

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

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

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології
і мікробіології

Віктор
СТАБНИКОВ
“ 04 ” квітня 20 22 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КОВАЛЬЧУК Інни Леонідівни
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Actinobacillus succinogenes* для одержання
бурштинової кислоти

керівник роботи СУЛЕЙКО Тетяна Леонідівна, асистент.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи :

Продуцент – *Actinobacillus succinogenes*; коефіцієнт заповнення – 0.6 ;
об'єм ферментера – 1 м³

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Характеристика цільового продукту; Обґрунтування вибору та
характеристика біологічного агента; Техніко-економічне обґрунтування;
Обґрунтування вибору технологічної схеми; Специфікація обладнання;
Опис технологічної схеми; Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Креслення технологічної схеми(А 1); Креслення апаратурної схеми(А 1).

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	04.04.2022 – 12.04.2022	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	13.04.2022- 21.04.2022	
3	Техніко-економічне обґрунтування	22.04.2022- 01.05.2022	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	02.05.2022- 09.05.2022	
5	Специфікація обладнання	10.05.2022- 15.05.2022	
6	Опис технологічної схеми	16.05.2022- 20.05.2022	
7	Креслення технологічної схеми	21.05.2022- 23.05.2022	
8	Креслення апаратурної схеми	24.05.2022- 26.05.2022	
9	Контроль виробництва	27.05.2022- 30.05.2022	
10	Оформлення кваліфікаційної роботи	30.05.2022- 01.06.2022	

Здобувач _____
(підпис)

Інна КОВАЛЬЧУК _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Тетяна СУЛЕЙКО _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу бурштинової кислоти штамом *Actinobacillus succinogenes* 130Z, який, за умови росту на середовищі з сирною сироваткою, синтезує 13,98 г/л цільового продукту. Розрахована потужність виробництва бурштинової кислоти становить 192,5 кг готового продукту. Технологічний процес складається з допоміжних (підготовка аераційного повітря, підготовка і стерилізація поживних середовищ, приготування титрувальних агентів) та основних робіт (вирощування інокуляту в колбах на качалці та посівних апаратах об'ємами 10 л, 100 л, а також виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1 м³).

Кваліфікаційна робота викладена на 52 сторінки друкованого тексту, містить 8 таблиць. Складається з вступу, семи розділів, списку використаної літератури (63 джерел) та графічної частини (2 креслення формату А1).

Ключові слова: *Actinobacillus succinogenes* 130Z, бурштинова кислота, сирна сироватка, *Actinobacillus*, біосинтез, омолоджуючий крем.

					НУХТ БТЕК 04.02.21 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ	Літера	Аркуш	Аркушів
Розробник		Ковальчук І.Л.					3	52
Керівник		Сцелейко Т.Л.						
Н. контр								
Консульт								
Зав. каф.		Стадніков				Кафедра БТМ		

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	3
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	7
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....	7
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	7
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	13
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	14
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	15
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	15
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	16
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	17
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	18
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	21
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	21
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	21
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	22
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	23
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	27
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	31
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	33
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	42
7.1. Мікробіологічний контроль.....	42
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	43
7.2.1. Концентрація біомаси.....	44
7.2.2. Концентрація цільового продукту.....	45
7.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	46
ЛІТЕРАТУРА.....	47

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.21 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>ЗМІСТ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Ковальчук І.Л.</i>					4	52
<i>Керівник</i>		<i>Сцлейко Т.Л.</i>						
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		

ВСТУП

На сьогодні біотехнологія в світі піднялася на новий рівень розвитку. Це сталося завдяки новим знанням і технологічному прориву, особливо в галузі нанотехнологій. Також найбільш перспективним з-поміж біотехнологій, які зараз зазнають розвитку в Україні, визначено сучасні методи сільськогосподарського сектора виробництва, розробляються нові екологічно безпечні матеріали та біопаливо, створюються нові методи переробки відходів та виробляються біофармацевтичні препарати, геномодифіковані рослини та якісні продукти харчування.

Використання біотехнологій у промисловості привело до розроблення технологій виробництва, які споживають менше води та енергії, знижують кількість токсичних побічних продуктів і підвищують ступінь очищення продукції. В енергетичній промисловості починають широко використовуватися відновлювальні джерела енергії за рахунок використання ферментів для створення екологічно чистого палива із сільськогосподарських відходів [1].

Бурштинова кислота – це корисна речовина, присутня в складі бурштину, смоли і бітумінозного вугілля. Вона являє собою кристалоподібний порошок, з якого роблять медикаментозні засоби. Люди, що використовують препарати з бурштином, подовжують життя і покращують стан свого здоров'я. У доповненні до цього сповільнюється старіння. За рахунок знешкодження вільних радикалів, з організму виводяться токсини. Підвищується здатність протистояти впливу небезпечних зовнішніх факторів. Також забезпечується безперебійне надходження кисню до тканин і важливим органам. Це особливо важливо для успішної роботи мозку. До головних корисних властивостей Е 363 відносять:

поліпшення роботи репродуктивних органів, гальмування росту пухлин,					
<i>НУХТ БТЕК 04.02.21 КР ПЗ</i>					
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	
Розробник		Ковальчук І.Л.			
Керівник		Сцлейко Т.Л.			
Н. контр					
Консульт					
Зав. каф.		Стадніков			
<i>ВСТУП</i>					
			Літера	Аркуш	Аркушів
			1	5	52
<i>Кафедра БТМ</i>					

зміцнення імунітету, стимуляція вироблення інсуліну, профілактика анемії, нормалізація обмінних процесів, протизапальну дію, протівірусний ефект та поліпшення пам'яті [2].

Виробництво бурштинової кислоти з відновлюваних вуглеводних сировинних ресурсів може мати економічний та стійкий потенціал для заміни виробництва нафтопродуктів у майбутньому не тільки для існуючих ринків, але і для нових ринків великих обсягів.

Новизною даної роботи є отримання бурштинової кислоти за допомогою виробничого біосинтезу штаму *Actinobacillus succinogenes* 130Z, який здатний виробляти цільовий продукт у кількості 13,98 г/л.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Бурштинова кислота (етан - 1,2 - дикарбонова кислота, C07C 55/10) – це органічна двохосновна насичена карбонова кислота. Вона являє собою кристалоподібний порошок, безбарвні кристали якого розчинні у воді і спирті.[3]

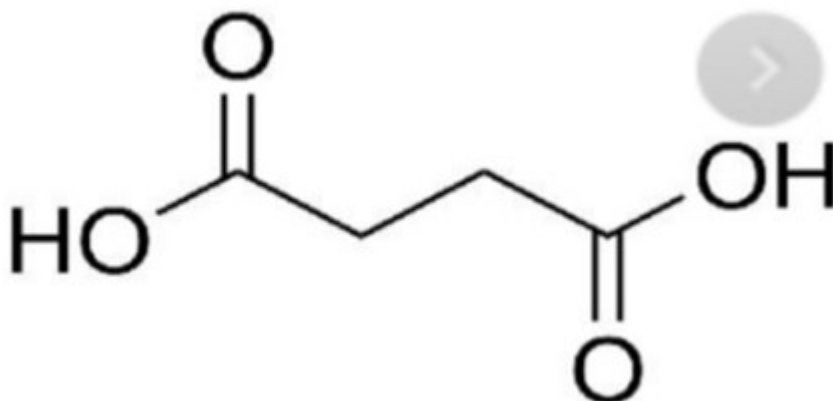


Рис.1.1.Хімічна структура бурштинової кислоти. [3]

