. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
46. МОЗ України Наказ № 502 від 14.12.2001 Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://zakononline.com.ua/documents/show/41907___487517
47. Методичні рекомендації щодо застосування засобу «Біомой». [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://farmakos.nethouse.ua/static/doc/0000/0000/0082/82184.jtby47bitk.pdf>.
48. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2020 рік. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8/%D0%94%D0%BE%D1%81>

%D1%82%D1%83%D0%BF%20%D0%B4%D0%BE%20%D0%BF%D1%83
%D0%B1%D0%BB%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%BE%D1%97%20%D
1%96%D0%BD%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%
D1%96%D1%97/2020_%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1
%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE
%D0%B1%D1%96%D0%B21.pdf

49.Методичні рекомендації щодо застосування засобу «Хлорантоін».

[Електронний ресурс] Режим доступу:

<https://farmakos.nethouse.ua/static/doc/0000/0000/0082/82185.2ae4iqrdtm.pdf>

50.Методичні вказівки щодо застосування засобу Мікробак ® форте

(Mikrobac® forte) з метою дезінфекції. [Електронний ресурс] Режим

доступу: [http://www.xn--](http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin_upload/bode/mikrobak_forte.pdf)

[80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin_upload/bode/mikrobak_forte.pdf](http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin_upload/bode/mikrobak_forte.pdf).

51.Інструкція по використанню засобу «Гембар» [Електронний ресурс]

Режим доступу: http://www.attis.com.ua/files/gembar_usage.doc].

52.Шаповал Й. М., Полюжин І. П., Цюпко Ф. І., Полюжин Л. І. Оцінка

ефективності піногасників для водних розчинів поліакриламід у та

лауретсульфату натрію як основи мастильно-охолоджувальних

технологічних рідин. *Львівська політехніка*. 2018. 419-427.

53.Перцев І.М. Силікони [Електронний ресурс] Режим доступу:

<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/525/silikoni>

54.Грачова І.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. – 3-е

изд., перероб. и доп. – М: Элевар, 2000, 512 с.

55.Гуменюк. О.Л. Харчовахімія: текстилекцій для студ. напр. підготовки

6.051701 "Харчовітехнології та інженерія"– Чернігів : ЧДТУ, 2013. –

244с..

56.Fang-Yi Lin, Yiu-Kay Lai, Hao-Chen Yu, Nan-Yin Chen, Chi-Yue Chang.

Effects of Lycium barbarum extract on production and immunomodulatory

- activity of the extracellular polysaccharopeptides from submerged fermentation culture of *Coriolus versicolor*. *Food Chemistry*. 2008, 110: 446-453.
57. Тертишний О.О., Тертишна О. В. Конспект лекцій з курсу «Процеси та апарати хімічної технології»– Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2011. – 79 с.
58. Буценко Л.М., Пенчук Ю.М. Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб. – К: НУХТ, 2010. – 323 с.
59. Han M. J., Choi H. T, Song H. G. Purification and Characterization of Laccase from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*. *The Journal of Microbiology*. 2005, 43 (6): 555-560
60. Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. – К: НУХТ, 2019. – 252 с.
61. ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.» [Електронний ресурс] Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/druk_filtr_ua.php
62. Саленко Ю.С. Обладнання для подрібнення матеріалів: дробарки та млини: Навч. посібник. – Кременчук: КДПУ, 2008. – 100 с.
63. Дмитрієвського Д. І. Технологія лікарських препаратів промислового виробництва - Вінниця: НОВА КНИГА, 2008. - 280 с.
64. Герасименко В. Г. Біотехнологія. Биологическая библиотека - [Електронний ресурс] Режим доступу: https://lifelib.info/microbiology/biotechnology_1/130.html
65. Рибачук В.Д. Титан діоксид. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2205/titan-dioksid>
66. Лаказа для отбеливания [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://russian.alibaba.com/product-detail/laccase-for-indigo-bleaching-manufacturing-60734723592.html>
67. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія./ Т. П. Пирог. –К.: НУХТ, 2010. – 632 с.

68. Ручай, Н. С. Технология микробного синтеза. – Минск: БГТУ, 2014. – 167 с.
69. Садецький В. М. Переробка органічних відходів агропромислового комплексу в біодобриво «біогумус» методом вермикультивування. *Збірник наукових праць*. 2009, 17:93-97.
70. Долина Л.Ф. Очистка сточных вод от биогенных элементов. – Дніпропетровск.: Континент. 2011. - 198с.
71. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C1–C2–соединениях. – К.: Наук. думка, 1992. – 212 с.
72. Дзигун Л.П., Дуган О.М. Вплив умов культивування на ріст ксилотрофних базидіоміцетів *Polyporus squamosus* (huds.) fr. та *Laetiporus sulphureus* (bull.: fr.) murrill. *Вісник аграрної науки Причорномор'я*, 2012, 1:178-185.
73. Han M. J., Choi H. T, Song H. G. Purification and Characterization of Laccase from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*. *The Journal of Microbiology*. 2005, 43 (6): 555-560
74. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 1976; 72(1-2): 248-254.
75. Кочубей Т.О. Вплив фітогемаглютиніну і його ізолектинів на життєздатність та апоптоз соматичних клітин ссавців *in vitro*: Автореф. дис. канд. біол. наук. Київ, 2017. 124 с.
76. Дехтяренко Н.В., Дуган О.М. Розроблення поживних середовищ на основі гідролізатів соєвого борошна для культивування представників роду *Lactobacillus*. *Наукові вісті НТУУ "КПІ"*. 2012; 3:24-29.].

- 77.Хижняк О. С. Розробка складу та біотехнології отримання комплексного пробіотичного препарату: Автореф. дис. канд. фарм. наук. Харків, 2016. 204 с.
- 78.Хабаров Ю. Г., Камакина Н. Д., Вешняков В. А. Фотометрический метод количественного определения редуцирующих сахаров в растворах. *Лесной журнал*. 2008, 5: 129-133.
- 79.Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И., Цветков В.О., Яруллина Л.М., Ц74 Шпирная И.А. Цитохимические и биохимические методы исследования микроорганизмов – возбудителей болезней растений/ – Уфа: РИЦ БашГУ, 2016. – 92 с..
- 80.ГОСТ 34440-2018 Ферментные препараты для пищевой промышленности. ВНИИПБТ - ФГБУН "ФИЦ питания и биотехнологии". Вступив у дію 2019.
- 81.Чернецкий Ю.П., Опарин Ю.Г, Пронина Е.В., Шалова Л.М.. ГОСТ 24061-2009. Метод определения влажности.
- 82.*Trametes versicolor* [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.atcc.org/products/all/20869.aspx>
- 83.Антоненко Л. О., Лазаренко Л. М., Клечак І. Р. Вплив біомаси *Coriolus versicolor* 353 на показники імунореактивності організму на експериментальній моделі. *Восточно-Европейский журнал передовых технологий*.2012, 2/11 (56): 7-10.
- 84.Тотова Л.О., Клечак І.Р., Трохименко О.П., Лазаренко Л. М., Дуган О. М. Імуномодулювальні і протівірусні властивості базидіального гриба *Trametes versicolor*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015, 17:253-257.
- 85.Шестопалов О. В., Пітак І. В. Аналіз існуючих процесів та апаратів біологічної очистки газових викидів. *Technology audit and production reserves*. 2014, 3/5(17): 49-52.

86. Ручай, Н. С. Технология микробного синтеза. – Минск: БГТУ, 2014. – 167 с.
87. Перушкина Е. В., Хабибуллина А. Р., Александровский С. А. Выбор способа очистки отработанного воздуха при культивировании спорообразующих бактерий. *Вестник Казанского технологического университета*. 2014: 237-239



Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*

Christiane Galhaup^{a,c}, Harald Wagner^a, Barbara Hinterstoisser^{b,c}, Dietmar Haltrich^{a,c,*}

^aDivision of Biochemical Engineering, Institute of Food Technology, University of Agricultural Sciences Vienna (Universität für Bodenkultur Wien), Muthgasse 18, A-1190 Wien, Austria

^bInstitute of Chemistry, University of Agricultural Sciences Vienna (Universität für Bodenkultur Wien), Muthgasse 18, A-1190 Wien, Austria

^cWood Composite and Chemistry Center Austria (Wood Eplus), Area 1, Austria

Abstract

The white-rot fungus *Trametes pubescens* MB 89 is an excellent producer of the industrially important enzyme laccase. Extracellular laccase formation can be considerably stimulated by the addition of Cu(II) in the millimolar range to a simple, glucose-based culture medium. When using glucose, a typically repressing substrate, as the main carbon source, significant laccase formation by *T. pubescens* only started when glucose was completely consumed from the culture medium. In addition, the nitrogen source employed had an important effect on laccase synthesis. When using an optimized medium containing glucose (40 g l⁻¹), peptone from meat (10 g l⁻¹), and MgSO₄·7H₂O and stimulating enzyme formation by the addition of 2.0 mM Cu, maximal laccase activities obtained in a batch cultivation were approximately 330 U ml⁻¹. Under these conditions it was not necessary to add aromatic compounds that are routinely used as inducers of laccase in fungi. By applying a fed-batch strategy, in which a glucose solution was fed continuously to a cultivation of *T. pubescens* so that the glucose concentration in the medium never exceeded a certain low, critical value, glucose repression could be avoided and production of laccase was almost doubled as compared to the batch cultivation (740 U ml⁻¹). © 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Laccase; Polyphenol oxidase; *Trametes pubescens*; Culture medium development

1. Introduction

Laccases (benzenediol:oxygen oxidoreductases; EC 1.10.3.2.), multicopper enzymes belonging to the blue oxidases, catalyze the one-electron oxidation of a wide variety of organic and inorganic substrates, including mono-, di- and polyphenols, aminophenols, methoxyphenols, aromatic amines and ascorbate, with the concomitant four-electron reduction of oxygen to water [1–4]. Laccase was first described from the sap of the Japanese lacquer tree *Rhus vernicifera* [5]. Probably the first report on the presence of laccase in fungi was from Laborde in 1897 [6]. Since then, laccases have been found in the majority of white-rot fungi described to date, and they are also produced by other types of fungi, some bacteria and insects [6–8]. The biologic role for laccase has yet to be fully elucidated and appears to vary depending on the type of organism [2]. In fungi, laccases are believed to be involved in degradation of lignin and/or in

the removal of potentially toxic phenols arising during this degradation [2,9]. In addition, fungal laccases are hypothesized to take part in the synthesis of dihydroxynaphthalene melanins [10], in fungal morphogenesis [11,12], and plant pathogenesis and fungal virulence [13,14].

In basidiomycete fungi, extracellular laccases are constitutively produced in small amounts [15], however, their production can be considerably stimulated by the presence of a wide variety of inducing substances, mainly aromatic or phenolic compounds related to lignin or lignin derivatives, such as ferulic acid, 2,5-xylidine, p-anisidine, or veratryl alcohol [8]. In addition, laccase production can be influenced by the nitrogen concentration in the culture medium. Often, higher nitrogen levels are required to increase laccase formation [8], but with certain organisms such as *Pycnoporus cinnabarinus* or *P. sanguineus* nitrogen-limited culture conditions enhance the production of this enzyme [16,17]. Whereas the increased production of laccase activity by fungi in response to aromatic and phenolic substances is well documented, an important effect of copper on laccase formation has only recently been reported [18,19]. This stimulating effect was found to be especially effective in

* Corresponding author. Tel.: +43-1-36006-6275; fax: +43-1-36006-6251.

E-mail address: haltrich@edv2.boku.ac.at (D. Haltrich).

several *Trametes* spp., most notably in *T. pubescens*. For this latter organism Cu concentrations optimal for laccase production were determined to be 1.5–2.0 mM [20]. Furthermore, copper had to be supplemented during the exponential phase of growth for its maximal effect. Under these growth conditions maximum values for laccase activity obtained were approximately 65 U ml⁻¹ [20].

Laccases have become important, industrially relevant enzymes because of a number of diverse applications, e.g. for biocatalytic purposes such as delignification of lignocellulosics and cross-linking of polysaccharides, for bioremediation applications such as waste detoxification and textile dye transformation, for food technological uses, for personal and medical care applications, and for biosensor and analytical applications [21]. To utilize laccases more efficiently for these biotechnological and environmental applications and to better understand the properties of these important enzymes at a molecular and kinetic level, rather large amounts of crude and purified laccases are required [8]. At present, research and application are sometimes hindered by the rather low yields of the enzyme formed by wild-type organisms but also by the difficulties to efficiently overexpress laccases heterologously in active form [22]. In the present study laccase formation by the white-rot basidiomycete *Trametes pubescens*, which only recently had been identified as an excellent source of this enzyme [20], was studied in more detail and was optimized pertaining to the carbon and the nitrogen source used. By employing a fed-batch strategy, in which the substrate glucose—which often represses synthesis of certain enzymes [23]—was slowly fed to an actively growing culture of the fungus, yields and productivity of laccase formation could be significantly increased.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Unless otherwise stated chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and were of the highest purity available. Peptone from meat (peptic digest), peptone from casein (pancreatic digest) and MgSO₄·7H₂O were from Fluka (Buchs, CH), while yeast extract was from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Organism and culture conditions

The white rot fungi *Trametes pubescens* MB 89 (=CBS 696.94) was isolated from an ash-tree (*Fraxinus excelsior*) in Gimbachtal, Upper Austria, by H. Prillinger and is deposited in the culture collection of the Institute of Applied Microbiology, Universität für Bodenkultur Wien, under the indicated strain number. It was maintained through periodic transfer at 25°C on potato dextrose agar plates (Difco). Shaken flask cultures of the organism were grown at 25°C

with continuous agitation (110 rpm) in baffled 1000-ml Erlenmeyer flasks containing 200 ml of medium. Unless otherwise indicated, the basal medium used for experimental cultures contained 20 g l⁻¹ glucose, 5 g l⁻¹ yeast extract, 5 g l⁻¹ peptone from casein and 1 g l⁻¹ MgSO₄·7H₂O [20]. The pH was adjusted to 5.0 with H₃PO₄ prior to sterilization. Several agar plugs, cut from the actively growing, outer circumference of a fungal colony growing on potato dextrose plates, were used as inoculum. Inoculated flasks were cultivated for up to 18 days. Unless otherwise stated a sterile stock solution of CuSO₄·5H₂O (1 M in water) was added to the actively growing culture after 4 days of incubation, when the glucose concentration in the medium was approximately 15 g l⁻¹, so that the final Cu concentration in the medium was 2 mM [20].

Putative aromatic laccase inducers tested included p-anisidine (p-methoxyaniline), gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid), ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid), vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid), and 2,5-xylidine (2,5-dimethylamine), which were dissolved in 50% ethanol as stock solutions and sterilized by filtration, while stock solutions of catechol and guaiacol (2-methoxyphenol) were prepared in water. These were added to growing fungal cultures together with 2 mM Cu on the fourth day of incubation so that their final concentration was 1 mM. The final concentration of ethanol in the growth medium was always less than 0.5% and an equivalent amount of ethanol was added to control flasks without aromatic inducer. Samples from duplicate flasks were taken periodically, centrifuged and the clear supernatant was used for the determination of enzyme activity and substrate concentration.

2.3. Bioreactor cultivations

The cultivations were carried out in a 20-L stirred tank bioreactor (MBR Bioreactor, Wetzikon, Switzerland) with a working volume of 15 L. The bioreactor was equipped with instrumentation for measurement and/or control of agitation, temperature, pH, dissolved oxygen concentration (pO₂) and foam. The agitator was equipped with four standard disk turbine impellers, each with six flat blades. The culture medium contained 40 g l⁻¹ glucose, 10 g l⁻¹ peptone from meat, 1.0 g l⁻¹ MgSO₄·7H₂O and was sterilized in situ at 121°C for 30 min. A 1-M stock solution of CuSO₄ in water was added after the time indicated so that the final Cu(II) concentration in the medium was 2 mM. During the cultivation the temperature was maintained at 25°C and the pH, which was initially adjusted to 5.0, was allowed to float. Agitation was constant at 100 rpm and aeration was automatically varied from 0.1 to 1.25 vol of air per fluid vol per min (vvm) to maintain a pO₂ of 40% of air saturation. The preculture (10% vol vol⁻¹) was a 7-day-old shaken flask culture grown on the same basal medium as used for the cultivation in the bioreactor but without the addition of Cu.