Дана кислота являє собою побічний продукт виробництва адипінової кислоти. Володіє хімічними властивостями, характерними для дикарбонових кислот, та утворює солі, ефіри та сукцинат. Температура плавлення 183 градуси. При 235 градусах кислота відщеплює воду, утворюючи янтарний ангідрид.[4]

Згідно з дослідженнями, бурштинова кислота практично не шкідлива для організму та немає побічних ефектів. Дана кислота є однією з таких речовин, без яких організму ніяк не обійтися, вона бере участь в енергетичному обміні на рівні клітин, завдяки їй клітини можуть вільно дихати.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.21 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>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Ковальчук І.Л.</i>						<i>7</i>	<i>52</i>
<i>Керівник</i>	<i>Сцлейко Т.Л.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков</i>							

Також добре впливає на обмін речовин, підтримує діяльність ендокринної та нервової діяльності, що доставляє кисень тканинам та покращує засвоюваність поживних речовин. [5]

Однією з найважливіших сфер застосування бурштинової кислоти є хімічна промисловість, де дана кислота необхідна для синтезу пластмас, деяких різновидів синтетичних смол, а також використовується в якості вихідного матеріалу для отримання ряду хімічних сполук, похідних з неї, наприклад сукцинату. Також дана кислота добре застосовується в агропромисловому комплексі, харчовому, косметологічному та фармацевтичних виробництвах. [6]

Бурштинова кислота - одна з найцікавіших хімічних речовин, яка може вироблятися на підході до біопереробки. Вона викликала великий інтерес завдяки використанню за кордоном як попередника багатьох промислово важливих хімічних речовин у харчовій, хімічній та фармацевтичній промисловості. Зіткнувшись з дефіцитом сирої нафти та попитом на сталий розвиток, біологічне виробництво бурштинової кислоти з відновлюваних ресурсів стало темою світового інтересу. [7]

В останні десятиліття були розроблені надійний відбір штамів: *Actinobacillus succinogenes* DSM 22257 [8], *Saccharomyce scerevisiae* RCAM 01730[9], *Pichiakudria vzevii*CBS573 [10], метаболічна інженерія модельних штамів та оптимізація процесів для виробництва бурштинової кислоти. Цей огляд містить огляд виробників кислоти та технології вирощування, висвітлює деякі успішні підходи до метаболічної інженерії. Але найкращим штамом для виробництва бурштинової кислоти є *Actinobacillus succinogenes*.

РОЗДІЛ 2
ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА
БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Бурштинова кислота є попередником для отримання ряду хімічних продуктів, полімерів, а також використовується в харчовій і фармацевтичній промисловості. В даний час переважна частина бурштинової кислоти для промислового застосування виробляється за допомогою нафтохімічного синтезу, що призводить до забруднення навколишнього середовища. Тому перспективним є розвиток конкурентоспроможного мікробіологічного способу виробництва бурштинової кислоти, оскільки він є більш екологічним.

Одним із таких продуцентів є *Actinobacillus succinogenes* 130Z, який здатен продукувати бурштинову кислоту на середовищі з молочною сироваткою, з кінцевою концентрацією бурштинової кислоти (13,98 г/л), час культивування 60 годин. [11].

Відомий штам *Escherichia coli* здатен продукувати бурштинову кислоту на середовищі з сахарозою, MgCO₃ та дріжджовим екстрактом, з кінцевою концентрацією бурштинової кислоти (29,84 г / л). Культивування здійснюють протягом 84 годин в анаеробних умовах, без регулювання рН, рівень якого в підсумку знижується до 2,35 разів. Однак збільшення продуктивності даного організму обмежується відсутністю розробленого генно-інженерного інструментарію. [12].

Штам *Anaerobiospirillum Succiniciproducens*, який здатен продукувати бурштинову кислоту на середовищі з глюкозою, дріжджовим екстрактом, полі пептону K₂HPO₄, NaCl, (NH₄)₂SO₄.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.21 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 2 Обґрунтування вибору та характеристика цільового продукту</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Ковальчук І.Л.</i>						9	52
<i>Керівник</i>	<i>Сцелейко Т.Л.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков</i>							

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 з кінцевою концентрацією бурштинової кислоти (9,2 г/л), час культивування 24 годин. [13].

Особливості одержання бурштинової кислоти

Таблиця 2.1

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація продукту, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	Компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Actinobacillus succinogenes</i> 130Z	сирна сироватка дріжджовий екстракт K ₂ HPO ₄ NaCl CaCl ₂ MgCl ₂	35 5 3 2 0,2 0,2	60	13,98±0,1	t = 38°C, pH=6,8. T=60год. 200 об/хв	Louasté, Bouchra, and Nouredine Eloutassi. "Succinic acid production from whey and lactose by <i>Actinobacillus succinogenes</i> 130Z in batch fermentation." <i>Biotechnology Reports</i> 27. 2020: e00481. doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00481
<i>Escherichia coli</i>	Сахароза MgCO ₃ Дріжджовий екстракт	82.62 42.27 17.84	84	29.83±0,4	t = 37°C, pH=.6.5 T=84год. 210 об/хв	Honghui W, Jiachuan P, Jing W., «Succinic acid production from xylose mother liquor by recombinant <i>Escherichia coli</i> strain» <i>Biotechnology & Biotechnological Equipment</i> , 2014 Vol. 28, No. 6, 10421049

<p><i>Anaerobiospirillum Succiniciproducens</i></p>	<p>Глюкоза 38 Дріжджовий екстракт 5 Поліпептон 10 K₂HPO₄ 3 NaCl 2 (NH₄)₂SO₄ 5 CaCl₂·2H₂O 0.2 MgCl₂·6H₂O 0.4 FeSO₄·7H₂O 5 Na₂CO₃ 3</p>		24	9.2	<p>t = 37°C, pH=.6.5 T=24год. 200 об/хв</p>	<p>Pyung Cheon Lee, Sang Yup Lee. Kinetic Study of Organic Acid Formations and Growth of <i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i> During Continuous Cultures. November 2009 Journal of Microbiology and Biotechnology 19(11):1379-84 DOI:10.4014/jmb.0905.05026</p>
---	--	--	----	-----	---	---

2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Actinobacillus succinogenes - це грамнегативні бактерії, клітини від 0,6 до 1,2 мкм у діаметрі, відрізняються за формою між паличкою та кокобактеріями. Клітини нерухомі, поодинокі, капсул і спор не утворюють. На агарах утворюють кругові, напівпрозорі колонії сірого кольору. Також клітини є капнофільними і краще ростуть при підвищених концентраціях CO₂. Клітини, вирощені в CO₂, є найменш плеоморфними, клітини, що продукували з меншою кількістю CO₂, є набряклими і плеоморфними, а клітини, утворені без CO₂, набувають нездорового вигляду .[14-15]

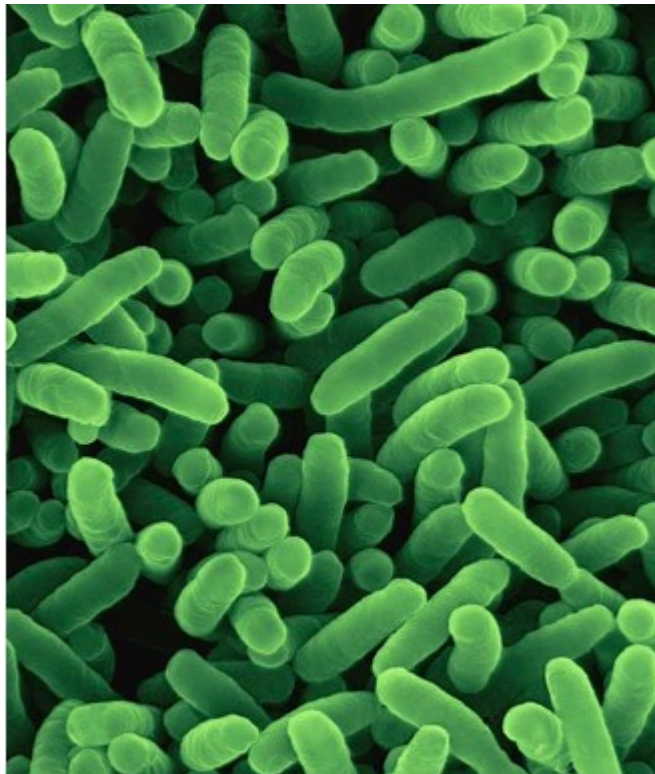


Рис 2.2. *Actinobacillus succinogenes* форма клітин під електронним мікроскопом, збільшення $\times 10000$ [14]

Actinobacillus succinogenes є факультативним анаеробом, здатним до росту і розмноження при температурі від 37°C та pH між 6,0 і 7,4. За типом живлення – хемоорганотроф. У збагачувальній культурі, що містить

кукурудзяний лікер з овець та $MgCO_3$, він виробляє бурштинову кислоту, оцтову кислоту, мурашину кислоту та інші побічні продукти, виявлені за допомогою ВЕРХ. Рівні глікогену, ліпідів, білків та РНК становлять близько 86% маси сухих клітин *Actinobacillus succinogenes*. [16]

Actinobacillus succinogenes спочатку був виділений з бичачого рубця, і є одним із найбільш перспективних виробників сукцинатів. Він може використовувати різні цукри і виробляти дуже великий обсяг сукцинату, який використовується у фармацевтичній промисловості. [17]

2.3 Таксономічний статус біологічного агента

Таксономічний статус *Actinobacillus succinogenes* наведено згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій, де використовується філогенетична систематика, яка є актуальною досі. [18]

Домен -*Bacteria*

Відділ -*Proteobacteria*

Клас -*GammaProteobacteria*

Родина -*Pasteurellaceae*

Рід -*Actinobacillus*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1 Потреба у цільовому продукті

Бурштинова кислота – це дикарбонова кислота, що складається з чотирьох атомів вуглецю і міститься в тканинах рослин і тварин. Дана кислота має білий порошкоподібний вигляд без запаху та добре розчинна в воді та спирті [19].

Зважаючи на властивості бурштинової кислоти її можна використовувати в різних сферах. В харчовій промисловості її можна використовувати в якості харчової добавки, яка застосовується в якості регулятора кислотного рівня (харчова добавка Е 363), дана харчова добавка не дає утворюватися гіркому смаку, у зв'язку з антиоксидантними властивостями, що гальмують окислення. Її часто вводять у напої, карамель і жувальні гумки, в ароматизовані сухі та желеподібні десерти [20], проте виробництво в якості регулятора кислотності не є економічно доцільним через невелику потребу і наявності лимонної кислоти, яка також є регулятором кислотності і частіше використовується.

В аграрній промисловості можна використовувати бурштинову кислоту в якості стимулятора росту для рослин та харчової добавки для тварин. В якості стимулятора росту [21] для рослин вона прискорює формування хлорофілу в клітинах, допомагає засвоювати корисні речовини з ґрунту, а також:

- стимулює нарощування кореневої системи і пагонів;
- прискорює адаптацію розсади в ґрунті;
- підвищує імунітет і регенерацію після захворювань;
- перешкоджає накопиченню нітратів і токсинів в тканинах рослин.

В медичній і ветеринарній практиці лікарські засоби на основі бурштинової кислоти знайшли застосування в лікуванні і профілактиці

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.21 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Ковальчук І.Л.</i>						<i>15</i>	<i>52</i>
<i>Керівник</i>	<i>Сцелейко Т.Л.</i>							
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стабніков</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		

захворювань в наступних напрямках: корекція метаболічних процесів, гнійно-септичних захворювань, запальні процеси імунодефіциту, інфекційні та паразитарні захворювання та ін [22-23].

Через свої властивості бурштинова кислота також має великий попит в косметології, її використовують в кремах, масках, гелях і т.д., вона ефективно очищає шкіру на клітинному рівні, забезпечує повноцінне «дихання» шкіри, тому колір і стан шкіри значно поліпшується, проходить набряклість, сповільнюється процес старіння. Володіючи вираженими антиоксидальними властивостями, бурштинова кислота сприяє омолодженню шкіри, підвищує її еластичність і пружність, та має тонізуючу дію [24-25].

Бурштинову кислоту також використовують в якості компонента біопластику, з огляду на стрімкий попит біопродукції дане направлення є перспективним, синтез полібутилен сукцинату (ПБС) відбувається в два етапи, початковим етапом є етерифікація сукцинату та 1,4-бутандіолу з наступної поліконденсацією з додаванням каталізатора. Але беручи до уваги, що в різній науковій літературі [26-28] використовується різна кількість сукцинату та різні компоненти і неможливість визначити кількість кінцевого продукту в результаті синтезу дане виробництво є не доцільним через неможливість точного прорахунку всіх переваг і недоліків.

З огляду на вище перераховані сфери використання бурштинової кислоти найоптимальнішим буде виробництво її для косметології. З кожним роком попит на косметологічні продукти збільшується [29] і, враховуючи той факт, що з кожним днем збільшується потреба в натуральних продуктах, дана кислота може витіснити синтетичні аналоги і потреба в ній стрімко зростає.

3.2.Розрахунок потужності виробництва

Шляхи використання бурштинової кислоти в косметології є дуже різноманітними, але ми зупинимось на потребі в омолоджуючих засобах, так як попит на дані засоби є і буде завжди, цей вибір є оптимальним. Для полегшення розрахунків ми не будемо брати окремих виробників косметичних засобів, а візьмемо кількість жінок з статистичних даних за

2020 рік [30], для розрахунку будемо брати жінок віком від 30 років (16 039 750 жінок, зважаючи що дана кількість жінок не буду використовувати крем, для подальших розрахунків приймемо 10 % від цієї кількості). Враховуючи той факт, що кількість використовуваного крему індивідуальна для кожної людини, візьмемо теоретичну кількість, приблизно 50 г крему на 2 місяці, тобто для однієї людини в рік потрібно 300 г крему.

Розрахуємо необхідну кількість крему для раніше обраної кількості жінок:

$$1\ 603\ 975 \text{ жінок} \times 300 \text{ г} = 481\ 192\ 500 \text{ г}$$

Згідно з рекомендованої кількості вмісту бурштинової кислоти в засобах для омолодження [31], яка становить 0,4%, кількість бурштинової кислоти в річній кількості крему буде:

$$481\ 192\ 500 \text{ г} \times 0,4\% = 1\ 924\ 770 \text{ г}$$

Зважаючи, що на ринку України представлений великий асортимент кремів, і те, що не всі будуть використовувати дану продукцію, для подальших розрахунків приймемо 10 % від раніше розрахованої потреби

$$1\ 924\ 770 \text{ г} \times 10\% = 192\ 477 \text{ г}$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Розрахувавши річну потребу яка становить 192,477 кг приймемо кількість робочих трудоднів $T_{рд} = 120$ днів (оптимальна кількість для виробництва, прийнявши дану кількість днів ми зможемо використовувати ферментери для синтезу інших продуктів, що є економічно доцільнішим).