2.4. Enzyme activity assay

Laccase activity was determined with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) as the substrate [24]. The assay mixture contained 1 mM ABTS, 20 mM sodium acetate buffer (pH 3.5), and 10 μ l aliquots of appropriately diluted culture fluid. Oxidation of ABTS was monitored by following the increase in A_{436} ($\epsilon = 29.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). One unit of laccase activity was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 μ mol of ABTS per min at 25°C.

2.5. Other analyses

Soluble protein in the culture filtrate was measured by the dye-binding method of Bradford [25] using bovine serum albumin (fraction V) as the standard. Mycelial dry weight was determined by filtration through tared filter disks (ME 25/21, 0.45 μ m; Schleicher and Schüll, Dassel, Germany) and estimated by means of dry weight measurement. Glucose concentration in the fermentation samples was determined enzymatically using a commercially available assay (Infinity Glucose Reagent, Sigma). Cellobiose and lactose concentrations were measured by employing purified cellobiose dehydrogenase from *Sclerotium rolfsii* [26,27]. Glycerol and fructose were determined using commercially available test kits (Boehringer Mannheim, Germany).

3. Results

3.1. Production of laccase under various cultivation conditions

We have selected *Trametes pubescens* as the source of laccase following a screening of a number of basidiomycetes for an efficient producer of this industrially relevant enzyme. In addition, laccase formation by this organism can be easily stimulated by the addition of low amounts of copper to a simple basal medium [20] and a purified laccase isoenzyme from *T. pubescens* was superior for biocatalytic applications investigated in our laboratory [28]. In order to improve laccase production by this organism a range of carbon sources were examined to determine their effects on extracellular laccase formation by *T. pubescens*. The fungus produced the enzyme on all the carbon sources tested (Fig. 1), however, laccase formation was strongly affected by the substrate used. In general, substrates that were efficiently and rapidly utilized by the organism resulted in high levels of laccase activity as is evident for glucose or cellobiose, both yielding comparatively high levels of laccase (approx. 60–65 U ml⁻¹). When using glycerol, which is slightly slower consumed than glucose, similar activity levels were obtained, albeit after a longer cultivation time. Both lactose

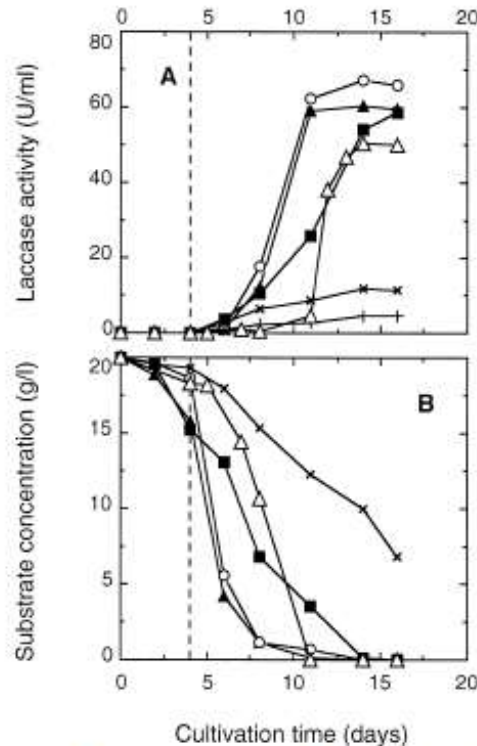


Fig. 1. Effect of various carbon sources (each employed at a concentration of 20 g l⁻¹) on laccase formation by *T. pubescens* MB 89 when grown in shaken flasks. In addition, the growth medium contained 5 g l⁻¹ yeast extract, 5 g l⁻¹ peptone from casein and 1 g l⁻¹ MgSO₄·7H₂O; CuSO₄·5H₂O was added after 4 days (marked by the dashed line) so that the final concentration was 2 mM. Values shown are the mean of duplicate cultivation experiments. Symbols: —▲—, glucose; —△—, fructose; —○—, cellobiose; —■—, glycerol; —×—, lactose; —+—, α -cellulose.

and α -cellulose (Sigma), which are only poorly utilized for growth, resulted in low laccase levels (Fig. 1).

Subsequently, the effect of varying glucose concentrations in the growth medium was studied (Fig. 2). Glucose was selected as the readily consumed substrate since laccase titers were comparable to those obtained with cellobiose, but it is a cheap and easily available carbon source. In general, increased laccase activities were obtained when *T. pubescens* was grown on media containing high glucose concentrations (Fig. 2). Increasing the glucose concentration from 10 g l⁻¹ to 40 g l⁻¹ resulted in a more than 5-fold increase in laccase activity. A further increase to 60 g l⁻¹ glucose did not further increase laccase activity, in fact, somewhat lower activities were obtained. As is evident from Fig. 2, an increased glucose concentration led to a prolonged lag phase of laccase synthesis. Apparently, higher glucose levels repressed laccase production. Significant lac-

THIS EFFECT WAS MORE PROMINENT FOR VANILIC ACID, WHICH ALSO SLIGHTLY REDUCED GROWTH OF THE FUNGUS (DATA NOT SHOWN).

3.3. Bioreactor cultivations

Production of laccase by *T. pubescens* was studied in a 20-liter laboratory fermenter; the working volume was 15 liters of a medium based on glucose and peptone from meat, which was found to be optimal for enhanced laccase formation in the previous experiments. The time course of a standard batch fermentation is shown in Fig. 5. Laccase synthesis was stimulated by the addition of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2 mM final concentration) after 48 h of growth. Since their effects were negligible or even negative, no aromatic inducers were used. As is evident from Fig. 5, the addition of Cu had a slightly inhibitory effect on growth and substrate consumption compared to the initial phase of growth previous to the addition of Cu. The growth phase of the organism was accompanied by a characteristic decrease in the culture pH from 5.0 to 3.6. It should be noted that the pH was not controlled during the fermentation. When glucose was exhausted from the medium, which occurred after approx. 300 h of cultivation, the pH increased sharply. The time of glucose depletion also coincided with the maximum amount of biomass formed (10.6 g l^{-1} mycelial dry weight). Thereafter, the biomass concentration decreased again, presumably because of the utilization of intracellular storage compounds and/or autolysis. Laccase synthesis only started after a long lag phase (approx. 75 h after Cu addition).

During the initial enzyme production phase, coinciding with the phase of glucose utilization, the laccase production rate was low. After close to complete consumption of glucose, laccase productivity was increased considerably. The maximum laccase activity of 333 U ml^{-1} was reached after 405 h of growth, corroborating the results obtained in the shaken flask experiments very well.

Since the production of laccase was most significant only after the substrate glucose was consumed and reached a certain low concentration in the medium, we subsequently studied the effect of continuously feeding a glucose solution to a 15-liter fermentation employing the same glucose-peptone from meat-based medium (Fig. 6). The initial cultivation conditions were similar to those of the batch cultivation described above. The only exception was the addition of Cu, which was supplemented to the actively growing culture after 123 h, since its addition in the reference batch cultivation apparently inhibited growth of *T. pubescens* to some extent. Glucose was again consumed after approx. 300 h. As in the previous cultivation, this initial growth phase was accompanied by a decrease in the culture pH, reaching a minimum of 3.3 that coincided with the time of glucose depletion. The maximum of biomass (11.1 g l^{-1} mycelial dry weight) was also obtained at this time. The glucose feed was started when glucose was almost completely depleted from the medium (302 h) and continued until the end of the fermentation. By selecting a low, constant feeding rate of 3.0 ml of glucose stock solution per

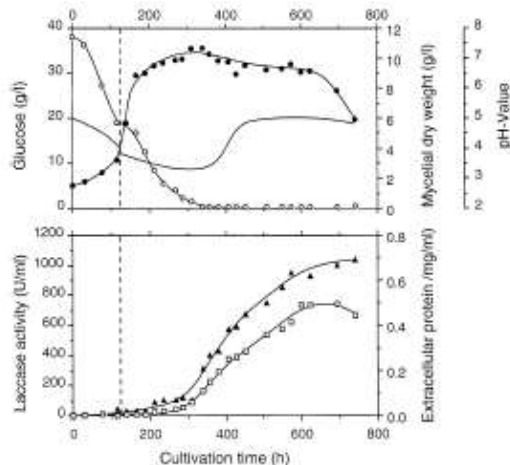


Fig. 6. Time course of a fed-batch laboratory cultivation of *T. pubescens* MB 89 in a 20-liter stirred tank reactor (working volume 15 liters) using a medium containing 40 g l^{-1} glucose, 10 g l^{-1} peptone from meat and 1 g l^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ was added after 123 h (marked by the dashed line) so that the final concentration was 2 mM. When the sugar substrate was depleted (302 h), a glucose solution (320 g l^{-1}) was continuously fed at a rate of 3 ml h^{-1} . The temperature was controlled at 25°C and the pH, initially adjusted to 5.0, was allowed to float. Aeration was automatically varied from 0.1 to 1.25 vol of air per fluid vol per min to maintain a $p\text{O}_2$ of 40% of air saturation, agitation was constant at 100 rpm. Symbols: \circ , glucose; \bullet , mycelial dry weight; —, pH-value; \square , laccase activity; \blacktriangle , extracellular protein.

h (corresponding to 0.06 g glucose per l medium per h) a very low, nonrepressing concentration of glucose ($<0.25 \text{ g l}^{-1}$) could be maintained for 440 h. In contrast to the batch cultivation, the pH rose less sharply to reach a maximum value of approx. 5. Furthermore, the mycelial dry weight decreased only slightly after exhaustion of glucose, then remained more or less constant for more than 200 h, and only dropped at the end of the fermentation. Corroborating the results obtained in the batch cultivation, enhanced production of laccase only occurred when the glucose concentration had dropped below a low, critical value. By continuously feeding low amounts of glucose this efficient production phase could be prolonged considerably to approx. 300 h, during which laccase activity increased almost linearly to reach a maximum of 743 U ml^{-1} after 692 h.

4. Discussion

Recently, we have shown that the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens* is an excellent producer of extracellular laccase activity. One important prerequisite for obtaining high laccase levels by this fungus is the presence of Cu in the millimolar range in the culture medium [20]. In this study laccase was produced under a variety of culture conditions to investigate their effects on laccase yields.

Optimum conditions for laccase production appear to be quite different to those typically reported for other fungi. Clearly, the most obvious difference is that the addition of aromatic compounds, which are routinely used to boost laccase formation in other organisms [8,21], is not necessary to achieve elevated laccase production by *T. pubescens*. The effects of some of these compounds, which enhance laccase synthesis in some other fungi up to several-fold, were negligible or even decreased laccase formation. Furthermore, laccase production by *T. pubescens* was found to be optimal in a rich medium containing peptone from meat as the only nitrogen source. The total N concentration of approx. 80 mM is considerably higher than that routinely used for the production of laccase in other fungi [17,31,36]. This confirms the importance of the N source and high N levels for laccase formation that has been pointed out in a recent review on fungal laccases [8]. However, this is a controversial subject and some authors have found that laccase activity increases under N limiting conditions [3,17].

Laccase formation in *T. pubescens* is not growth-associated. When using glucose as the substrate, increased laccase formation only started when glucose was depleted from the medium. Apparently, glucose when present in the culture medium above a certain concentration represses laccase synthesis in the fungus. Glucose is often found to repress genes that are used in the metabolism of alternative carbon sources. This glucose repression is widely known in fungi and yeasts and is thought to be an energy-saving response [23]. That glucose repression is effective in *T. pubescens* is also suggested by the existence of CreA consensus sequences in the promoter region of two laccase genes of this organism (Galhaup, unpublished results) which may encode binding sites for the repressor protein CreA [37]. CreA consensus sequences were also detected in the 5' noncoding region of a laccase gene from the basidiomycete I-62 which is also subject to glucose repression [38]. It is worth noting that the pattern of laccase isoenzymes and relative intensities of laccase bands as judged by isoelectric focusing and activity staining was identical during the entire laccase production phase of the laboratory cultivations studied, showing at least 8 isoforms with pI values ranging from 2.6–6.0 (data not shown).

The fact that laccase was efficiently produced by *T. pubescens* once the repressing substrate glucose was consumed could be conveniently used for increasing laccase production in a fed-batch cultivation. By continuously feeding a low, nonrepressing amount of glucose to a culture of *T. pubescens*, production of laccase could be increased more than 2-fold compared to a reference batch fermentation without feed. Furthermore, laccase productivity could be increased from 822 U (l h)^{-1} calculated for the batch fermentation to $1074 \text{ U (l h)}^{-1}$ for the fed-batch culture. The maximum laccase activity of 743 U ml^{-1} obtained in the fed batch fermentation is remarkably high when compared to reports on laccase production by other fungi for which

А.А. Клепиков¹, М.М. Шамцяна²

СКРИНИНГ И ИЗУЧЕНИЕ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В КАЧЕСТВЕ ПРОДУЦЕНТОВ ЛАККАЗ

Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Московский пр., д. 26

В результате проведенного в два этапа скрининга, отобран перспективный продуцент фермента лакказы, штамм гриба *Funalia trogii* ТИ 035. Для данного штамма изучена динамика оксидазной активности в культуральной жидкости в зависимости от концентрации в питательной среде ионов меди, а также от соотношения источников углерода и азота. Определены: термостабильность, молекулярная масса, температурный и pH-оптимум фермента.

Ключевые слова: продуцент лакказы, фермент, базидиальные грибы, скрининг.

Antrodia foliaceo-dentata ТИ 043; *Bjerkandera adusta* ТИ 001; *Cerrena unicolor* ТИ 026; *Ceriporiopsis resinascens* ТИ 030; *Coprinus lagopides* ТИ 012; *Coriolus hirsutus* ТИ 005; *Coriolus versicolor* 090; *Corticium roseum* ТИ 042; *Fomes fomentarius* ТИ 006; *Fomitopsis pinicola* ТИ 007; *Funalia trogii* ТИ 035; *Ganoderma applanatum* ТИ 009; *Ganoderma lucidum* 0860; *Grifola frondosa* ТИ 008; *Haplospilus rutilans* ТИ 041; *Hypsizygus ulmarius* ТИ 010; *Merulius tremellosus* ТИ 044; *Oligoporus cerifluus* ТИ 045; *Panus conchatus* ТИ 028; *Panus tigrinus* ТИ 025; *Pleurotus citrinopileatus* 0830; *Pleurotus ostreatus* 0553; *Pleurotus ostreatus* 0786; *Pytoporus betulinus* ТИ 018; *Skeletocutis lenis* ТИ 046; *Trametes suaveolens* ТИ 019. Исходные культуры базидиомицетов выращивали в пробирках на косяках сусло-агара при температуре 28-30 °С в течение 7 дней (до полного зарастания поверхности косяка) и хранили в холодильнике при температуре +4 °С.

Для отбора штаммов, обладающих наиболее высокой оксидазной активностью, проводили глубинное культивирование грибов в колбах Эрленмейера объемом 750 мл с объемом среды 150 мл на круговой качалке при 180 об/мин, 26–28 °С и исходным pH 6.0 на среде следующего состава (г/л): глюкоза – 10,0; пептон – 3,0; KH_2PO_4 – 0,6; K_2HPO_4 – 0,4; MgSO_4 – 0,5; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0005; вода водопроводная. В качестве индуктора вносилось 0,4 г/л $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. В дальнейших исследованиях с выбранным штаммом-продуцентом вносилось оптимизированное количество $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,15 г/л (0,6 мМ Cu^{2+}).

Определение экстрацеллюлярной оксидазной активности в культуральной среде. Активность определяли в нативном растворе культуральной жидкости спектрофотометрически при 410 нм, на спектрофотометре APPL PD-303 (Япония). В качестве хромогенного субстрата использовали 0,01 М раствор пирокатехина в 0,1 М цитратном буфере, pH 4,96. В кварцевую кювету объемом 3,5 мл вносили 0,1 мл культуральной жидкости, 3,4 мл раствора субстрата и определяли изменение оптической плотности за 1 мин. Для расчета активности брали прямолинейный участок изменения оптической плотности, угол наклона которого к оси абсцисс составлял около 45°. В случае, если угол наклона графика составлял более 45°, объем пробы уменьшали, соответственно увеличивая объем буфера. За единицу оксидазной активности (Ед/мл) принимали увеличение оптической плотности реакционной смеси при 410 нм за 1 мин, в пересчете на 1 мл раствора культуральной жидкости.