Розрахуємо кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{цк} = 24 \times T_{рд} / T_{цф} = 24 \times 120 / 67 = 42,98, \text{ приймемо } N_{цк} = 43$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (60 год) та час підготовки ферментера до роботи (7 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій $K_1 = 1,3$. Підготовка ферментера включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год),

охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Кількість продукту за цикл, л/цикл:

$$V_{\text{цк}} = V_{\text{нт}}/N_{\text{цк}} = 192,477 \text{ кг} / 43 = 4,476$$

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

$$V_{\text{кр}} = K_1 \times V_{\text{цк}} \times P_{\text{гп}}/P_{\text{кр}}(1-E_{\text{св}}) = 1,2 \times 4,476 \times 99 / 1,4 \times 0,7 = 542,6 \text{ л}$$

Визначаємо робочий об'єм ферментера, $V_{\text{ф}}$, л:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{кр}}/(1-E_{\text{ф}}) = 542,6 / 0,9 = 602,8 \text{ л}$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера, л:

$$V_{\text{пф}} = V_{\text{ф}}/K_{\text{ф}} = 602,8 / 0,6 = 1\,004 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий стандартизований за об'ємом ферментер, м^3

$$V_{\text{гф}} = 1,0$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення K_{yf} , частка:

$$K_{\text{yf}} = V_{\text{ф}}/V_{\text{гф}} = 602,8 / 1\,000 = 0,602$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримуємо $V_{\text{пц}} = 542,6$ л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини враховуємо її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\text{ф}}$), які становлять 10%.

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

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{пц}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{542,6}{1 - 0,1} = 602,8 \text{ л}$$

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

$$V_{\text{ф}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{602,8}{0,6} = 1\,004 \text{ л}$$

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

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\text{ф}}} = \frac{602,8}{1\,000} = 0,602$$

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

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + E_{\phi 1}} = \frac{602,8}{1 + 0,1} = 548,0 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 602,8 - 548,0 = 54,8 \text{ л}$$

Для одержання 54,8 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\phi 2}$), які становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{54,8}{1 - 0,1} = 60,9 \text{ л}$$

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

$$V_{\phi 2} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{60,9}{0,6} = 101,5 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\phi 2} = 0,1 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\phi 2}} = \frac{60,9}{100} = 0,609$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\phi 2}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + E_{\phi 2}} = \frac{60,9}{1 + 0,1} = 55,36 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 60,9 - 55,36 = 5,54 \text{ л}$$

Для одержання 5,54 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\phi 2}$), які

становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{5,54}{1 - 0,1} = 6,15 \text{ л}$$

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

$$V_{\phi3} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{6,15}{0,6} = 10,25 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{\phi3} = 10$ л, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\phi3}} = \frac{6,15}{10} = 0,615$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\phi2}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + E_{\phi2}} = \frac{6,15}{1 + 0,1} = 5,59 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 6,15 - 5,59 = 0,56 \text{ л}$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{пм4}} = 0,56$ л можна одержати культивуванням *Actinobacillus succinogenes* 130Z у колбах на качалці. Для цього використовуємо качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становить:

$$N = \frac{V_{\text{пм4}}}{V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}} = \frac{560}{750 * 0,2} = 3,7$$

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

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

РОЗДІЛ 4

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування до ферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

За типом дихання *A. Sucinogenes* 130Z є факультативними анаеробами. За типом живлення - гетеротрофні організми, засвоюють вуглець з органічних сполук. Оптимальними умовами для культивування є температура 38 °C та рН – 6.8. При таких умовах наявний ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами, тому в даному випадку необхідно забезпечити відповідні умови для чистоти ведення процесу шляхом стерилізації обладнання і комунікацій, компонентів поживного середовища, аераційного повітря, та усіх компонентів і речовин які потрапляють в середину ферментаційного обладнання. Для запобігання контамінації в ферментері створюється надлишковий тиск шляхом подачі стерильного аераційного повітря. [32].

Отже, у зв'язку з інформацією, викладеною вище, культивування *A. Sucinogenes* 130Z здійснюється глибинним способом. Незважаючи на всі переваги безперервного культивування, перед періодичним, біосинтез Бурштинової кислоти (БК) ми будемо проводити у періодичному процесі, так як максимальний синтез кислот відбувається в стаціонарній фазі, а отже умови безперервного процесу, тобто підтримання штаму-продуцента в експоненційній фазі, нам не підходять, бо в такому випадку буде спостерігатись зниження концентрації амінокислоти в культуральній рідині.

Ферментер – герметичний вертикальний циліндричний апарат зі сферичними кришкою і днищем.

1.	Для забезпечення сталої температури культивування ферментер	НУХТ БТЕК 04.02.21 КР ПЗ				
Зос. Апп.	Л. Демченко	К. Демченко	К. Демченко	Л. Демченко		
Розробник	Кобальчук І.І.					
Керівник	Сцупейко Т.Л.					
Н. контр						
Консульт						
Зав. каф.	Стадніков					
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми				Літера	Аркуш	Аркушів
					21	52
				Кафедра БТМ ₂₁		

2. Для забезпечення інтенсифікації масообмінних процесів та кращої гомогенізації культуральної рідини використовується перемішувач з частотою обертання 150-200 об/хв.
3. Для контролю рівня рН культуральної рідини ферментер оснащується датчиком рН.
4. Для подачі поживних середовищ, стерильної води, посівного матеріалу, повітря ферментер оснащується штуцерами
5. Для запобігання можливого утворення піни встановлюємо мішалку у верхній частині апарата, яка по команді датчика буде обертатись та гасити піну.

Для остаточного вибору ферментер такого типу можна замовити в компанії Biotron (Південна Корея). Дана компанія випускає серію ферментерів Bio P об'ємом від 5 до 20 м³. Конструкції прості в обслуговуванні. У ферментерах даного виробника передбачена автоматична система мийки та стерилізації; вбудовані блоки управління, що здійснюють контроль температури, показників рН, швидкості обертання мішалки. [33]. Отже, обираємо ферментер Bio P на 10 м³, оснащений всіма деталями, вказаними вище.

4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

A. succinogenes 130Z є факультативним анаеробом, який вирощується в аеробних умовах для накопичення біомаси, а для виробничого біосинтезу використовується анаеробне культивування з метою збільшення синтезу бурштинової кислоти, тому необхідно передбачити стадію підготовки аераційного повітря.

Підготовка аераційного повітря буде здійснюватися в окремих будівлях (компресорних відділеннях), оскільки витрати повітря будуть великі.

Стадії підготовки аераційного повітря такі:

- забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником у найвищій точці Н ~ 17

м (висота поверху – 6 м, кількість поверхів – 2, висота поверхів – 12 м, разом з косим дахом будівлі (+3 м) – 15, відбір повітря повинен відбуватися на 2-3 метри вище найвищої точки), де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря;

- очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) на плоских тканинних фільтрах грубого очищення;
- стиснення повітря в компресорах або турбоповітродувках (при цьому повітря нагрівається до температури 120 – 200°C);
- охолодження стисненого повітря до температури «точки роси» для конденсації вологи;
- видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, у ресивері, який також зменшує пульсації руху повітря, які можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря;
- стабілізація тиску та температури підігріванням до 45–50 °C парою у відповідних теплообмінниках;
- очищення в головних ємнісних набивних фільтрах, установлених поблизу ферментаційних відділень, до ступеня очищення $E=95\%$;
- очищення в індивідуальних фільтрах ($E=99,995\%$), установлених на ферментері, повітря до яких подається безпосередньо від головних фільтрів через трубопроводи (колектори).

Повітря в боксах і лабораторіях, де працюють з посівною культурою, стерилізують за допомогою УФ-ламп.

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Для виробництва бурштинової кислоти використовується ферментер об'ємом 1 м³, а також збірники та інокулятори, тому доцільно використовувати циркуляційну СІР – мийку. Миття та ополіскування ферментерів та збірників проводиться паралельно та триває близько 1,5 години.