У всех 12 отобранных для второго этапа скрининга продуцентов, была обнаружена оксидазная активность в глубинной культуре. Наименьшую, следовую активность не превышающую 0,02 Ед/мл показали штаммы *Coprinus lagopides* ТИ 012 и *Ganoderma lucidum* 0860. Большинство из изученных штаммов обладали оксидазной активностью, не превышающей 1,6 Ед/мл (в порядке убывания): *Corticium roseum* ТИ 042, *Panus tigrinus* ТИ 025, *Coriolus versicolor* 090, *Skeletocutis lenis* ТИ 046, *Coriolus hirsutus* ТИ 005, *Haplospilus rutilans* ТИ 041, *Pleurotus citrinopileatus* 0830, *Panus conchatus* ТИ 028. В значительных количествах синтезировали лакказу только штаммы *Bjerkandera adusta* ТИ 001 и *Funalia trogii* ТИ 035. При этом максимальная оксидазная активность штамма *Funalia trogii* ТИ 035 равная 11,12 Ед/мл превышала максимальную оксидазную активность штамма *Bjerkandera adusta* ТИ 001 в 1,34 раза.

По результатам проведенного в два этапа скрининга в качестве наиболее перспективного продуцента для дальнейшего изучения был отобран штамм *Funalia trogii* ТИ 035.

Известно, что углерод и азот являются двумя наиболее важными компонентами питательной среды для любого ферментативного процесса [13], таким образом, изменяя количество одного или обоих компонентов в среде, можно обеспечить заметное улучшение продукции изучаемого фермента [14, 15]. Динамика оксидазной активности в зависимости от соотношения в питательной среде источников углерода и азота представлена на рисунке 2. Полученные данные показали значительное увеличение оксидазной активности в культуральной среде штамма *Funalia trogii* ТИ 035 при культивировании его на средах с высоким содержанием азота. Максимальная оксидазная активность 51,34 Ед/мл была достигнута на питательной среде с соотношением углерода к азоту равным 2 : 1 (10 г/л глюкозы, 15 г/л пептона) на 14 сутки культивирования.

Increased production of extracellular laccase by the white rot fungus *Coriolus versicolor* MTCC 138

Madhavi S. Revankar and S.S. Lele*

Food Engineering and Technology Department, Institute of Chemical Technology, University of Mumbai, Matunga, 400019 Mumbai, India, *Author for correspondence: Tel.: +91-22-24145616, Fax: +91-22-24145614, E-mail: sslele@udct.org

Received 13 December 2005; accepted 23 January 2006

Keywords: *Coriolus versicolor* 2,5-xylydine, laccase, media optimization, orthogonal array

Summary

The white rot fungus *Coriolus versicolor* MTCC 138 has been identified as an excellent producer of the industrially important enzyme laccase. The basal medium containing glucose gave laccase activity of 155 U/ml. Screening of different media components and their effects on laccase production by *Coriolus versicolor* was studied using one factor at a time and $L_9 (3^4)$ orthogonal array method. A two-fold increase (305 U/ml) in laccase production was observed using a combination of glucose and starch as carbon source and yeast extract as nitrogen source. This activity is very high as compared to most of the reported strains. Hence this strain was explored for enhancement in laccase. The formation of extracellular laccase could be considerably stimulated by the addition of copper in the optimized medium. Addition of 1 mM copper enhanced laccase activity to 460 U/ml. Laccase production was further enhanced using different aromatic inducers. Among different inducers used 2,5-xylydine was found to be the best, and gave maximum laccase activity of 820 U/ml with 1 mM concentration. Thus, this strain could be an efficient and attractive source for laccase production.

Introduction

Laccases (benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) are copper-containing enzymes that catalyse the oxidation of a wide variety of organic and inorganic substrates, including mono-, di-, and polyphenols, aminophenols, methoxyphenols, aromatic amines and ascorbate with the concomitant four-electron reduction of oxygen to water (Galhaup *et al.* 2002; Leitner *et al.* 2002). In basidiomycete fungi, extracellular laccases are constitutively produced in small amounts (Bollag & Leonowicz 1984), but their production can be stimulated by the presence of a wide variety of inducing substrates, mainly aromatic or phenolic compounds related to lignin or lignin derivatives, such as ferulic acid, 2,5-xylydine, *p*-anisidine or veratryl alcohol (Hess *et al.* 2002).

Fungal laccases form an important group of enzymes, as they are involved in the degradation of lignin and in removal of potentially toxic compounds (Thurston 1994). Laccase catalyses the oxidation of both phenolic and nonphenolic compounds and is able to degrade a wide range of synthetic dyes (Bourbonnais & Paice 1997). This makes the biocatalyst very suitable for its application to several bioprocesses such as biopulping, biobleaching and treatment of industrial wastewater. The main limitation for the extensive industrial

applications of laccase is its high cost. Therefore a good strategy to increase the productivity of the laccase fermentation process would be optimization of the fermentation medium and then enhancing laccase activity by using inducers. Optimization of fermentation media to have a balanced proportion of various nutrients is very important to get optimum microbial growth and enzyme yield. However many efforts are not carried out to enhance laccase activity by optimizing the nutritional requirements and the environmental conditions for submerged cultivation. Medium optimization by one factor at a time involves changing the independent variable (nutrient, temperature, pH etc.) while fixing the others at certain levels. However, this single dimensional search is laborious and time-consuming, especially for a large number of variables (Xu *et al.* 2003). Hence statistical methods are preferred, as they reduce the total number of experiments and understand the interactions among the nutrients at varying concentrations. The present work involves optimization of fermentation medium using a combination of one factor at a time and a statistics-based orthogonal array method. The effect of different aromatic inducers on laccase production by *Coriolus versicolor* was studied. An attempt was made to enhance laccase production using millimolar concentration of copper.

Materials and methods

Microorganisms

Coriolus versicolor MTCC 138 from Microbial Type Culture Collection & Gene Bank (MTCC), Institute of Microbial Technology (IMTECH) Chandigarh, India was used in the study. The organism was maintained through periodic transfer at 25 °C on potato dextrose agar plates.

Chemicals

Unless otherwise stated, chemicals were purchased from M/s Hi-Media Limited, Mumbai, and were of the highest purity available. 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) was obtained from Sigma, while 2,5-xylydine was procured from Merck India Ltd.

Culture medium

The basal medium used for the experiments was glucose 20 g/l, L-asparagine 2.5 g/l, DL-phenylalanine 0.15 g/l, adenine 0.0275 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l, CaCl_2 0.01 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g/l. The pH was adjusted to 5.0 after sterilization (Fahraeus & Reinhammar 1967).

To investigate the effect of carbon source on laccase production by *C. versicolor*, glucose was replaced by five different carbohydrate substrates viz. fructose, sucrose, lactose, starch and glycerol. To find out the effect of nitrogen source, L-asparagine was replaced with different nitrogen sources such as yeast extract, peptone, and ammonium sulphate. To study the effect of copper, a sterile stock solution of copper sulphate was added to the actively growing cultures on fourth day of incubation so that the final concentration ranges between 0.5 and 5 mM. No additional copper sulphate was added in the control. To study the effect of inducers, different aromatic inducers such as *p*-anisidine (*p*-methoxyaniline),

gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid), ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid), guaicol, 1-hydroxybenzotriazole (HBT) and 2,5-xylydine were dissolved in 50% ethanol as stock solution and sterilized by filtration. Catechol and vanillic acid were dissolved in sterile water aseptically to give concentration of 0.1 M. On the fourth day of incubation 0.1 M inducers were added to the growing fungal cultures so that the final concentration in the flask was 1 mM.

Culture conditions

Four agar plugs cut from actively growing fungal colonies on potato dextrose agar plate were used as inoculum. Shake flask cultures of organisms were grown at room temperature 28 °C (± 4 °C) with continuous agitation at 150 rev/min in a 250-ml Erlenmeyer flask containing 50 ml basal medium. Samples from duplicate flasks were collected periodically, centrifuged at 8000g for 20 min at 15 °C. The clear supernatant was used for determination of laccase activity.

Enzyme activity assay

Laccase activity was determined by measuring the oxidation of 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) at 420 nm ($\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) (Niku Paavola *et al.* 1988). The reaction mixture contained 0.4 ml of 1 mM ABTS and 1.2 ml 0.1 M glycine-HCl buffer pH 3 and 0.8 ml aliquots of appropriately diluted culture fluid. One activity unit was defined, as amount of enzyme that oxidized 1 μmol ABTS per min. The activities were expressed in U/ml. All enzyme analysis was carried out in duplicate. All experiments were performed in triplicate. Results are mean of \pm SD of triplicate experiments.

Orthogonal matrix method

The design for the L_9 (3^4) orthogonal array was developed and analysed using 'MINITAB 13.30' software. Table I shows L_9 (3^4) orthogonal array and the

Table I. L_9 (3^4) Orthogonal array design for laccase production by *C. versicolor* MTCC 138.

| Run | L_9 (3^4) orthogonal array design | | | | Levels of variables | | | | Result |
|-----|---|------------|------------------|--------------------|---------------------|------------------|------------------------|--------------------------|--------------------|
| | A: Starch | B: Glucose | C: Yeast Extract | D: CuSO_4 | A: Starch (g/l) | B: Glucose (g/l) | C: Yeast Extract (g/l) | D: CuSO_4 (g/l) | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5 | 5 | 1.25 | 0.001 | 218.57 \pm 0.08 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 5 | 10 | 2.5 | 0.002 | 178.99 \pm 0.03 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 5 | 15 | 5 | 0.004 | 179.50 \pm 0.07 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 10 | 5 | 2.5 | 0.004 | 183.39 \pm 0.091 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 10 | 10 | 5 | 0.001 | 239.89 \pm 0.12 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 10 | 15 | 1.25 | 0.002 | 151.84 \pm 0.01 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 15 | 5 | 5 | 0.002 | 121.12 \pm 0.23 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 15 | 10 | 1.2 | 0.004 | 235.21 \pm 0.04 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 15 | 15 | 2.5 | 0.001 | 287.00 \pm 0.03 |

Enzyme activity was determined after 7 days of cultivation.

^aResults are mean of \pm SD of three determinations.

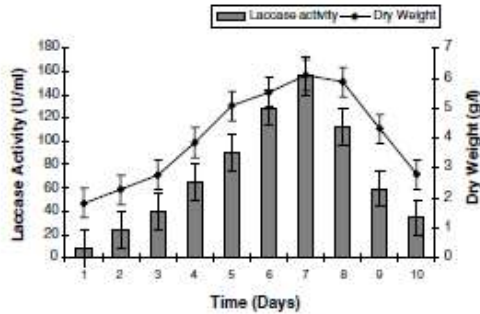


Figure 1. Growth curve of *C. versicolor* MTCC 138 in basal medium. Results are the mean \pm SD of triplicate experiments.

concentration of different media components that were used in the present study.

Results and discussion

Preliminary experiments were carried out to determine laccase activity in the basal medium. Figure 1 shows the growth curve of *Coriolus versicolor* MTCC 138 in basal medium. A maximum activity of 155 U/ml was obtained. So to enhance laccase production the main step was medium optimization. A combination of one factor at a time and the statistical method has proved to be a powerful and useful tool for media optimization and hence was used in the present work.

One factor at a time method

Medium optimization by the one-factor-at-a-time method involves changing the independent variable while fixing the others at certain levels. Selection of appropriate carbon and nitrogen sources are crucial in the development of an efficient and economic process. Hence these two parameters were selected in the present work.

To investigate the effect of different carbon sources on laccase production, glucose (20 g/l) was replaced by

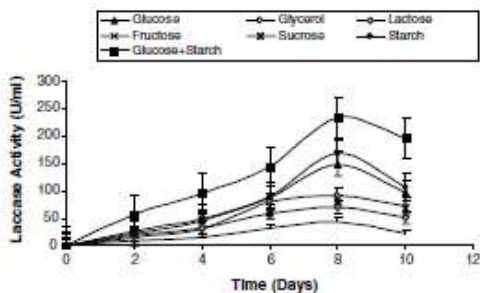


Figure 2. Effect of different carbon sources on laccase production by *C. versicolor* MTCC 138. Results are the mean \pm SD of triplicate experiments.

different carbohydrate sources such as starch, glycerol, sucrose, fructose, and lactose in same concentration. Figure 2 documents the effect of different carbon sources on laccase production. It was observed that laccase production started from day 2 of incubation and increased up to day 8 in all carbon sources tested. Minimum laccase activity of 44 U/ml was obtained with fructose as carbon source, this might be due poor utilization of fructose by the organism. Maximum laccase activity 170 U/ml was obtained with starch as sole carbon source. This may be because *Coriolus versicolor* is known to be a lignin-degrading organism and hence has the ability to efficiently utilize starch as the carbon source by enzymatic hydrolysis of polysaccharides (Zafar *et al.* 1989; Valmaseda *et al.* 1991). When glucose was used as the carbon source 150 U/ml of laccase activity was obtained. Therefore it was thought that if the starch-containing medium were supplemented with glucose, a significant enhancement in laccase production would take place due to synergetic effects. Hence a 1:1 combination of starch and glucose was tried. Approximately 1.5-fold increase in laccase activity (235 U/ml) was obtained as compared to sole glucose containing (150 U/ml) medium. This may be attributed to the fact that glucose when present in the culture medium above certain concentration represses laccase synthesis in the fungus. But when used in combination of starch, initially the free glucose available is rapidly utilized by the organism for its growth and then with the depletion of free glucose; starch is efficiently utilized resulting in increased laccase production.

The next step was to assess the effect of different nitrogen sources (organic and inorganic) on laccase production when grown in medium containing 20 g glucose/l. Each nitrogen source was added to the basal medium at a concentration of 2.5 g/l. Figure 3 depicts the effect of nitrogen sources on laccase production. Inorganic nitrogen source such as ammonium sulphate (35 U/ml) gave low yields of laccase activity while maximum laccase activity of 185 U/ml was obtained using yeast extract. Hence yeast extract was selected as the best nitrogen source. From Figure 3 it can be said

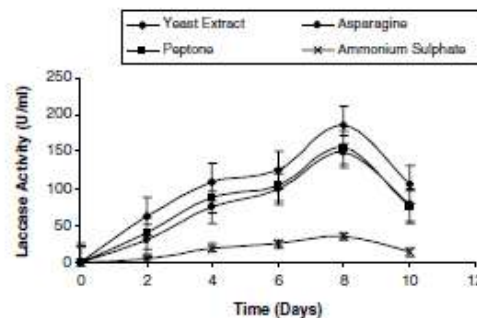


Figure 3. Effect of different nitrogen sources on laccase production by *C. versicolor* MTCC 138. Results are the mean \pm SD of triplicate experiments.

organic nitrogen sources are important for laccase production, and they could not be substituted by inorganic substituents. These results are in agreement with Hess *et al.* (2002).

Orthogonal matrix method

The orthogonal matrix method has been successfully used to improve the culture media for the production of primary and secondary metabolites in fermentation processes (Lee *et al.* 1997). To investigate the relationships between variables of medium components and to optimize their concentrations for laccase production by *Coriolus versicolor* MTCC 138, the orthogonal matrix method was used. $L_9 (3^4)$ orthogonal array was selected with four variables at three different concentration levels. The variables optimized in the present study involved concentrations of Glucose, Starch, Yeast Extract and CuSO_4 . The experimental conditions were similar to that used for the one factor at a time experiments. The experimental set is shown in Table 1 along with the different concentration of variables used in the orthogonal array. The experimental results are included in last column of Table 1.

The data obtained from orthogonal array method was analysed using Minitab 13.30 software. Table 2 represents the response table for means (larger is better) obtained for $L_9 (3^4)$ orthogonal array. The last two rows in the tables document the delta values and ranks for the system. Rank and delta values help to assess which factors have the greatest effect on the response characteristic of interest. Delta measures the size of the effect by taking the difference between the highest and the lowest characteristic average for a factor. The higher the delta value the greater is the effect of that component on laccase activity. Rank, orders the factors from the greatest effect (based on the delta values) to the least effect on the response characteristic. According to the magnitude of order of delta, the order of effect of factors on laccase activity was $\text{CuSO}_4 > \text{Glucose} > \text{Yeast Extract} > \text{Starch}$. This suggests that copper sulphate has the most effect on laccase production.