Сучасне біотехнологічне виробництво передбачає в собі підготовку виробничого обладнання, оскільки воно не повинно негативно впливати на якість кінцевої продукції. Частина або поверхні устаткування, що контактують з продукцією, повинні бути виготовлені з матеріалів, які не вступають з нею в реакцію, не мають абсорбційних властивостей тощо. Тому для забезпечення максимальної якості готового продукту технологічне обладнання також повинно проходити певну підготовку.

Для того, щоб обрати миючий або дезинфікувальний засіб, необхідно знати загальну площу миття, концентрацію робочого засобу та його витрати на оброблення потрібної площі виробничого приміщення. Окрім цього слід звернути увагу і на саму вартість цих засобів [34].

Головним фактором, що впливає на ефективність і якість санітарної обробки, є якість миючих засобів, правильно підібрана його концентрація і температура процесу мийки.

На підприємствах для миття технологічного обладнання застосовують як окремі хімічні речовини (кислоти і луги), так і миючі препарати, що представляють складні хімічні суміші - багатоконпонентні системи, що складаються з 5-10 компонентів серед яких як правило, основну роль грають поверхнево-активні речовини, що володіють миючим, змочувальним і емульгуючи дією, а катіонні ПАВ ще є і дезінфектантами.

Рекомендується чергувати дезинфікуючі та антисептичні засоби кожні 1–3 місяці з метою запобігання розвитку та розповсюдженню стійких варіантів мікроорганізмів.

Миття ємнісного обладнання проводиться методами циркуляції робочого розчину в системі, заповнення резервуара (біореактора) робочим розчином засобу складатиме близько половини з відповідним об'ємом обладнання [35]. Дезинфекцію зовнішніх поверхонь проводять шляхом нанесенням або розпилення робочого розчину дезинфікуючого засобу на поверхню обладнання. Тривалість контакту дезинфікуючого засобу з поверхнею

повинна складати не менше 20 хв. Після закінчення обробки залишки засобу змивають і промивають устаткування водою.

До мийно-дезінфікуючих і дезінфікуючих препаратів, які використовуються на підприємствах харчової промисловості, пред'являються особливі вимоги з точки зору їх безпечного застосування:

- всі препарати повинні мати висновки державної санітарно-епідеміологічної експертизи центрального органу виконавчої влади у сфері охорони здоров'я на використання в заявленій галузі;
- всі миючі та чистячі препарати підлягають обов'язковій сертифікації, тому кожен з них повинен мати сертифікат відповідності;
- кожна партія продукції повинна супроводжуватися документом якості;
- водні робочі розчини миючих засобів певної концентрації повинні забезпечувати абсолютну чистоту оброблюваної поверхні як за фізико-хімічними так і за мікробіологічними показниками;
- миючі засоби і входять до них компоненти повинні добре змиватися з оброблюваних поверхонь;
- в складі миючих засобів не повинні міститися інгредієнти, що володіють наркотичними, алергенними, канцерогенними, мутагенними властивостями в концентраціях, з якими мають контакт працівники;

Серед усіх миючих та дезінфікуючих засобів було обрано найбільш кращі засоби, найбільш ефективні, якісні та які задовольняють нормативні умови. Серед таких засобів слід виділити Каустичну соду, «Супераль», «Ексан-про-дез», «Гембар» «Хлор Ліквід», «Бланідас 300».

Супераль - сильно низькопінний миючий засіб з антимікробною дією для зовнішньої і внутрішньої мийки водостійких поверхонь трубопроводів, ємностей, обжарочних термокамер, грилів і коптилень, духовок, підлог, стін (покритих керамічною плиткою) у виробничих приміщеннях і цехах на підприємствах харчової промисловості.

Склад: комплекс ПАР і лугів, інгібітор корозії, комплексоутворювач, піногасник. [36]

Каустична сода(гідроксид натрію),є однією з найвідоміших і найкращих засобів для дезінфекції. Зупинити вибір на даному засобі,отже прийняти правильне рішення!

Каустична сода – відмінний універсальний дезінфектант з потужним бактерицидним ефектом,що засноване на сильних лужних характеристиках. Завдяки своїм властивостям, широко застосовується в найрізноманітніших галузях промисловості, у тому числі хімічної, металургійної, газової, нафтохімічної, целюлозно-паперової, текстильної, харчової. [37]

Ексан-про-дез - слаболужний пінний очисник з антимікробною дією для ручного миття або з допомогою піногенератора забруднених водостійких поверхонь обладнання та приміщень в різних галузях харчової промисловості, а також для миття жирного посуду на підприємствах громадського харчування і в побуті. Засіб дозволено Міністерством охорони здоров'я для застосування за призначенням в дитячих установах.

Склад:ПАР, гліцерин, ізопропанол, антимікробна добавка, віддушка. [38]

Гембар - економічний препарат для дезінфекції поверхонь, інвентарю і посуду. Не містить луку, альдегиду, фенолу, окислювальних і хлорпохідних сполук.

Активно діюча речовина: гуанідинова полімерна сполука, яка є синтетичним аналогом природних гуанідинових сполук.

Препаративна форма: розчин (25% концентрат).

Препарат має пролонговану бактерицидну, фунгіцидну, віруліцидну дію. Інактивує мікроби, в тому числі туберкульозу, грибки, віруси, у тому числі повно-, адено-, гепатиту Б, герпеса, енцефалітний, грипу, ВІЛ та інше. [39]

Хлор Ліквід - універсальний рідкий концентрований засіб на основі гіпохлориту натрію та комплексу допоміжних функціональних компонентів з широкою сферою застосування (дезінфекція, достерилізаційного очищення, стерилізація)

Властивості і призначення:

- засіб для проведення поточної, заключної та профілактичної дезінфекції, генеральних прибирань;
- для дезінфекції, суміщення процесів дезінфекції та достерилізаційного очищення, стерилізації виробів медичного призначення;
- дезінфекція та одночасне миття поверхонь в приміщеннях;
- для дезінфекції гідравлічного контуру апаратів для гемодіалізу;
- для знезараження перед утилізацією використаних виробів медичного призначення одноразового використання; [40]

Бланідас 300 - професійний засіб для дезінфекції на основі хлору «Бланідас 300» від вітчизняного виробника .

Бланідас давно зарекомендувало себе, як одне з найбільш ефективних для проведення дезінфекції і очищення поверхонь, медичних інструментів, посуду.

До складу «Бланідас 300» входять:

- діючі речовини – натрієва сіль дихлорізоціанурової кислоти 80,5%;
- допоміжні речовини – адипінова кислота 8,7%, бікарбонат натрію 8,7%, карбонат натрію 2,2%.

Засіб «Бланідас 300» випускається у формі таблеток та гранул і швидко розчиняється у воді. Готовий розчин не має кольору і відрізняється характерним хлорним запахом. [41]

4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез бурштинової кислоти (13,98 г/л) досягається за умов росту мікроорганізму *A. succinogenes* 130Z на поживному середовищі з наступним складом, (г/л):

Сирна сироватка – 35;

Дріжджовий екстракт – 5;

K_2HPO_4 – 3;

NaCl – 2;

$CaCl_2$ - 0,2;

$MgCl_2$ - 0,2.

Відповідно до розрахунків, які наведені в розділі 1, виробничий біосинтез відбувається в ферментері об'ємом 1 м³. Інокулянт отримують у чотири етапи: у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 10, 100 л.