The optimum levels of each factor obtained by statistical analysis are shown in Figure 4. Figure 4 repre-

Madhavi S. Revankar and S.S. Lele

Table 2. Response table for means.

| Level | A: starch | B: Glucose | C: Yeast Extract | D: CuSO_4 |
|-------|-----------|------------|------------------|--------------------|
| 1 | 192.34 | 174.379 | 201.849 | 248.45 |
| 2 | 191.66 | 217.988 | 216.443 | 150.70 |
| 3 | 214.504 | 206.147 | 180.22 | 199.358 |
| Delta | 22.84 | 43.61 | 36.22 | 97.74 |
| Rank | 4 | 2 | 3 | 1 |

sents the main effect plots for the system. Main effects plots show how each factor affects the response characteristic. In the present study, it can be seen that for each of the four variables at three levels we find that one level increases the mean compared to the other level. This difference is a main effect, i.e. Starch at level 3, Glucose at level 2, Yeast Extract at level 2, CuSO_4 at level 1 show a main effect. These levels also represent the optimal concentrations of the individual components in the medium. Thus the optimum levels are as follows 15 g/l Starch, 10 g/l Glucose, 2.5 g/l Yeast Extract, and 0.001 g/l CuSO_4 . Using these nutrient concentrations MINITAB Software predicted a value of 299 U/ml for laccase production. This value was verified experimentally and laccase activity of 306 U/ml was obtained. This implied that the selected nutrient concentrations were the most suitable for laccase production (Figure 5).

Enhancement of laccase production by copper and aromatic inducers

A combination of orthogonal array and one factor at a time method for media optimization could achieve laccase activity of 306 U/ml, which is much higher than most of the reported strains. Results of orthogonal array matrix (Figure 4) suggested that copper has an important effect on laccase formation. Copper as micronutrient has a key role as metal activator and induces both laccase transcription and plays important role in laccase production (Palmieri *et al.* 2000). Hence the effect of copper on laccase production by *Coriolus versicolor* was studied. Different concentrations of copper sulphate were added so that the final concentration of copper varied from 0.5 to 5 mM. It can be seen from Figure 6

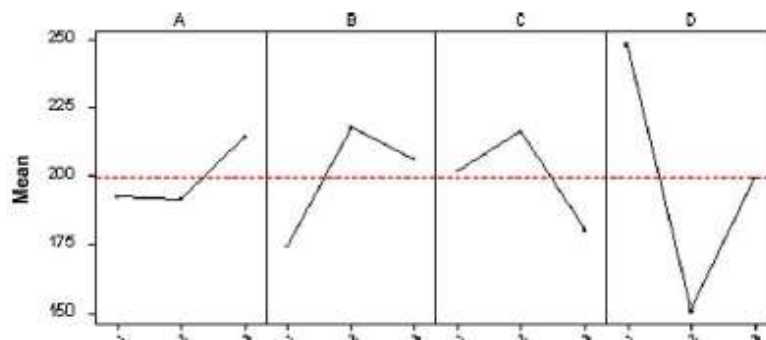


Figure 4. Main Effect Plot for laccase production by *C. versicolor* MTCC 138. A: Starch; B: glucose; C: yeast extract; D: CuSO_4 .

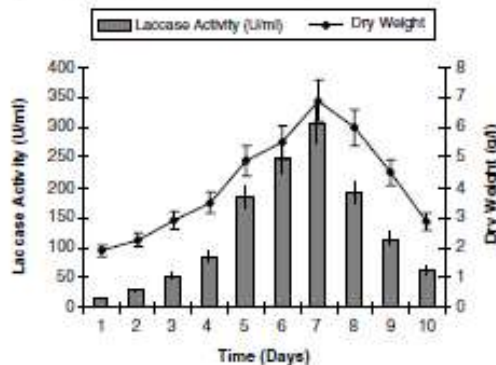


Figure 5. Growth Curve of *C. versicolor* MTCC 138 using optimized medium. Results are the mean \pm SD of triplicate experiments.

that increasing concentrations of copper from 0.5 to 1 mM increased laccase activity. Maximum laccase production of 460 U/ml was obtained with 1 mM copper. However substantial reduction in laccase activity was observed with increase in copper concentration to 2 mM. This may be because at high concentrations,

copper act as a potent inhibitor of fungal growth. At very high concentration of 5 mM, copper was found to be toxic to the organism with almost negligible laccase production.

The next step was to enhance laccase production using putative aromatic inducers. Extracellular laccases are constitutively produced in small amounts. However their production can be greatly stimulated by presence of wide variety of inducing substances. Hence it was thought that addition of aromatic inducers might further enhance laccase production. Different inducers such as *p*-anisidine, gallic acid, ferulic acid, catechol, guaicol, 1-hydroxybenzotriazole and 2,5-xylydine were added at 1 mM concentration after 4 days of incubation. Figure 7 documents the effect of the various aromatic inducers on laccase production. Enhanced production of laccase was observed as these compounds have structural similarity to lignin and lignin derivatives. Substantial increase in laccase activity was observed using *p*-anisidine (397 U/ml), gallic acid (480 U/ml) as compared to control (304 U/ml). 2,5-xylydine was found to be the best inducer and gave the maximum laccase activity 511 U/ml after 6 days of incubation. Thus increase in laccase activity and reduction in batch time was achieved with 1 mM 2,5-xylydine. The next step was

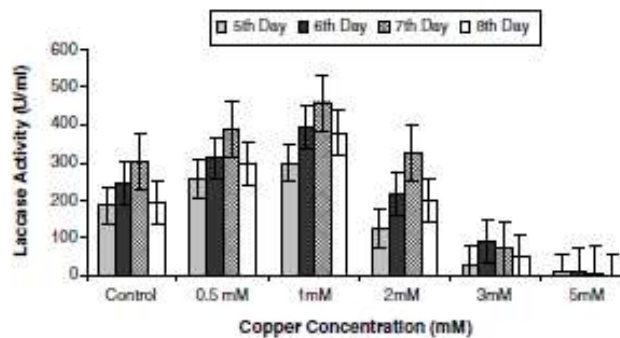


Figure 6. Effect of Copper on laccase production by *C. versicolor* MTCC 138. Results are the mean \pm SD of triplicate experiments.

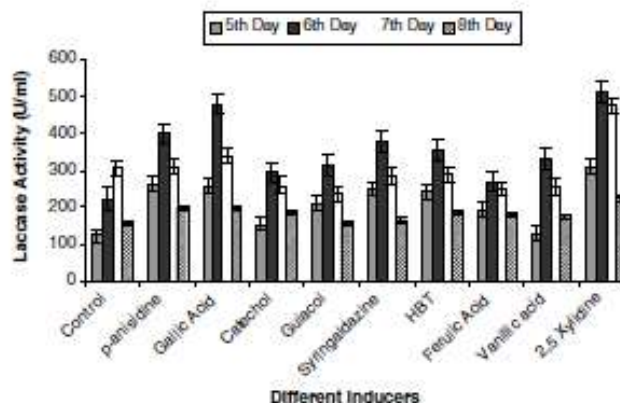


Figure 7. Effect of different inducers on laccase production by *C. versicolor* MTCC 138. Results are the mean \pm SD of triplicate experiments.

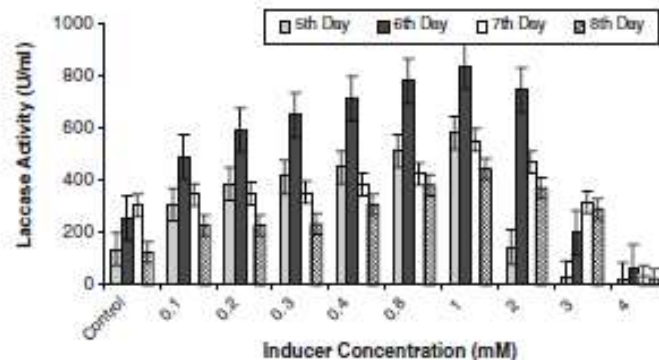


Figure 8. Effect of varying concentration of 2,5-xylydine on laccase production by *C. versicolor* MTCC 138. Results are the mean \pm SD of triplicate experiments.

to find the optimum concentration of 2,5-xylydine. The concentration of 2,5-xylydine was varied in the range of 0.1–4 mM. Figure 8 shows the effect of varying concentrations of 2,5-xylydine. The highest laccase activity of 820 U/ml was obtained with 1 mM 2,5 xylydine in 6 days. With an increase in concentration of 2,5-xylydine significant reduction in laccase activity was observed. Concentrations more than 2 mM had a detrimental effect on the organism and the laccase activities were below the control values. This may be because at very high concentrations 2,5-xylydine may be toxic to the organism leading to the reduction in cell growth and enzyme production.

Conclusion

The white rot fungus *Coriolus versicolor* MTCC 138 was found to be an efficient laccase producer. The medium was optimized using one factor at a time and orthogonal array method. A simple starch and glucose-based medium gave a laccase activity of 305 U/ml. Addition of 1 mM copper as copper sulphate enhanced the laccase production to 460 U/ml. Induction of laccase with 2,5-xylydine enhanced the laccase production to 820 U/ml. Laccase activities achieved are very high as compared to most of the reported strains under similar conditions. Therefore this strain could be an attractive source as a laccase producer.

References

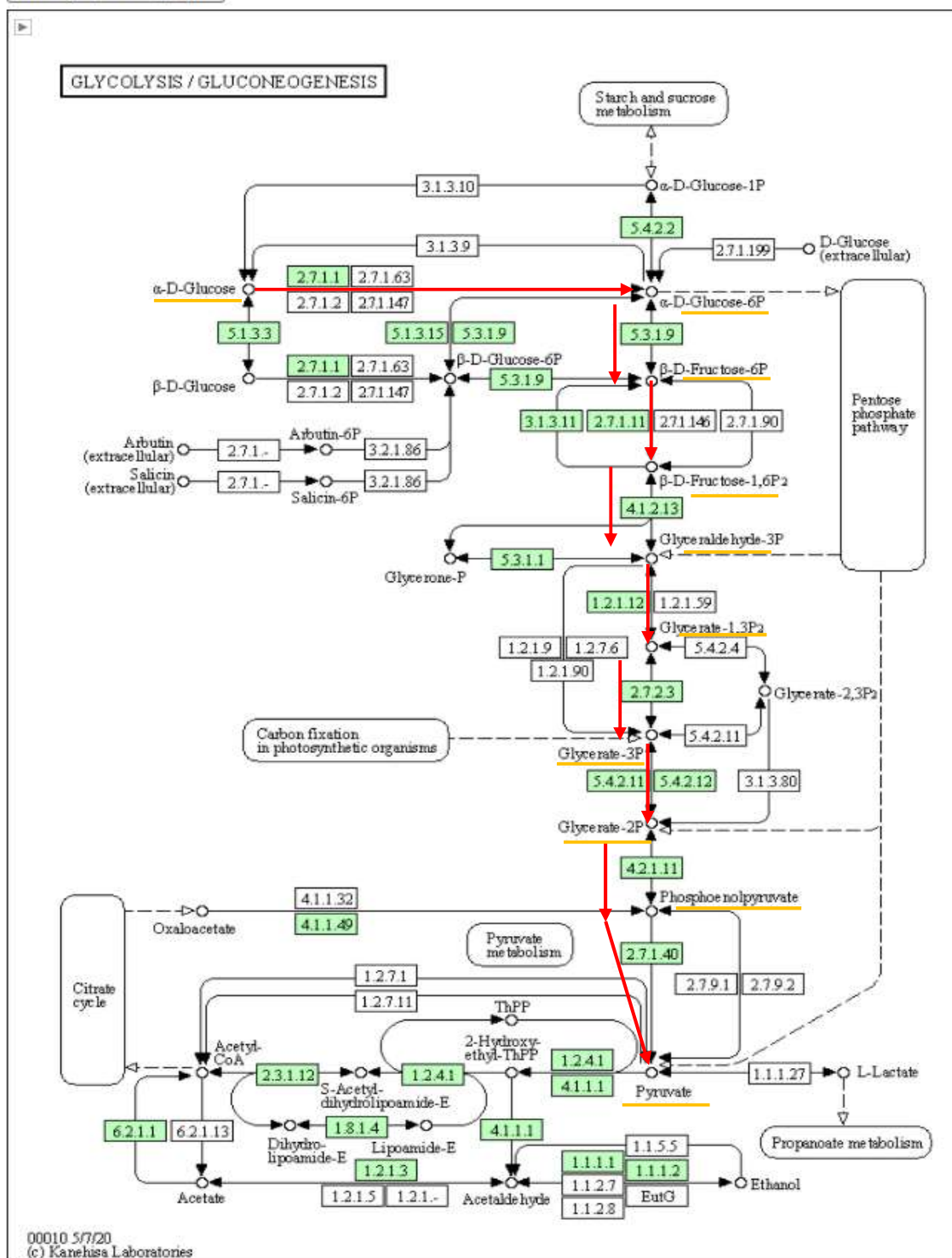
Bolla, J.M. & Leonowicz, A. 1984 Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **48**, 849–854.

- Bourbonnais, R. & Paice, M.G. 1997 Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of ABTS. *Applied and Environmental Microbiology* **36**, 823–827.
- Fahraeus, G. & Reinhammar, B. 1967 Large scale production and purification of laccase from cultures of the fungus *Polyporus versicolor* and some properties of Laccase A. *Acta Chemica Scandinavica* **21**, 2367–2378.
- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoiser, B. & Haltrich, D. 2002 Increased production of laccase by the wood degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* **30**, 529–536.
- Hess, J., Leitner, C., Galhaup, C., Kulbe, K.D., Hinterstoiser, B., Steinwender, M. & Haltrich, D. 2002 Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **98–100**, 229–241.
- Lee, M.T., Chen, W.C. & Chou, C.C. 1997 Medium improvement by orthogonal array design for cholesterol oxidase production by *Rhodococcus aquino*. *Process Biochemistry* **32**, 697–703.
- Leitner, C., Hess, J., Galhaup, C., Ludwig, R., Nidetzky, B., Kulbe, K.D. & Haltrich, D. 2002 Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **98–100**, 497–507.
- Niku Paavola, M.L., Karhunen, E., Salola, P. & Raunio, V. 1988 Lignolytic enzymes of the white rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochemical Journal* **254**, 877–884.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. & Sanna, G. 2000 Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 920–924.
- Thurston, C.F. 1994 The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**, 19–26.
- Valmaseda, M., Martinez, M. & Martinez, A. 1991 Kinetics of wheat straw solid-state fermentation with *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus*—lignin and polysaccharide alteration and production of related enzymatic activities. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **35**, 817–823.
- Xu, C.P., Kim, S.W., Hwang, H.J., Choi, J.W. & Yun, J.W. 2003 Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paeclomyces tenuipes* C240. *Process Biochemistry* **38**, 1025–1030.
- Zafar, S.I., Sheeraz, Q. & Abdulla, N. 1989 Degradation of lignocellulosic component on wheat straw—*Coriolus versicolor* solid state fermentation under nitrogen starved conditions. *Biological Wastes* **27**, 67–70.

KEGG Glycolysis / Gluconeogenesis - *Trametes versicolor*

[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Show description | Image (png) file | Help]

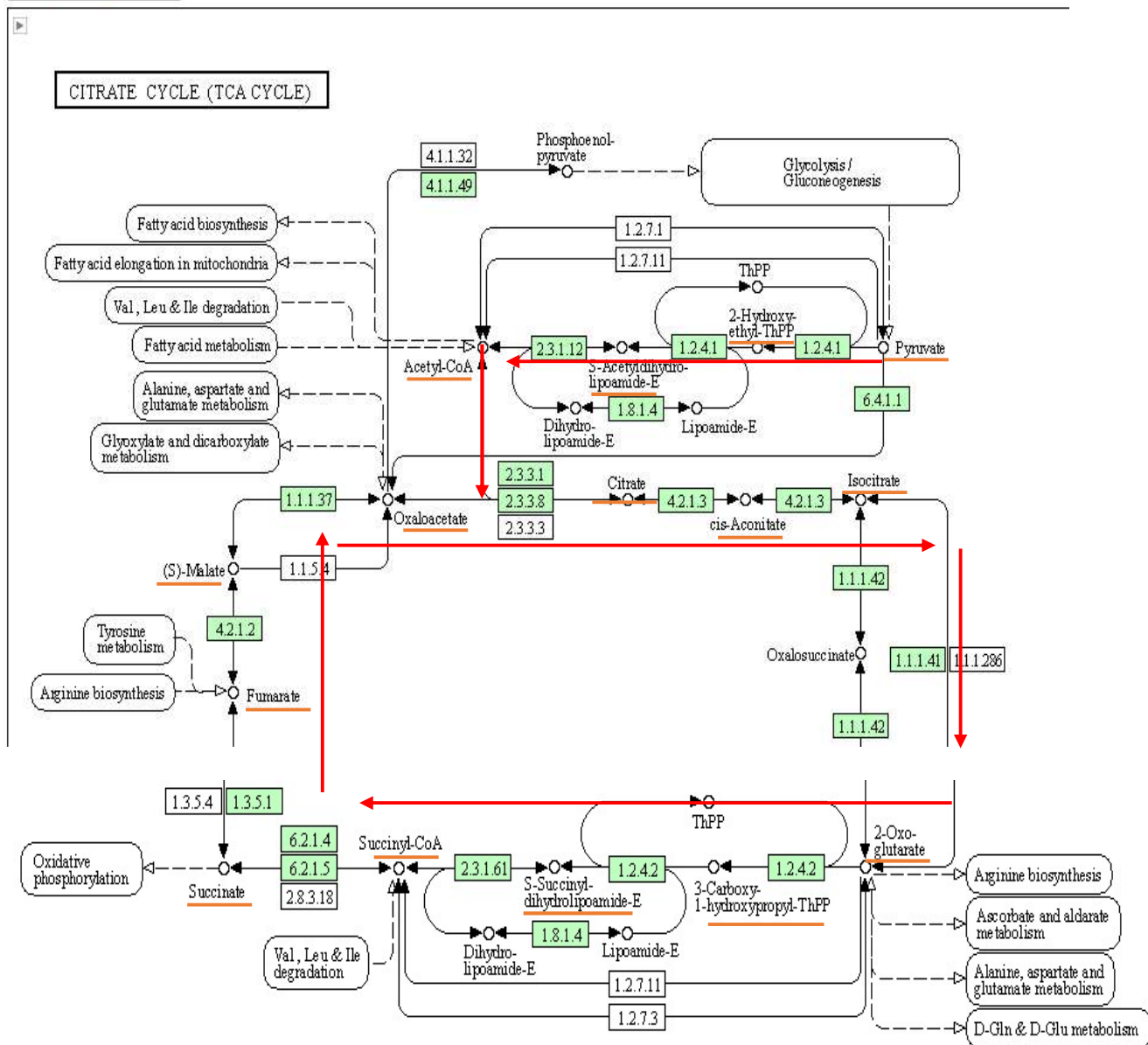
Change pathway type



KEGG Citrate cycle (TCA cycle) - *Trametes versicolor*

[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Show description | Image (png) file | Help]

Change pathway type



00020 2/8/21
(c) Kanehisa Laboratories



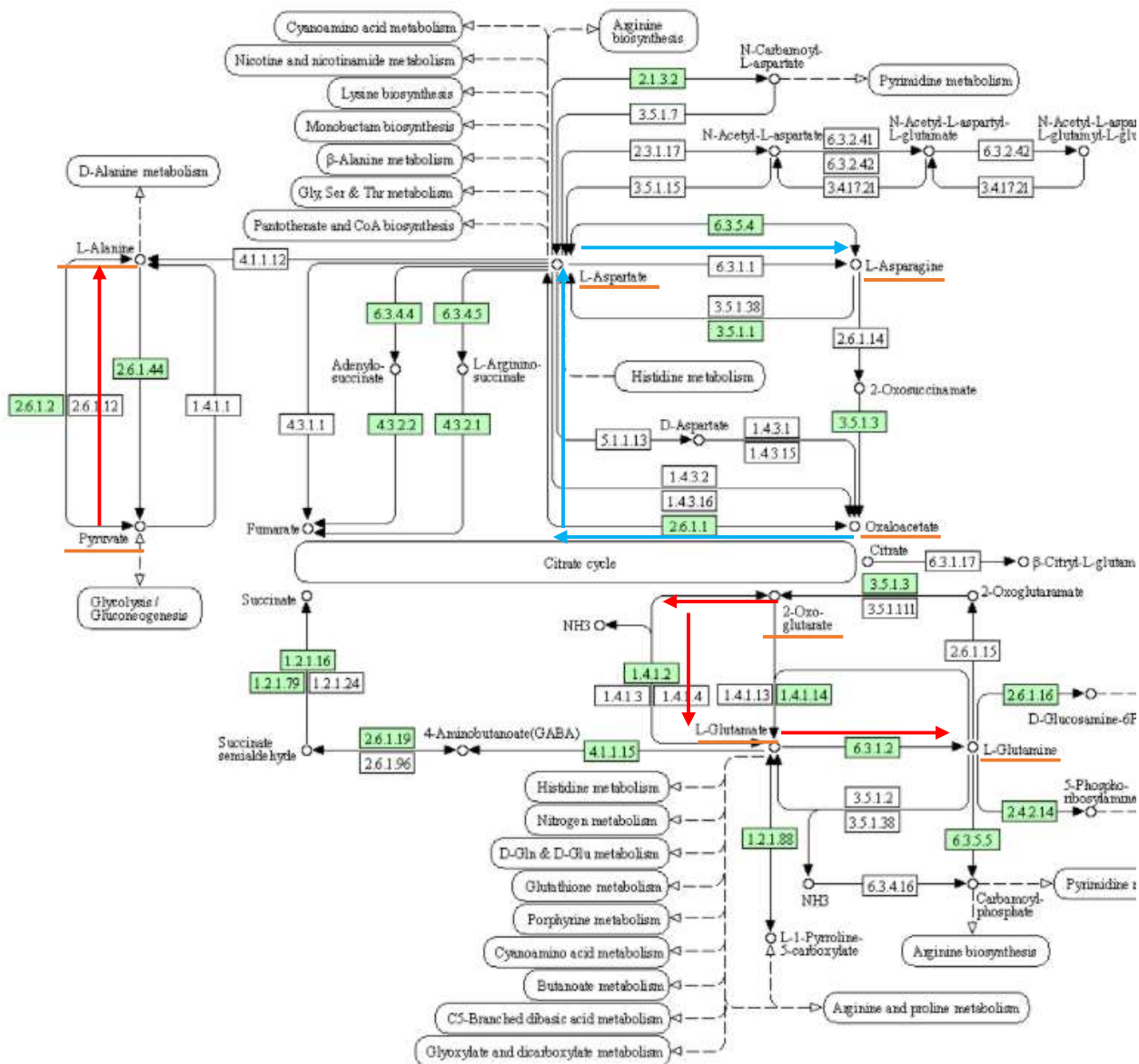
Alanine, aspartate and glutamate metabolism - *Trametes versicolor*

Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Image (png) file | Help]

Change pathway type



ALANINE, ASPARTATE AND GLUTAMATE METABOLISM

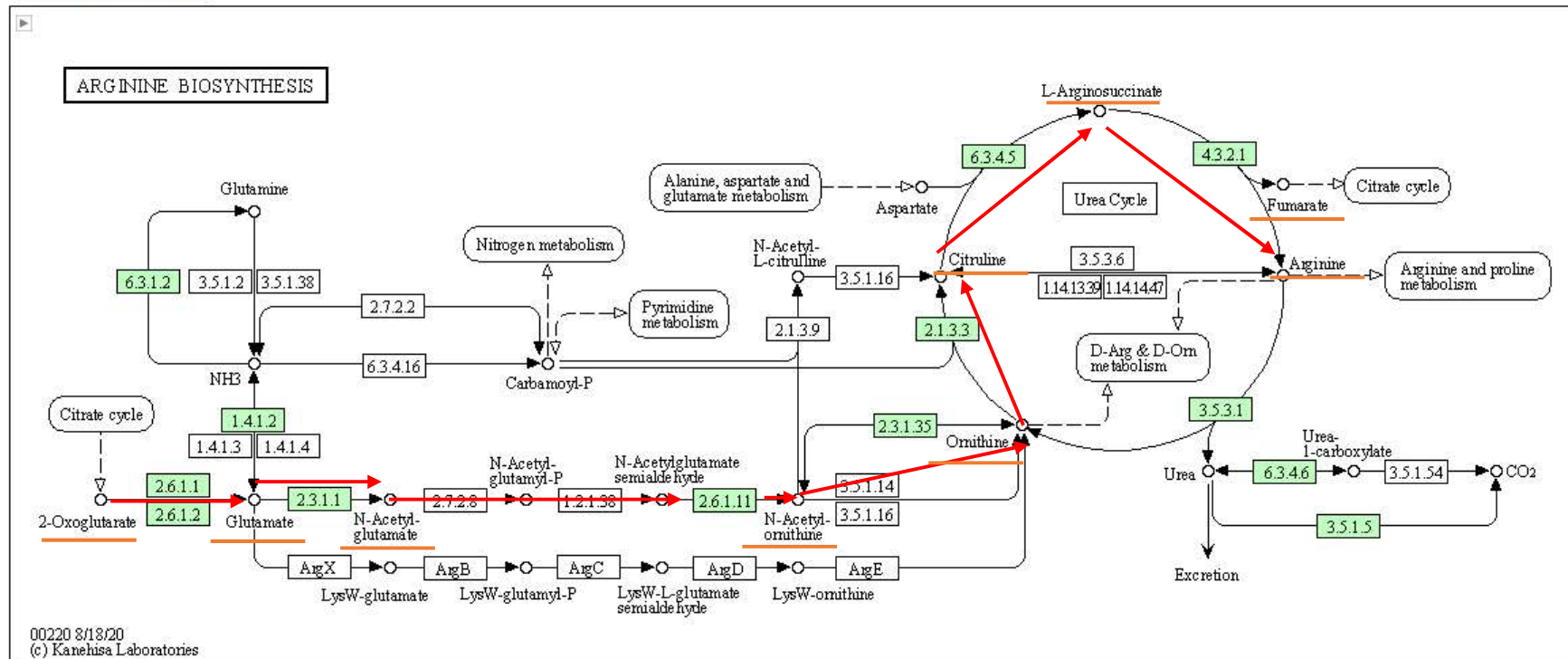


Q50129/20
| Kanehisa Laboratories

KEGG Arginine biosynthesis - *Trametes versicolor*

[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Image (png) file | Help]

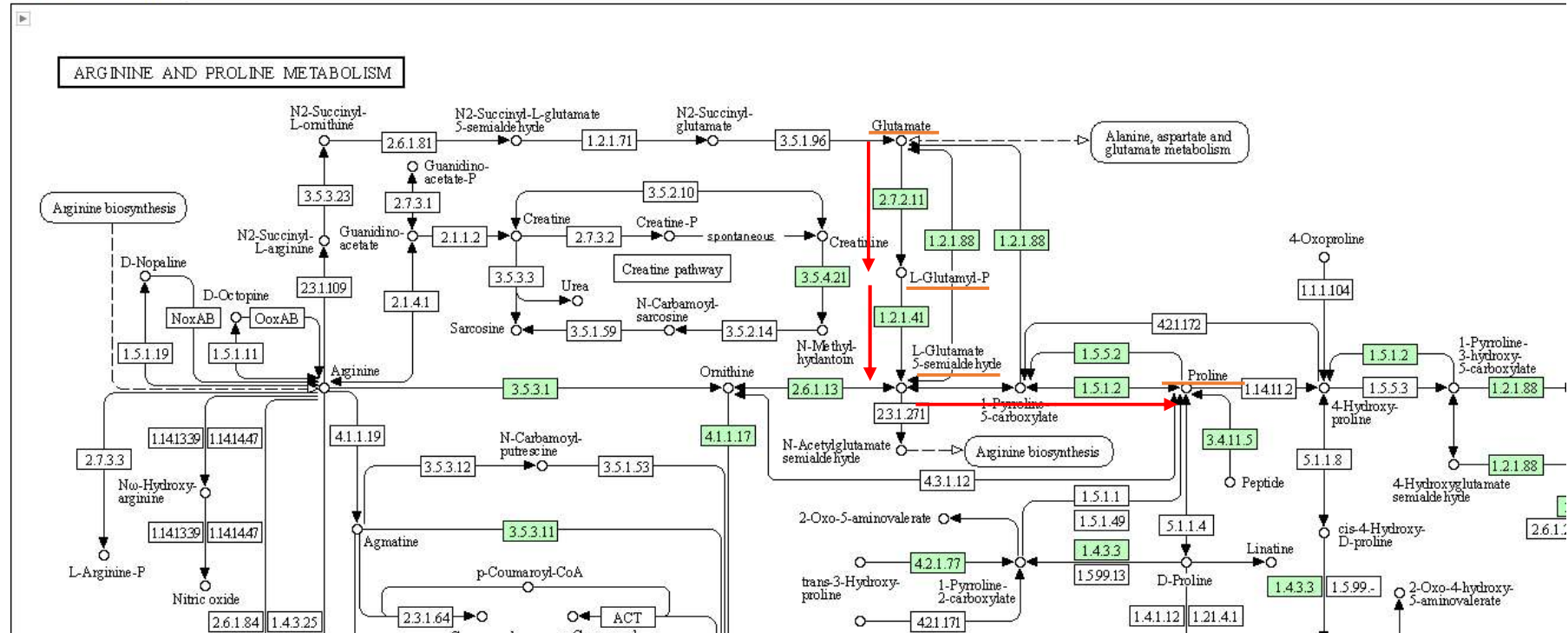
Change pathway type



KEGG Arginine and proline metabolism - *Trametes versicolor*

[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Image (png) file | Help]

Change pathway type

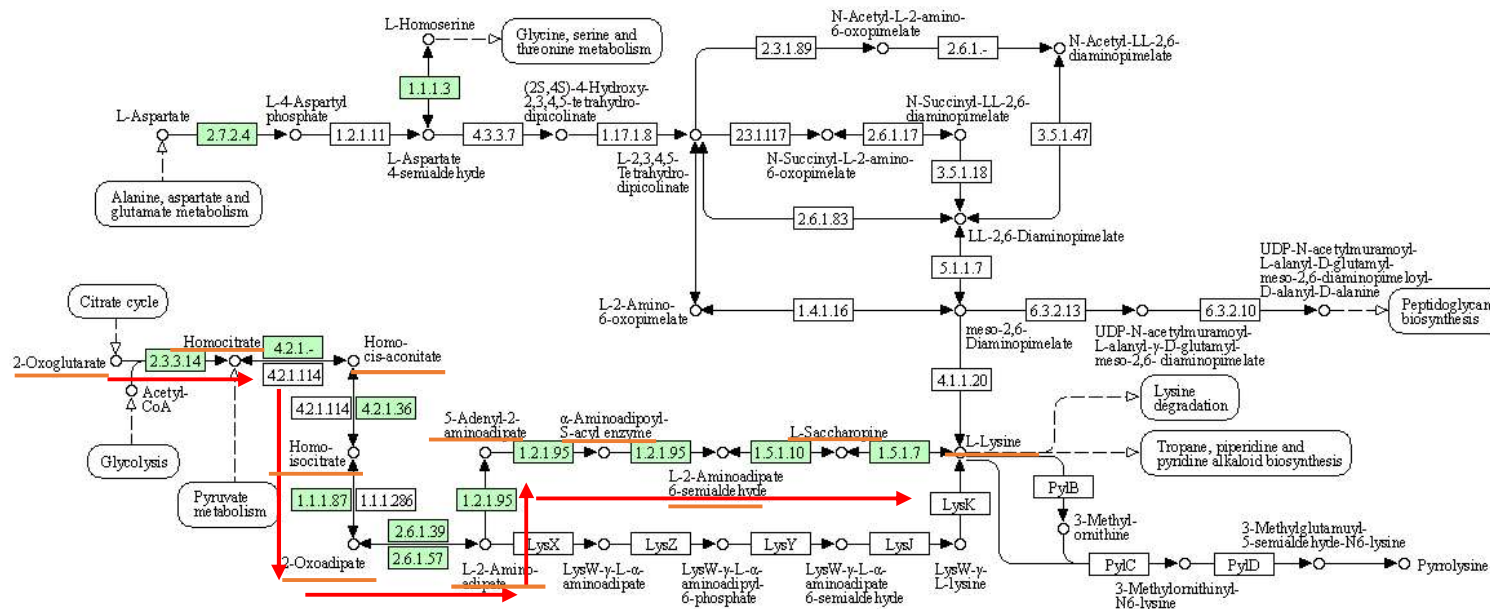


KEGG Lysine biosynthesis - *Trametes versicolor*

[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Image (png) file | Help]