Для вирощування початкового посівного матеріалу використовують середовище, яке наведено раніше. Стерилізація буде відбуватись в автоклаві, через невеликий об'єм поживного середовища. Зважаючи на режим стерилізації компонентів поживного середовища, поділимо його на наступні композиції:

Композиція А: сирна сироватка та дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: NaCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Розчин сирної сироватки і дріжджового екстракту (композиція А) є термолабільним і потребує м'якого режиму стерилізації. Солі композиції В стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати (композиція Б) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію.

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

В цій стадії необхідно 5,59 л поживного середовища, ділимо його на наступні композиції, в залежності від режиму стерилізації окремих його складових:

Композиція А: сирна сироватка та дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: NaCl, CaCl₂, MgCl₂, (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Розчин сирної сироватки та дріжджового екстракту (композицію А) готують і стерилізують в автоклаві, у колбі об'ємом 2 л за наступних режимів: 112°С, 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Солі композиції В стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати (композиція Б) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію.

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

Для цієї стадії необхідно 55,36 л поживного середовища, поділ композицій відбувається, як і для попередньої стадії тільки дві композиції солей об'єднують в одну. Композицію А готують і стерилізують в окремому реакторі-змішувачі. Композицію Б готують в окремому збірнику, а стерилізують в інокуляторі (для зменшення ймовірності контамінації), процес стерилізації відбувається при рН 4,5, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином хлоридної кислоти.

По закінченню стерилізації композицій в інокулятор перистальтичним насосом подають композицію А і доводять рН до 6,8 за допомогою внесення 6%-ого розчину натрій гідроксиду.

Для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 1 м³ необхідно 548 л поживного середовища, поділ композицій відбувається, як і для 100 л посівного апарата.

Композиція А: сирна сироватка, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 20 хв);

Композиція Б: NaCl, CaCl₂, MgCl₂, K₂HPO₄ (режим стерилізації: 131 °C, 40 хв);

Композицію А готують і стерилізують в окремому реакторі-змішувачі. Композицію Б готують в окремому збірнику, а стерилізують в інокуляторі (для зменшення ймовірності контамінації), процес стерилізації відбувається при рН 4,5, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином хлоридної кислоти.

По закінченню стерилізації композицій в ферментер перистальтичним насосом додають композицію А і доводять рН до 6,8 за допомогою внесення 6%-ого розчину натрій гідроксиду.

Розглянувши компоненти поживного середовища можна зазначити, що серед компонентів відсутні речовини, які виступають піноутворюючими компонентами, тому внесення і попереднє приготування піногасника непотрібне.

Зважаючи на поділ компонентів поживного середовища та режими стерилізації можемо зазначити про необхідність внесення у технологічну схему етапу підготовки титрувальних агентів: 6% розчину NaOH та 6% розчину HCl.

Для приготування поживного середовища необхідно простерилізувати композиції, з яких буде складатися ПС. Для унеможливлення випадіння осадів фосфорних солей магнію, феруму та мангану, під час нагрівання розчину солей в апараті, необхідно перед стерилізацією внести 6 %-ий розчин хлоридної кислоти і, враховуючи, що оптимальним рН для *Actinobacillus succinogenes 130Z* знаходиться на рівні 6,8, необхідно перед внесенням посівного матеріалу підлужити поживне середовище за допомогою 6 %-го розчину NaOH.

Таблиця 4.1

Розрахунок вмісту та особливості приготування розчинів та стабілізації рН середовища

Об'єм середовища, л	NaOH		HCl (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,57	-	-	-	-
5,63	11,4	у колбі на 2,5 л	11,4	у колбі на 2,5 л
55,9	112		112	
553,6	1,1		1,1	

Розділ 5. Специфікація обладнання

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу бурштинової кислоти

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр панельний ФВП-99-48-G4, фільтрувальний матеріал – хімволокно (поліестер), зафіксований на сітці, знаходиться в рамці з товщиною 48 мм; продуктивність – 7600 м ³ /год; E = 90 % [42]
К-3	Компресор	1	Компресор гвинтовий Comprac F-3710; продуктивність 5,5 м ³ /хв, робочий тиск – 10 бар, габарити: 1400*1000*1500 мм; потужність приводу – 37 кВт [43]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач RDX 65, продуктивність 6,5 м ³ /хв, робочий тиск 14 бар, потужність приводу – 1,1 кВт [44]
Рс-5	Ресивер	1	Ресивер РВ 6000/8, об'єм – 6 м ³ , сталь, робочий тиск – 0,8 МПа [45]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник AVS 160, габарити: 265x290x304 мм; продуктивність 430 м ³ /год, оцинкована сталь, потужність 7,46 кВт [46]
Ф-7	Фільтр головний	1	Фільтр комірковий ФВК-3-592-592-(300/600)-6-(F9); фільтрувальний матеріал – Meltblown, зшитий у вигляді комірок, в оцинкованій рамці; продуктивність – 3400 м ³ /год; E = 95 % [47]
ІФ-8 ІФ-13 ІФ-20 ІФ-27	Фільтр індивідуальний	4	Фільтр МКР-305x305x78-Н14, фільтрувальний матеріал – поліестер, зшитий у вигляді комірок, в оцинкованій рамці; площа фільтрування – 2,6 м ² , продуктивність – 130 м ³ /год; E = 99,995 % [48]
ІН-9	Інокулятор	1	Об'єм апарату – 10 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; модель - BLBIO-10SJ; висота – 1600 мм, довжина – 890 мм; ширина - 660; перемішування забезпечується механічною мішалкою; обладнаний датчиками температури, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [49]
Н-10	Насос перистальтичний для перекачування розчину від ІН-9 у інокулятор ІН-17	1	Перистальтичний насос Dynamik. Максимальний тиск – до 3 бар, продуктивність 10 л/год [50]

<i>НУХТ БТЕК 04.02.21 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розробник</i>	<i>Ковальчук І.І.</i>			
<i>Керівник</i>	<i>Сцелейко Т.І.</i>			
<i>Н. контр</i>				
<i>Консульт</i>				
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков</i>			
Розділ 5. Специфікація обладнання			<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>
				<i>Аркушів</i>
				32
			52	
<i>Кафедра БТМ</i>				

Продовження таблиці 3.1

P-11	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації розчину	1	Реактор сталевий емальований об'ємом 10 л, виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); довжина – 420 мм; висота - 500 мм; ширина – 350 мм; оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв; потужність двигуна 0,75 кВт [51]
P-12	Реактор-змішувач для розчинення розчину солей	1	Реактор з нержавіюча сталь 316L об'ємом 5 л; виробник – Тирит; діаметр 450 мм, висота 1430 мм; оснащений сорочкою та якірною мішалкою [52]
ІН-14	Інокулятор	1	Об'єм апарату – 100 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; модель - РФ-100; виробник - тм ПРОМВИТ; висота – 1600 мм, довжина – 1300 мм; ширина - 700; витримує тиск до – 0,3 МПа; перемішування забезпечується турбінною мішалкою, швидкість перемішування 200-400 об/хв; обладнаний датчиками, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [24]
ДЗ-15 ДЗ-18 ДЗ-23	Об'ємно-ваговий дозатор	3	Дозатор ваговий автоматичний. Мінімальна межа дозування – 0,2 кг, максимальна – 50 кг. Розміри: 870*870*2100 мм; дискретність відліку 0.005 г. [53]
P-16	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації розчину	1	Об'єм апарату – 100 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; частота обертання якірної мішалки – 50 об/хв.; витримує тиск – 0,6 МПа; діаметр – 508 мм, висота – 2335 мм; виробник – ТД Красный Октябрь [54]
Н-17	Насос перистальтичний для перекачування розчину від Р-16 у ферментер ІН-21	1	Перистальтичний насос МР-8. Швидкість обертання 35 об/хв, продуктивність 140 л/год [55]
P-19	Реактор-змішувач для розчину	1	Об'єм апарату – 10 л; матеріал – нержавіюча сталь; перемішування здійснюється за допомогою магнітної муфти за швидкості – 300 об/хв; діаметр – 219 мм, висота – 380 мм; витримує тиск – 0,39 МПа, виробник – МашХим [56]
ІН-21	Ферментер	1	Об'єм апарату – 1 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виробник - БИОТЕХНО; висота – 3260 мм, діаметр - 1438; витримує тиск до – 0,3 МПа; перемішування забезпечується механічною мішалкою, швидкість перемішування 200-400 об/хв; обладнаний датчиками, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [57]

Розділ 6. Опис технологічної схеми

Технологічна схема синтезу бурштинової кислоти бактеріями *A. succinogenes* 130Z включає в себе допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка і стерилізація поживних середовищ, приготування титрувальних агентів) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

Технологічну та апаратурну схему біосинтезу бурштинової кислоти наведено у графічній частині проєкту.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби повітрязабірника (ПЗ-1) у найвищій точці $H = 17$ м.