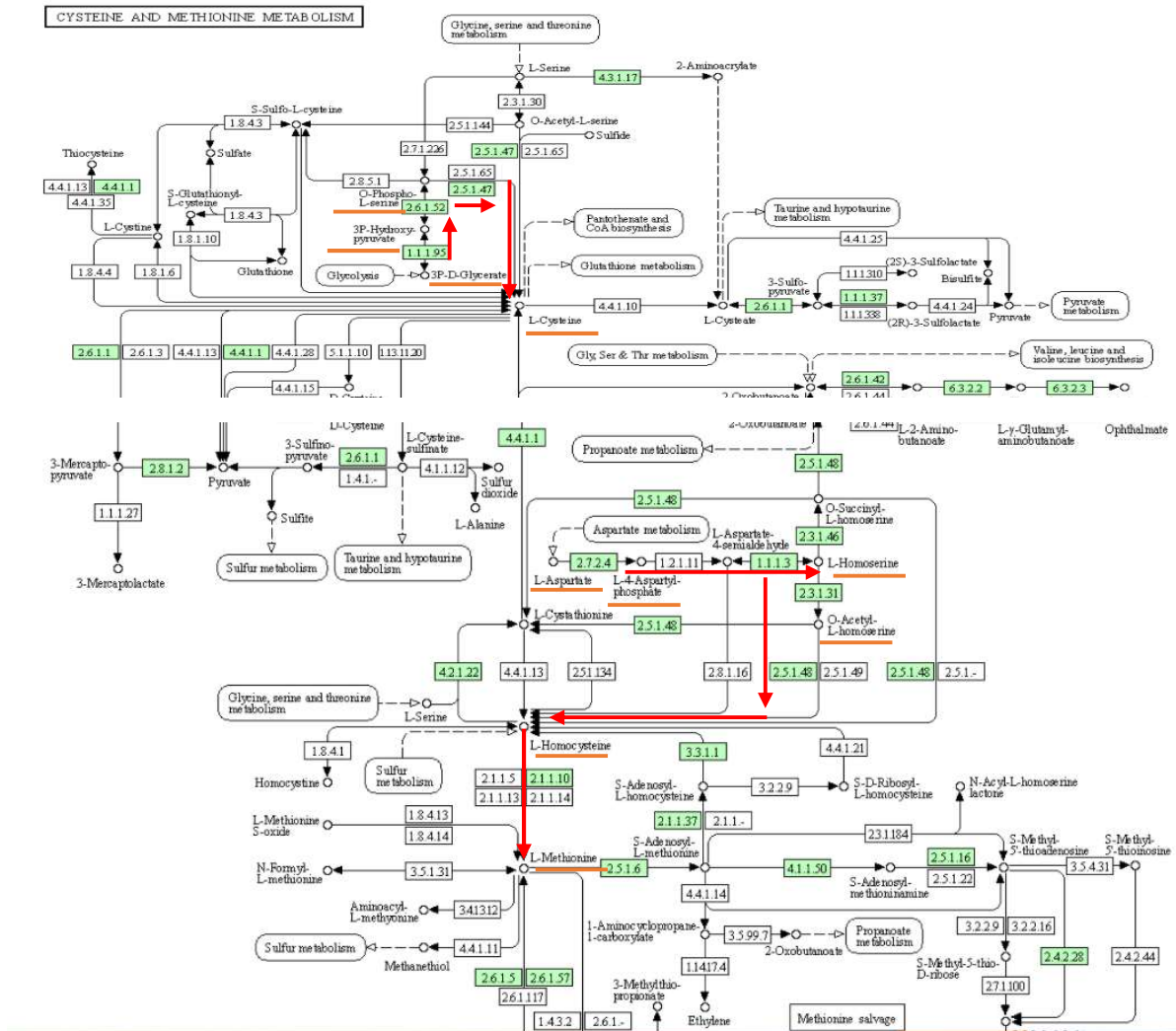
Change pathway type

LYSINE BIOSYNTHESIS



KEGG Cysteine and methionine metabolism - *Trametes versicolor*

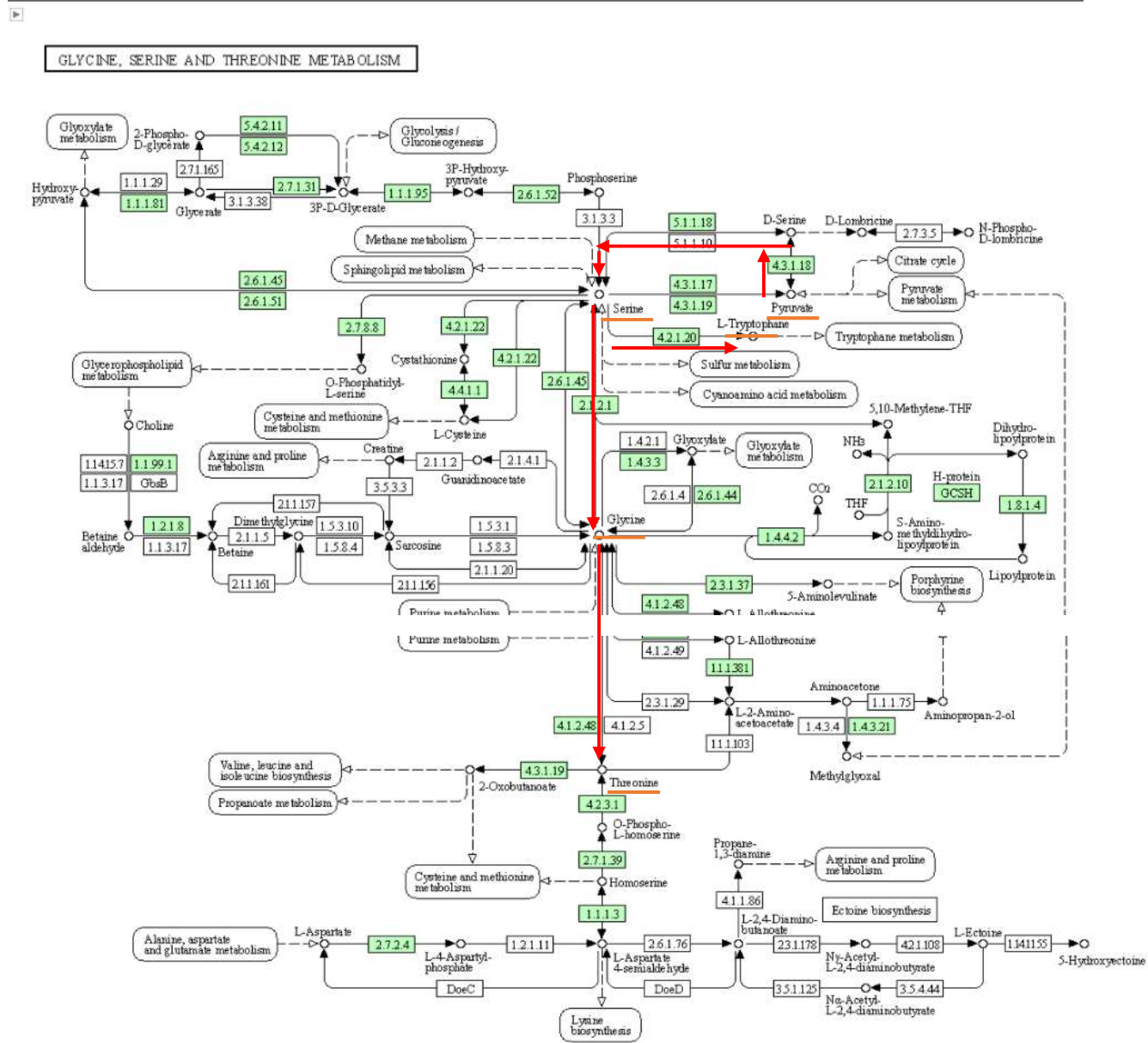
[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Show description | Image (png) file | Help]
 Change pathway type



KEGG Glycine, serine and threonine metabolism - *Trametes versicolor*

[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Show description | Image (png) file | Help]

Change pathway type

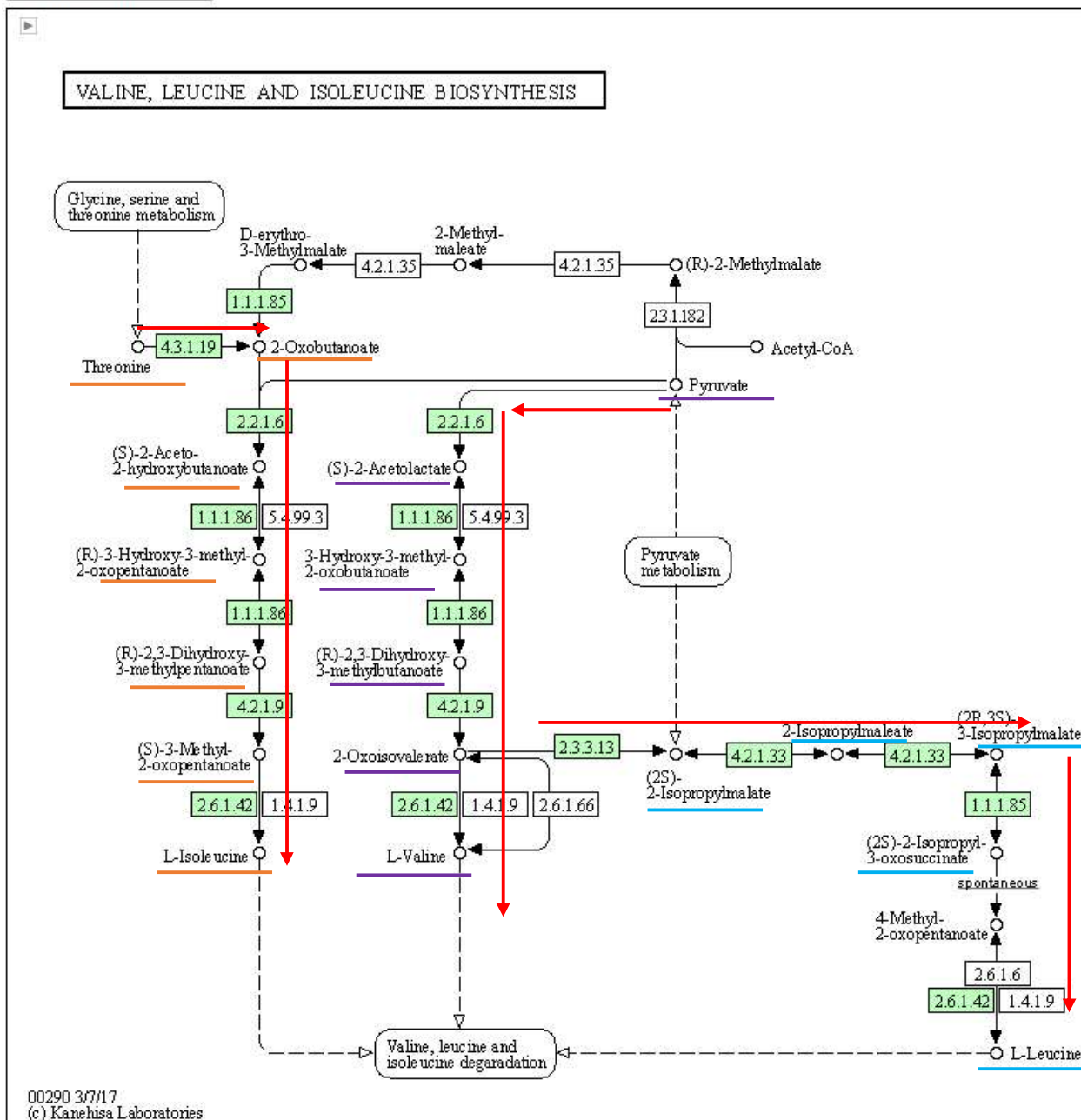




Valine, leucine and isoleucine biosynthesis - *Trametes versicolor*

[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Image (png) file | Help]

Change pathway type

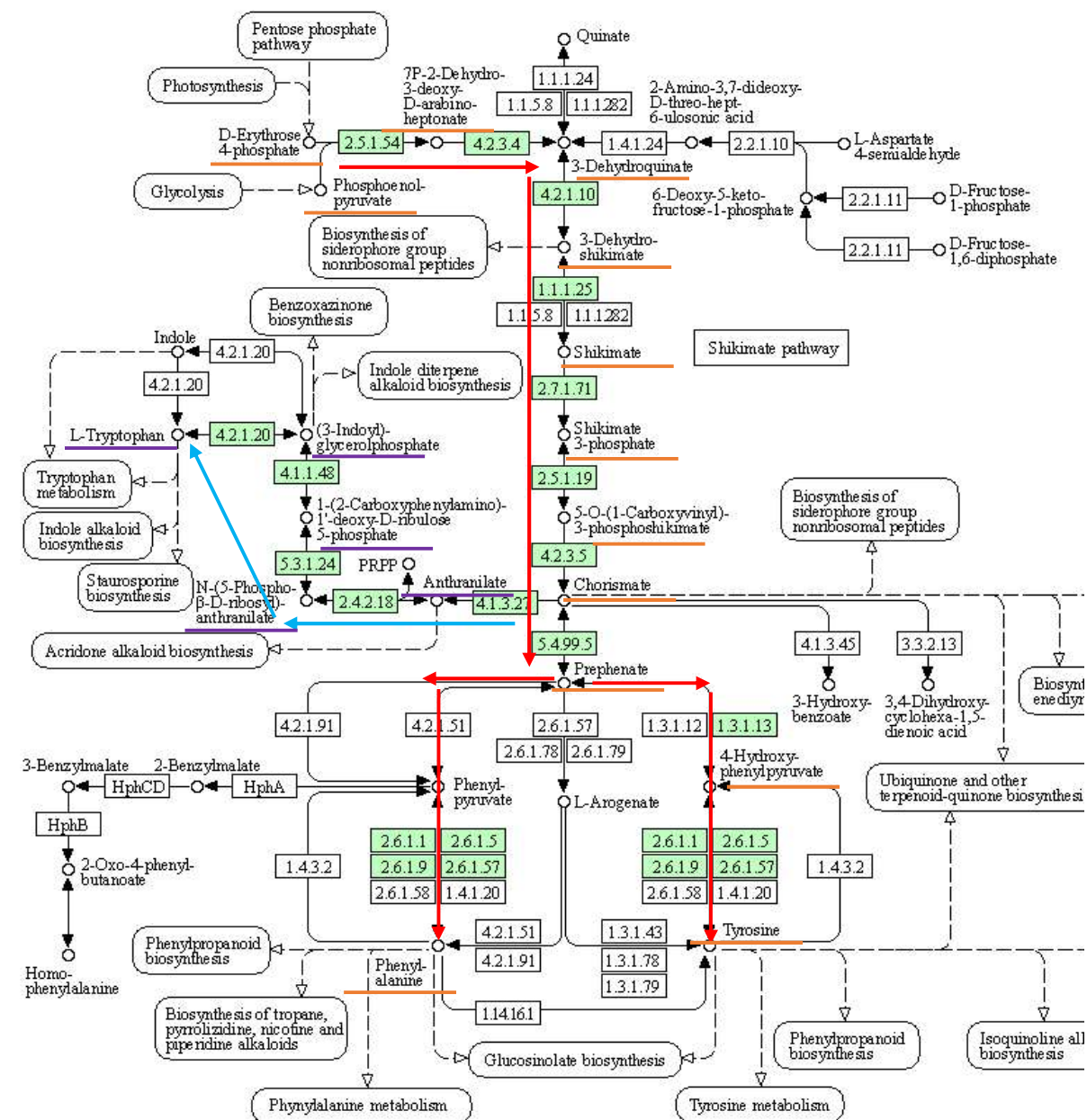


Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis - *Trametes versicolor*

thway menu | Pathway entry | Download KGML | Image (png) file | Help]

ange pathway type

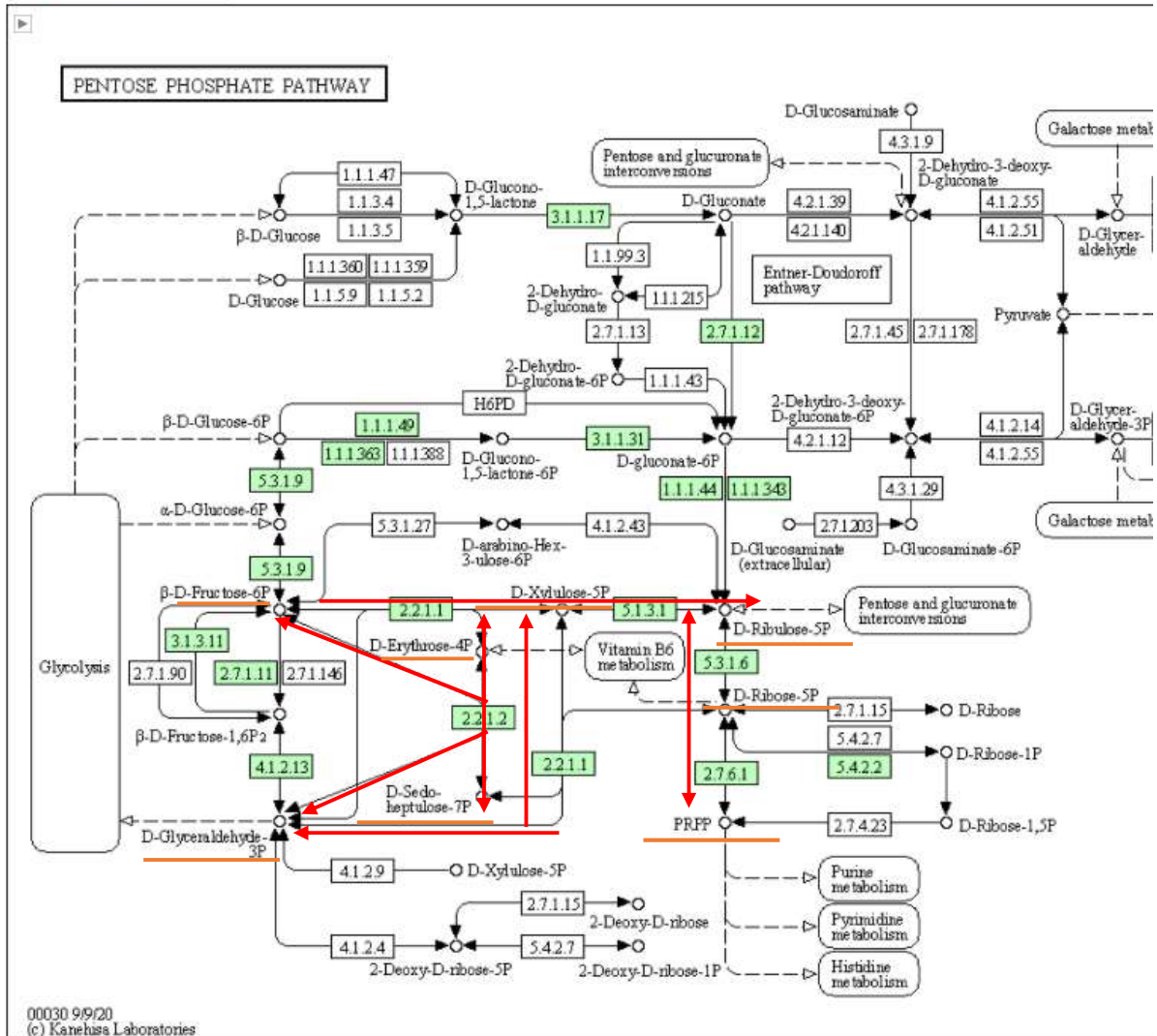
PHENYLALANINE, TYROSINE AND TRYPTOPHAN BIOSYNTHESIS

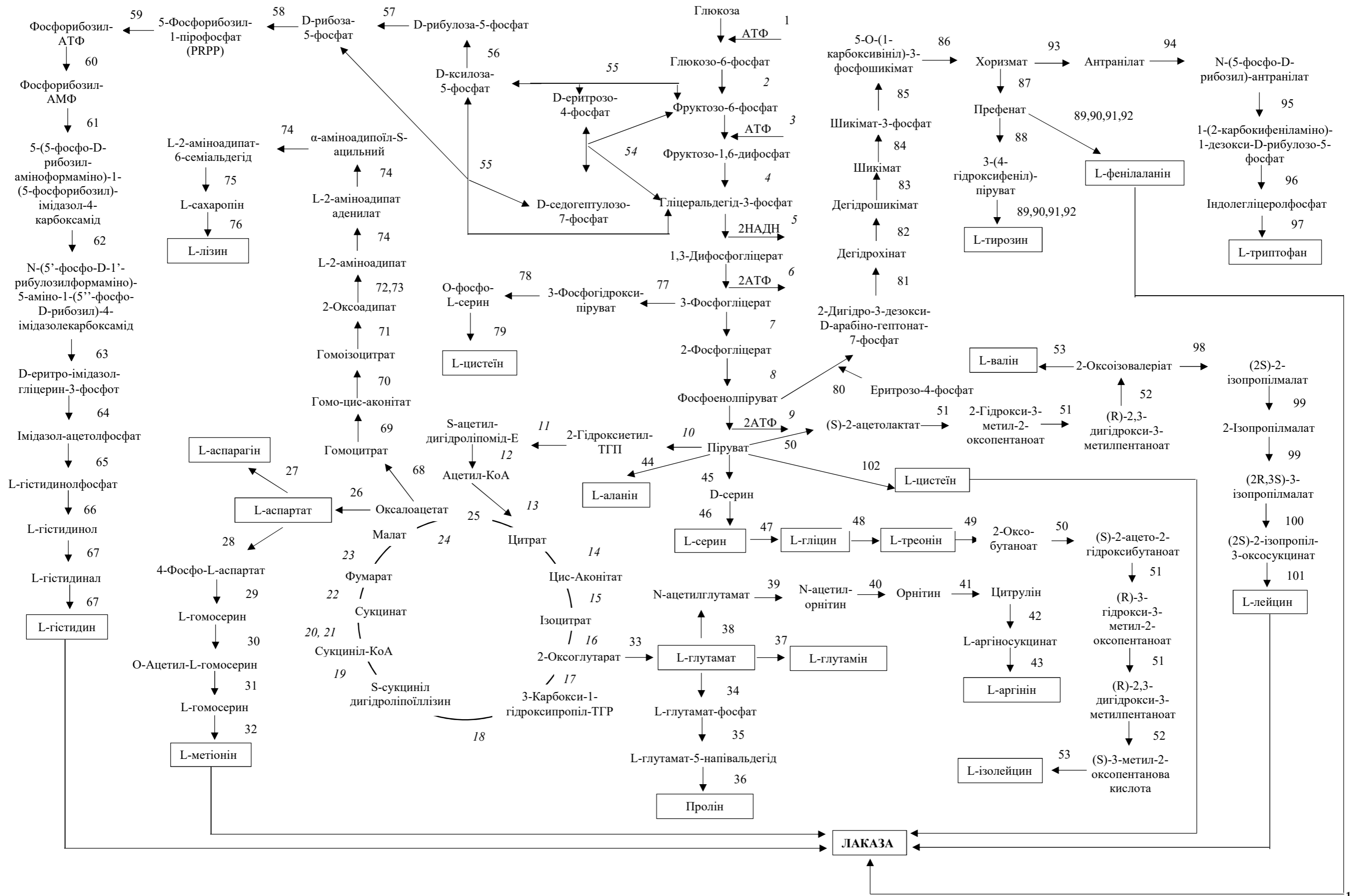


KEGG Pentose phosphate pathway - *Trametes versicolor*

[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Show description | Image (png) file | Help]

Change pathway type





Ферменти: 1 – гексокіназа (КФ:2.7.1.1); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ:5.3.1.9); 3 – 6-фосфофруктокіназа (КФ:2.7.1.11); 4 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ:4.1.2.13); 5 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ:1.2.1.12); 6 – фосфогліцераткіназа (КФ:2.7.2.3); 7 – гліцератфосфомутаза (КФ:5.4.2.11) та фосфогліцератфосфомутаза (КФ:5.4.2.12); 8 – ендолаза (КФ:4.2.1.11); 9 – піруваткіназа (КФ:2.7.1.40); 10,11 – піруватдегідрогеназа Е1 компонент бета-субодиниця (КФ:1.2.4.1); 12 – піруватдегідрогеназа (КФ:2.3.1.12); 13 – цитратсинтаза (КФ:2.3.3.1); 14,15 – аконітатгідратаза(КФ:4.2.1.3); 16 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ:1.1.1.41); 17,18 – Компонент 2-оксоглутаратдегідрогенази Е1 (КФ:1.2.4.2); 19 – дигідроліпоамід сукцинілтрансфераза (КФ:2.3.1.61); 20,21 – субодиниця бета-сукциніл-КоА-синтаза (КФ:6.2.1.4), (КФ:6.2.1.5); 22 – сукцинатдегідрогеназа (КФ:1.3.5.1); 23 – фумаратгідратаза (КФ:4.2.1.2); 24– малатдегідрогеназа (КФ:1.1.1.37); 25– АТФ-цитрат(про-S)-ліаза (КФ:2.3.3.8); 26 – аспаратамінотрансфераза (КФ:2.6.1.1); 27 – аспаратсинтаза (КФ:6.3.5.4); 28 – аспараткіназа (КФ:2.7.2.4); 29 – гомосериндегідрогеназа (КФ:1.1.1.3); 30 – гомосерин-О-ацетилтрансфераза (КФ:2.3.1.31); 31 – цитатіонінсинтаза (КФ:2.5.1.48); 32 – гомоцистеїн-S-метидтрансфераза (КФ:2.1.1.10); 33 – глутаматдегідрогеназа (КФ:1.4.1.2); 34 – глутамат-5-кіназа (КФ:2.7.2.11); 35 – глутамілфосфатредуктаза (КФ:1.2.1.41); 36 – пролін-5-карбоксилатредуктаза (КФ:1.5.1.2); 37–глутамінсинтаза (КФ:6.3.1.2); 38 – глутамат-N-ацетилтрансфераза (КФ:2.3.1.1); 39 – ацетилорнітінінамінотрансфераза (КФ:2.6.1.11); 40 – глутамат-N-ацетилтрансфераза (КФ:2.3.1.35); 41 – орнітин-карботілтрансфераза (КФ:2.1.3.3); 42 – аргініносукцинатсинтаза (КФ:6.3.4.5); 43 – аргініносукцинатліаза (КФ:4.3.2.1); 44 – аланінтрансаміназа (КФ:2.6.1.2); 45 –D-серинаміакліаза (КФ:4.3.1.18); 46 –серинрацемаза (КФ:5.1.1.18); 47 – гліцингідроксиметилтрансфераза (КФ:2.1.2.1); 48 – треонінальдолаза (КФ:4.1.2.48); 49 –L-треонінаміакліаза (КФ:4.3.1.19); 50 –ацетолактатсинтаза (КФ:2.2.1.6); 51 –кетолкислотнаредуктоізомераза (КФ:1.1.1.86); 52 –дигідроксикислотнадегідратаза (КФ:4.2.1.9); 53 –амінотрансфераза (КФ:2.6.1.42); 54 –альдолаза (КФ:2.2.1.2); 55 –транскетолаза (КФ:2.2.1.1); 56 –рибулозо-5-фосфат-3-ізомераза (КФ:5.1.3.1); 57 –рибулозо-5-фосфатізомераза (КФ:5.3.1.6); 58 – фосфорибозилпірофосфаткіназа (КФ:2.7.6.1); 59 – АТФ-фосфорибозилтрансфераза (КФ:2.4.2.17); 60 – фосфорибозил-АТФ-пірофосфогідролаза (КФ:3.6.1.31); 61 – фосфорибозил-АМФ-циклогідролаза (КФ:3.5.4.19); 62 – фосфорибозилформіміно-5-аміноімідазолкабоксамідриботидізомераза (КФ:5.3.1.16); 63 – імідазолгліцеролфосфатсинтаза (КФ:4.3.2.10); 64 – імідазолегліцеролфосфотдегідратаза (КФ:4.2.1.19); 65 – гістидиноксифосфотамінотрансфераза (КФ:2.6.1.9); 66 – гістидиноксифосфатаза (КФ:3.1.3.15); 67 – гістидиноксидегідрогеназа (КФ:1.1.1.23); 68 – гомоцитратсинтаза (КФ:2.3.3.14); 69 – аконітатгідратаза (КФ:4.2.1.--); 70 – гомоаконітаза (КФ:4.2.1.36); 71 – гомоізоцитратдегідрогеназа (КФ:1.1.1.87); 72 – аміноадипаттрансаміназа (КФ:2.6.1.39); 73 –ароматична амінокислота амінотрансферази I (КФ:2.6.1.57); 74 –2-аміноадипатредуктаза (КФ:1.2.1.95); 75 – сахаромідинсинтаза (КФ:1.5.1.10); 76 – сахаропіндегідрогеназа (КФ:1.5.1.7); 77 – 3-фосфогліцератдегідрогеназа (КФ:1.1.1.95); 78 –фосфосеринамінотрансфераза (КФ:2.6.1.52); 79 –цистеїнсинтаза (КФ:2.5.1.47); 80 –3-дезоксид-7-фосфогептулонатсинтаза (КФ:2.5.1.54); 81 –пентафункціональний поліпептид АROM (КФ:4.2.3.4); 82 – пентафункціональний поліпептид АROM (КФ:4.2.1.10); 83 –пентафункціональний поліпептид АROM (КФ:1.1.2.5); 84 – пентафункціональний поліпептид АROM (КФ:2.7.1.71); 85 –пентафункціональний поліпептид АROM (КФ:2.5.1.19); 86 – хоризматсинтаза (КФ:4.2.3.5); 87 – хоризматмутаза (КФ:5.4.99.5); 88 –префенатдегідрогеназа (КФ:1.3.1.13); 89 – аспаратамінотрансфераза (КФ:2.6.1.1); 90 –2-аміноадипаттрансаміназа (КФ:2.6.1.5); 91 –гістидиноксифосфотамінотрансфераза (КФ:2.6.1.9); 92 –ароматична амінокислота амінотрансфераза I (КФ:2.6.1.57); 93 –антранілатсинтаза (КФ:4.1.3.27); 94 – антранілатфосфорибозилтрансфераза (КФ:2.4.2.18); 95 –фосфорибозилантранілатізомераза (КФ:5.3.1.24); 96 –індол-3-гліцеринфосфатсинтаза (КФ:4.1.1.48); 97 –триптофансинтаза (КФ:4.2.1.20); 98 –2-ізопропілмалатсинтаза(КФ:2.3.3.13); 99 –3-ізопропілмалатдегідратаза (КФ:4.2.1.33); 100 –3-ізопропілмалатдегідрогеназа (КФ:1.1.1.85); 101 –амінотрансфераза (КФ:2.6.1.42); 102 –цистатіонін-гамма-ліаза (КФ:4.4.1.1).

УДК 582.284.3

**ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА РІСТ
КСИЛОТРОФНИХ БАЗИДИОМІЦЕТІВ POLYPORUS
SQUAMOSUS (HUDS.) FR. ТА LAETIPORUS
SULPHUREUS (BULL.: FR.) MURRILL**

Л.П. Дзигун, старший викладач

О.М. Дуган, доктор біологічних наук

Національний технічний університет України «КПІ»

*Показано вплив джерел вуглецю та азоту і вихідного значення рН поживного середовища на ріст ксилотрофних базидіоміцетів *Polyporus squamosus* та *Laetiporus sulphureus*.*

*Ключові слова: вихідне рН поживного середовища, джерела вуглецю, джерела азоту, глибинне культивування, базидіоміцети, *P. squamosus*, *L. sulphureus*.*

Вихідний посівний матеріал готували шляхом пересіву культури в пробірку з СА. Отриманий за 7 діб міцелій пересівали в колби на проавтоклавоване синтетичне середовище з додаванням 1% соєвого борошна та 0,5-% неохмеленого пивного сусла і культивували при 28°C 6 діб поверхневим способом та 7 діб на качалці з перемішуванням 120-150 об./хв. Після чого здійснювали пересів на досліджувані рідкі живильні середовища в кількості 10 об. %.