ДР 1.2. Очистка від грубих домішок

Попередню очистку повітря здійснюють на тканинному фільтрі грубого очищення (Ф-2). Очистка від грубих домішок проводиться з ефективністю $E = 90\%$, затримуються частинки $\delta > 50$ мкм.

ДР 1.3. Компресіювання повітря

Для забезпечення умов аерації та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері, інших опорів, а також для інших потреб виробництва, повітря стискають у компресорі (К-3), відбувається нагрівання до $120-200$ °С, тиск становить $1,0$ МПа.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря (від ДР 1.3) необхідно охолодити в теплообміннику-осушувачі (Т-4) до температури $25-30$ °С для видалення надлишкової вологи. Зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Рс-5), де усуваються пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря. Вологість повітря має становити $60-70\%$.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.21 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Ковальчук І.Л.</i>					<i>34</i>	<i>52</i>
<i>Керівник</i>		<i>Сцлейко Т.Л.</i>						
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков</i>				<i>Кафедра БТМ 34</i>		

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Повітря (від ДР 1.4) нагрівають до температури 45-50 °С у теплообміннику-нагрівачі (Т-6). Вологість повітря має становити 50%.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Нагріте повітря (від ДР 1.5) надходить на головний фільтр (Ф-7), установлений біля ферментаційних відділень. Ступінь очищення повітря має становити 95%.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 1.6) подається безпосередньо в індивідуальні фільтри (ІФ-8, ІФ-13, ІФ-20) кожного біореактора (до ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 5.7). Ступінь кінцевої очистки повітря становить $E = 99,995\%$ та $KУО = 0$.

ДР 2. Підготовка вуглекислого газу для виробничого біосинтезу

ДР 2.1. Подача вуглекислого газу

Вуглекислий газ подають з балону, для очищення використовують індивідуальні фільтри (ІФ-27), які встановлюються безпосередньо перед ферментером. Ступінь очищення становить 99,9% (ТП 6.1).

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 3.1. Приготування 6-% розчину хлоридної кислоти на весь виробничий біосинтез

Для того, щоб приготувати 1,223 л 6%-ї хлоридної кислоти, в колбу об'ємом 2,5 л вносять 1,02 л дистильованої води і додають при постійному перемішуванні 0,204 л 36%-ї HCl, відміряної мірним циліндром. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація 6-% розчину їдкого натрію на весь виробничий біосинтез

Для приготування 1,223 л розчину 6%-го розчину натрій гідроксиду на терезах зважують 73,4 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають в колбу об'ємом 2,5 л і додають 1,223 л дистильованої води, перемішують до

повного розчинення та закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

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

Для вирощування інокуляту потрібно 570 мл поживного середовища (ПС). Вміст компонентів для приготування ПС об'ємом 570 мл наведено у таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 570 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента для приготування 560 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сирна сироватка	35	19,6	А	0,36
Дріжджовий екстракт	5	2,8		
Вода		0,36		
K ₂ HPO ₄	3	1,68	Б	0,1
Вода		0,1		
NaCl	2	1,12	В	0,1
CaCl ₂	0,2	0,112		
MgCl ₂	0,2	0,112		
Вода		0,1		
Разом:				0,56

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 19,6 г сирної сироватки та вносять у колбу об'ємом 1 л, доливають 360 мл холодної води, потім розчин нагрівають до 70-90 градусів впродовж 30 хв, після розчинення сироватки в воді на технічних вагах зважують 2.8 г дріжджового екстракту та додають у колбу з розчином, та перемішують. Закривають колбу ватно-марлевым корком. Приготований розчин стерилізують в автоклаві при t - 112°C 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують K₂HPO₄ – 1,68 г. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 100 мл водопровідної води, перемішують.

Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, упродовж 40 хв.

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують NaCl 1,12 г, CaCl₂ 0,112 г, MgCl₂ 0,112 г. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 100 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, упродовж 40 хв.

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 10 л (ІН-9), потрібно приготувати 5,59 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування середовища наведено у таблиці. 4.2.

Для визначення необхідної кількості води потрібної на приготування композиції необхідно враховувати конденсат (10%), оскільки стерилізація відбувається гострою парою у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 5,13 л.

Таблиця 6.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5,63 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента для приготування 5,59 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сирна сироватка	35	195,65	А	0,5
Дріжджовий екстракт	5	27,95		
Вода		0,5		
K ₂ HPO ₄	3	16,77	Б	4,63
NaCl	2	11,18		
CaCl ₂	0,2	1,12		
MgCl ₂	0,2	1,12		
Вода		4,63		
Конденсат		0,46		0,46
Разом:				5,59

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 195,65 г сирної сироватки та вносять у колбу об'ємом 1 л, доливають 500 мл холодної води, потім розчин нагрівають до 70-90 градусів впродовж 30 хв, після розчинення сироватки в воді на технічних вагах зважують 27,95 г дріжджового екстракту та додають у колбу з розчином, та перемішують. Закривають колбу ватно-марлевым корком. Приготований розчин стерилізують в автоклаві при $t = 112^{\circ}\text{C}$ 30 хв.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують K_2HPO_4 16,77 г, NaCl 11,18 г, CaCl_2 1,12 г, MgCl_2 1,12 г. Наважку поміщають в колбу об'ємом 1 л додають 670 мл питної води та перемішують, після розчинення компонентів розчин поміщають в посівний апарат об'ємом 10 л, додають 4 л питної води та вносять 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 3.1) до досягнення рН 4,5. Стерилізацію проводять безпосередньо у ферментері при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 55,36 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в таблиці 4.3.

Для визначення необхідної кількості води потрібної на приготування композиції необхідно враховувати конденсат (10%), оскільки стерилізація відбувається гострою парою у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 50,4 л.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 55,9 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента для приготування 55,36 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сирна сироватка	35	1 937,6	А	7,8
Дріжджовий екстракт	5	276,8		
Вода		7,8		
Конденсат		0,78		0,7
K ₂ HPO ₄	3	166,1	Б	42,6
NaCl	2	110,7		
CaCl ₂	0,2	11,1		
MgCl ₂	0,2	11,1		
Вода		42,6		
Конденсат		4,26		4,26
Разом:				55,88

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1 937,6 г сирної сироватки та вносять у реактор – змішувач об'ємом 10 л (Р-11), доливають 7,8 л холодної води, потім розчин нагрівають до 70-90 градусів впродовж 30 хв, після розчинення у воді вносять 276,8 г дріжджового екстракту та перемішують. Стерилізацію проводять безпосередньо у збірнику при 112°C упродовж 30 хв.