Дослідження проводили протягом 7 діб у трьох повторностях. Культури вирощували на качалці (120 об./хв.) при 28±1°C.

Для визначення концентрації біомаси міцелій гриба відокремлювали від культуральної рідини і висушували у сушильній шафі при температурі 105°C до постійної маси. Концентрацію біомаси розраховували у грамах абсолютно сухої речовини на 1 л середовища.

Всі отримані експериментальні дані обробляли статистично [23].

Purification and Characterization of Laccase from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*

Moon-Jeong Han, Hyoung-Tae Choi and Hong-Gyu Song*

Division of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

(Received August 8, 2005 / Accepted October 8, 2005)

Laccase is one of the ligninolytic enzymes of white rot fungus *Trametes versicolor* 951022, a strain first isolated in Korea. This laccase was purified 209-fold from culture fluid with a yield of 6.2% using ethanol precipitation, DEAE-Sepharose, Phenyl-Sepharose, and Sephadex G-100 chromatography. *T. versicolor* 951022 excretes a single monomeric laccase showing a high specific activity of 91,443 U/mg for 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) as a substrate. The enzyme has a molecular mass of approximately 97 kDa as determined by SDS-PAGE, which is larger than those of other laccases reported. It exhibits high enzyme activity over broad pH and temperature ranges with optimum activity at pH 3.0 and a temperature of 50°C. The K_m value of the enzyme for substrate ABTS is 12.8 μ M and its corresponding V_{max} value is 8125.4 U/mg. The specific activity and substrate affinity of this laccase are higher than those of other white rot fungi, therefore, it may be potentially useful for industrial purposes.

Key words: enzyme purification, laccase, *Trametes versicolor*, white rot fungus

Results

Purification of laccase from T. versicolor

The presence of laccase activity in *T. versicolor* 951022 was tested by reaction of fungal mycelium with *o*-tolidine. When *o*-tolidine solution was added, the edge of fungal colony showed green to blue color (result not shown), indicating the production of melanin intermediates by laccase (Ross, 1982). Under the culture conditions in this study, laccase was the major ligninolytic enzyme, and activity of lignin peroxidase was not detectable. In liquid culture, a maximum laccase activity was obtained after 3 days of incubation in YMG medium (Fig. 1). *T. versicolor* 951022 produced a high level of laccase without added inducers within a relatively short period of incubation.

The laccase secreted by *T. versicolor* 951022 was puri-

УДК 579.864+616-095+579.61:615.27

Н.В. Дехтяренко, О.М. Дуган

**РОЗРОБЛЕННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ НА ОСНОВІ ГІДРОЛІЗАТІВ СОЄВОГО
БОРОШНА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *LACTOBACILLUS***

The paper considers the second stage of developing the laboratory technology of sanitary sour-milk products on the basis of

pH середовищ вимірювали за допомогою рН-метра марки рН-150МА. Кількість білка у ферментаційному середовищі та культуральній рідині визначали за методом Лоурі [9]. Вміст амінного азоту визначали методом формольного титрування [10].

Перед дослідженням зазначених вище по-

Аналіз даних табл. 1 показує, що концентрація амінного азоту при рН соєвого молока 8,5 на 21-шу год інкубації зростала в 2 рази порівняно з 5 год інкубації. В той же час при рН соєвого молока 9,5 вже на 5-й год інкубації концентрація амінного азоту досягала показників 21-ї год. Тобто рН 9,5 забезпечує більш пов-

УДК 543.422.7:547.455

Ю.Г. Хабаров, Н.Д. Камакина, В.А. Вешняков

Архангельский государственный технический университет

Хабаров Юрий Германович родился в 1950 г., окончил в 1972 г. Архангельский лесотехнический институт, доктор химических наук, профессор кафедры технологии ЦБП Архангельского государственного технического университета. Имеет более 100 печатных трудов в области химической переработки древесины.

E-mail: khbarov@agtu.ru

Камакина Наталья Дмитриевна родилась в 1953 г., окончила в 1975 г. Архангельский лесотехнический институт, кандидат технических наук, доцент кафедры технологии целлюлозно-бумажного производства Архангельского государственного технического университета. Имеет более 50 печатных работ в области переработки сульфитных щелоков.

E-mail: khbarov@agtu.ru

Вешняков Вячеслав Александрович родился в 1984 г., окончил в 2006 г. Архангельский государственный технический университет, аспирант кафедры технологии ЦБП АГТУ. Имеет 12 печатных работ в области химии древесины и аналитической химии.

E-mail: khbarov@agtu.ru

ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕДУЦИРУЮЩИХ САХАРОВ В РАСТВОРАХ

Разработан экспресс-метод фотометрического определения содержания редуцирующих вещества, основанный на измерении уменьшения поглощения медно-щелочного раствора при 670 нм после 3 мин нагревания и позволяющий определять концентрацию редуцирующих веществ в диапазоне 0,5...1,5 мг/мл в пересчете на глюкозу.

Ключевые слова: редуцирующие вещества, углеводы, фотометрия, медно-щелочной раствор, раствор Фединга, метод Бертрана.

Для количественной характеристики содержания восстанавливающих сахаров используют показатель – содержание редуцирующих веществ (РВ). Обычно РВ определяют в сульфитных щелоках, гидролизатах и предгидролизатах для контроля процесса биохимической переработки их в этиловый спирт и кормовые дрожжи [1]. Кроме того, РВ определяют в гидролизатах, получаемых при анализе лигноцеллюлозных материалов на содержание легко- и трудногидролизуемых полисахаридов [4]. В основу методов определения РВ положено взаимодействие так называемого медно-щелочного раствора с сахарами со свободной гликозидной, или восстанавливающей, группой. Медно-щелочной раствор представляет собой водный раствор сульфата меди (II) с сегнетовой солью и гидроксидом натрия. Его обычно готовят непосредственно перед определением, смешивая равные объемы следующих растворов: раствор 1 – сульфат меди (II), раствор 2 – сегнетова соль и гидроксид натрия. В ходе определения происходит восстановление катионов меди (II) до меди (I), сопровождающееся окислением восстанавливающих сахаров. При этом ключе-

вой реакцией является окисление альдегидной группы сахаров до карбоксильной с образованием альдоновых кислот. На самом деле взаимодействие сахаров с медно-щелочным раствором состоит из нескольких сотен реакций, протекающих одновременно. Например, только из глюкозы может образоваться 113 соединений, часть из которых также обладает восстанавливающей способностью [3].

Классическим способом определения РВ является метод Бертрана [5, 6], который осуществляется следующим образом. Анализируемый раствор сахаров смешивают с медно-щелочным раствором, эту реакционную смесь кипятят в течение 3 мин, затем выпавший осадок оксида меди (I) отфильтровывают и растворяют в растворе сульфата железа (III) (сульфата железа (III)-аммония [5]), подкисленном серной кислотой. При этом медь (I) окисляется до меди (II), а железо (III) восстанавливается до железа (II). Количество катионов железа (II) определяют перманганатометрически. Метод Бертрана является достаточно трудоемким и обычно дает значительный разброс между параллельными определениями из-за окисления осадка оксида меди (I) воздухом.

В России большое распространение получил эбулиостатический метод [1, 3] определения РВ. Он исключил недостатки метода Бертрана. В медно-щелочной раствор введена желтая кровяная соль, образующая с медью (I) растворимое бесцветное комплексное соединение. Это позволило исключить стадию фильтрования и последующего растворения осадка оксида меди (I). Контакт кислорода воздуха с медно-щелочным раствором был устранен совмещением проведения реакции и титрования в специальном устройстве – эбулиостате, из которого воздух вытесняется водяным паром. Эбулиостатический метод заключается в титровании медно-щелочного раствора непосредственно анализируемым раствором сахаров. Индикатором при этом служит метиленовый голубой, фиксирующий скачок окислительно-восстановительного потенциала, или момент восстановления всех катионов меди (II) до меди (I). Однако эбулиостатический метод не стал менее трудоемким, так как при его выполнении необходимо проводить ориентировочное титрование, строго выдерживать заданную скорость титрования и другие условия анализа.

Для устранения недостатков определения РВ известными методами был разработан менее трудоемкий фотометрический метод, в котором регистрируется изменение светопоглощения медно-щелочного раствора в результате реакции с анализируемым раствором сахаров.

Экспериментальная часть

Электронные спектры растворов регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-Probe 1650 PC в кварцевых кюветах (толщина рабочего слоя 1 см) относительно дистиллированной воды. Оптическую плотность растворов при 670 нм измеряли на фотоколориметре КФК-2МП в кюветах (толщина рабочего слоя 1 см) относительно дистиллированной воды.

В работе были использованы реактивы следующих квалификаций: D-глюкоза, серная кислота, пентагидрат сульфата меди (II) – ч.; гидроксид натрия, железо-аммонийные квасцы, сахароза – ч.д.а.; желтая кровяная соль, перманганат калия, сегнетова соль – х.ч.; вода – дистиллированная.

Для проведения эксперимента готовили по 500 мл растворов 1 (8,65 г пентагидрата сульфата меди (II) в дистиллированной воде) и 2 (25,00 г сегнетовой соли, 2,00 г желтой кровяной соли и 37,50 г гидроксида натрия в дистиллированной воде). В пробирке смешивали по 2,00 мл растворов 1 и 2 и 2,00 мл анализируемого раствора, содержание РВ в котором находится в диапазоне 0,5...1,5 мг/мл. Затем пробирку

с реакционной смесью нагревали на кипящей водяной бане в течение заданного времени, по истечении которого смесь фотометрировали.

В качестве реальных объектов были использованы производственные сульфитные шелока, отобранные по ходу варки через 30, 60 и 90 мин после выхода на конечную температуру варки, а также гидролизаты, полученные при определении легкогидролизуемых полисахаридов [4] в древесине березы и осины.

Обсуждение результатов

Электронный спектр медно-щелочного раствора имеет полосу поглощения с максимумом при 670 нм (кривая 1, рис. 1). Спектры растворов отдельных компонентов медно-щелочного раствора не имеют полос поглощения в диапазоне длин волн 500 ... 1 000 нм во всех случаях, кроме раствора сульфата меди (II), поглощающего в области 708 ... 810 нм (кривая 3). Голубой цвет раствора сульфата меди (II) обусловлен образованием гидратированного комплекса меди (II). В медно-щелочном растворе катионы меди (II) связываются в прочный виннокислый комплекс, за счет чего полоса поглощения смещается в более коротковолновую область (от 808...810 до 670 нм), придавая раствору характерную синюю окраску.

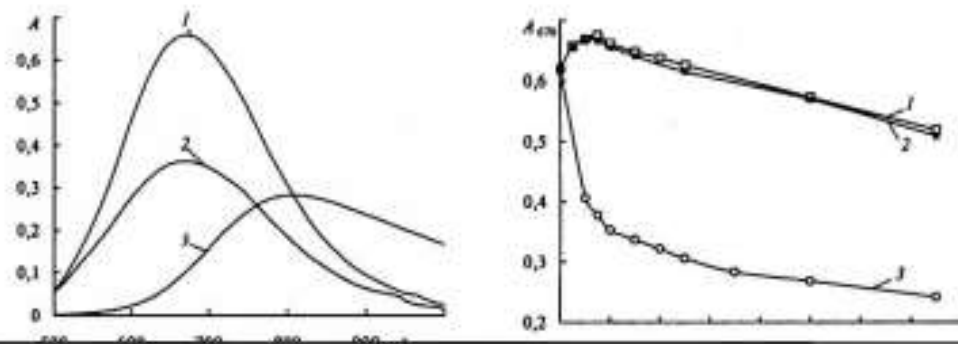
При нагревании медно-щелочного раствора с раствором глюкозы (1 мг/мл) в течение 3 мин положение полосы поглощения с максимумом при 670 нм осталось неизменным, но уменьшилась ее интенсивность (кривая 2).

Таким образом, в качестве аналитической выбрана длина волны 670 нм, для выделения которой на обычных фотоколориметрах имеются светофильтры.

Реакция окисления сахаров медно-щелочным раствором при комнатной температуре практически не идет, поэтому ее проводили на кипящей водяной бане. В методах Бертрана и эбулостатическом аналогичные реакции осуществляют также при температуре 100 °С.

Для определения оптимальной продолжительности фотометрическую реакцию проводили в течение заданного интервала времени (0...15 мин) с водными растворами D-глюкозы. Дополнительно были поставлены эксперименты с раствором сахарозы, взятой в качестве невосстанавливающего дисахарида, и холостой опыт.

Полученные кинетические зависимости (рис. 2) показывают, что фотометрическая реакция протекает быстро в первые 2 ... 3 мин, затем скорость уменьшения оптической плотности заметно снижается (кривая 3). Нагревание медно-щелочного раствора в отсутствие сахаров показало изменение оптической плотности при 670 нм: в первые 2 мин происходит увеличение поглощения, затем практически линейное уменьшение (кривая 1). Проведение реакции с сахарозой подтвердило отсутствие окислительно-восстановительных процессов медно-щелочного раствора с невосстанавливающими сахарами: кинетическая зависимость (кривая 2) почти полностью совпадает с изменением поглощения при 670 нм самого медно-щелочного раствора при нагревании.



Выбрана оптимальная продолжительность фотометрической реакции – 3 мин. Дальнейшее увеличение продолжительности реакции существенно не изменяет оптическую плотность при 670 нм. Метод Бертрона предусматривает такую же продолжительность реакции.

Для построения градуировочного графика фотометрические реакции проводили с растворами глюкозы, приготовленными в мерных колбах вместимостью 100 мл из навесок разной массы (от 50 до 150 мг) в дистиллированной воде. После проведения в течение 3 мин фотометрической реакции измеряли оптическую плотность при 670 нм на фотоколориметре КФК-2МП. На основе полученных данных был построен график зависимости оптической плотности при 670 нм от концентрации глюкозы в анализируемом растворе. Уравнение градуировочной зависимости:

$$A_{670} = -0,2946C + 0,6366; R^2 = 0,9996.$$

Стандартное среднеквадратическое отклонение оптической плотности при 670 нм между тремя параллельными определениями не превышало 0,003.

В отличие от стандартных растворов глюкозы, с помощью которых был построен градуировочный график, сульфитные щелока и гидролизаты окрашены и имеют небольшое поглощение при 670 нм. В связи с этим свободный член уравнения прямой градуировочного графика будет иметь различные значения, в зависимости от интенсивности окрашивания анализируемого раствора. Эти различия учитывали проведением холостого опыта, при котором медно-щелочной раствор с добавкой анализируемого раствора не нагревали, а сразу фотометрировали, т.е. измеряли начальную оптическую плотность реакционной смеси при 670 нм. В этом случае уравнение для определения содержания РВ будет выглядеть следующим образом:

$$PB = \frac{A_{\text{исп}} - A_{\text{исп}}}{-0,2946}, \quad (1)$$

где $A_{\text{исп}}$ и $A_{\text{исп}}$ – начальная и конечная оптические плотности реакционной смеси при 670 нм, т.е. до и после проведения реакции;

– 0,2946 – тангенс угла наклона прямой градуировочной зависимости.

При изучении стабильности медно-щелочного раствора в условиях фотометрической реакции было установлено, что поглощение собственно медно-щелочного раствора ($\lambda = 670$ нм) при нагревании в течение 3 мин увеличивается в среднем на 0,012. Медно-щелочные растворы с добавками растворов глюкозы, с помощью которых был построен градуировочный график, имели начальную оптическую плотность при 670 нм в среднем 0,625, а градуировочная зависимость пересекает ось ординат в точке 0,637. Поэтому при расчете величины РВ необходимо учитывать поправку 0,012, связанную с увеличением поглощения при 670 нм самого медно-щелочного раствора при нагревании в течение 3 мин. Тогда уравнение (1) с учетом разбавления и поправки 0,012 принимает вид:

$$PB = R \frac{A_{\text{исп}} - A_{\text{исп}} + 0,012}{0,2946},$$

где R – степень разбавления анализируемого раствора.

В таблице, приведены результаты определения РВ в сульфитных щелоках и гидролизатах методом Бертрона и предлагаемым фотометрическим методом. Каждое определение было проведено дважды, коэффициент вариации не превышал 0,6 %, относительная погрешность, характеризующая расхождение результатов известного и фотометрического методов, составила 1,7 %.