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують K₂HPO₄ 166,1 г, NaCl 110,7 г, CaCl₂ 11,1 г, MgCl₂ 11,1 г. Наважку поміщають в реактор-змішувач об'ємом 5 л (Р-12) додають 3,5 л питної води та перемішують, після розчинення компонентів розчин поміщають в посівний апарат об'ємом 100 л (ІН-14), додають 39 л питної води та вносять 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 3.1) до досягнення рН 4,5. Стерилізацію проводять безпосередньо у ферментері при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м³

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 548 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в таблиці 4.4.

Для визначення необхідної кількості води потрібної на приготування композиції необхідно враховувати конденсат (10%), оскільки стерилізація відбувається гострою парою у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 498,7 л.

Таблиця 6.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 553,6 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента для приготування 548 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сирна сироватка	35	19 180	А	83
Дріжджовий екстракт	5	2 740		
Вода		83		
Конденсат		8,3		8,3
K ₂ HPO ₄	3	1 644	Б	415,7
NaCl	2	1 096		
CaCl ₂	0,2	109,6		
MgCl ₂	0,2	109,6		
Вода		415,7		
Конденсат		41		41
Разом:				553,6

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно – ваговий дозатор (ДЗ-15) зважують 19 180 г сирної сироватки та вносять у реактор – змішувач об'ємом 100 л (Р-16), доливають 83 л холодної води, потім розчин нагрівають до 70-90 градусів впродовж 30 хв, після розчинення у воді вносять 2740 г дріжджового екстракту та перемішують. Стерилізацію проводять безпосередньо у збірнику при 112°C упродовж 30 хв.

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують K_2HPO_4 1 644 г, NaCl 1 096 г, $CaCl_2$ 109,6 г, $MgCl_2$ 109,6 г. Наважку поміщають в реактор-змішувач об'ємом 10 л (Р-19) додають 8,7 л питної води та перемішують для кращого розчинення солей у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин солей, після розчинення компонентів розчин подають в посівний апарат об'ємом 1 м^3 (ІН-21), додають 407 л питної води та вносять 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 3.1) до досягнення рН 4,5. Стерилізацію проводять безпосередньо у ферментері при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру зберігають у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі МПА при температурі $4\pm 2^\circ\text{C}$. Пересіви на свіже середовище проводять 1...2 рази на 3-4 місяці. При роботі необхідно строго дотримуватись асептичних умов.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з середовищем МПА, в асептичних умовах розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашках Петрі з агаризованим середовищем. Вирощують при температурі 38°C упродовж 24 год.

ТП 5.3. Одержання робочої культури на агаризованому поживному середовищі

Колекційну культуру методом виснажувального штриха переміщують на чашку Петрі з МПА для одержання ізолюваних колоній. Культивують в термостаті при $t = 38^\circ\text{C}$ (48 год)

ТП 5.4. Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Отримані ізольовані колонії з чашки Петрі (від ТП 5.3) пересівають в пробірки зі скошеним МПА. В пробірки пересівають тільки колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Культивують в термостаті при $t = 38$ °С (24 год).

ТП 5.5. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 1 л з стерильною композицією А (від ДР 4.1.1) вносять композиції Б, В (від ДР 4.1.2 та ДР 4.1.3), перемішують і розливають по 142,5 мл у чотири качалочні колби об'ємом 750 мл. Культуру вирощують у колбах на качалках упродовж 24 год при $t = 38$ °С.

ТП 5.6. Вирощування інокуляту в ферментері об'ємом 10 л

В інокулятор об'ємом 10 л (ІН-9) з простерилізованим розчином композиції Б (від ДР 4.2.2) через засівну колбу вносять композицію А (від ДР 4.2.1). Після вмикають перемішуючий пристрій і додають 6%-ий розчин NaOH (від ДР 3.2) до рН 6.8, орієнтуючись на показники датчика.

Посівний матеріал вносять через засівну колбу (від ТП 5.5). Культивують при $t = 38$ °С з частотою обертів/хв перемішуючого пристрою об/хв. Впродовж 48 год. Кожні 8 годин відбирають контрольну пробу та здійснюють контроль процесу (мікробіологічний контроль та концентрація біомаси)

ТП 5.7. Вирощування інокуляту в ферментері об'ємом 100 л

В посівний апарат з композицією Б (від ДР 4.3.2) вносять композицію А об'ємом (від ДР 4.3.1.). Після вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-вим розчином NaOH (від ДР 3.2) до рН 6.8, орієнтуючись на показники датчика. Після через трубу перетискування подають інокулят (від ТП 5.6).

Культивують при $t = 38$ °С та при перемішуванні 200 об/хв. Впродовж 48 год. Кожні 8 годин відбирають контрольну пробу та здійснюють контроль процесу (мікробіологічний контроль та концентрація біомаси).

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1 м³

У ферментер об'ємом 1 м³ (Ф-21) подається з простерилізованою композицією Б (від ДР 4.4.2) за допомогою перистальтичного насоса простерилізована композиція А (від ДР 4.4.1). Після вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-вим розчином NaOH (від ДР 3.2) до рН 6.8, орієнтуючись на показники датчика. Після через трубу перетискування подають інокулят (від ТП 5.6).

Культивують при $t = 38$ °С з частотою обертів/хв перемішуючого пристрою 200 об/хв, впродовж 60 год. Кожні 8 годин відбирають контрольну пробу та здійснюють контроль процесу (мікробіологічний контроль та концентрація біомаси).

Культивують до концентрації цільового продукту 13,98 г/л при температурі 38°С упродовж 60 год.

Розділ 7. Контроль виробництва

7.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль проводиться шляхом висіву зразка на чашку Петрі методом виснажувального штриха або мікроскопіюванням. Для перевірки мікробіологічної чистоти культуральну рідину розсівають на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій (інкубують 24–48 год за температури 37 ± 2 °C), і на чашки з сусло-агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) для виявлення дріжджів і грибів (інкубують 7 діб за температури 30 ± 2 °C) [58].

Мікроскопіюють зразок використовуючи препарат «роздавлена крапля». Готують його наступним чином: на знежирене предметне скло наносять краплю культуральної рідини, накривають покривним скельцем та мікроскопіюють, використовуючи об'єктив 40×. Клітини *Actinobacillus succinogenes* 130Z мають форму палички з закругленими кінцями розміром $2-3 \times 0,4-0,6$ мкм. Добре ростуть на звичайних поживних середовищах, де утворюють білі, гладенькі, блискучі, пласкі або злегка опуклі колонії [59].

Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Відбирають пробу простерилізованого поживного середовища в об'ємі 50 мл, висівають 0,1 мл з цієї кількості на чашки Петрі з сусло-агаром – для виявлення грибів та дріжджів, з м'ясо-пептонним агаром – для виявлення бактерій. Чашки з посівами загортають у папір і поміщають у термостат для інкубації за температури 32-34 °C протягом 1-2 діб (бактерії) та за 24-26 °C протягом 3-5 діб (гриби, дріжджі). На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів [58].

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.21 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Ковальчук І.Л.</i>					44	52
<i>Керівник</i>		<i>Сцлейко Т.Л.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков</i>			44			

7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.2.1 Концентрація біомаси

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод), на фотоелектроколориметрі з довжиною хвилі 660 нм в кюветах з товщиною 0,5 см, з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка [60].

7.2.2. Визначення концентрації цільового продукту

Концентрацію бурштинової кислоти будемо визначати методом обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії, використовуючи для цього хроматограф Shimadzu LC20 Prominence з колонкою Phenomenex Luna C18, заповненою сорбентом з октадецильною фазою з діаметром частинок 3 мкм [61].

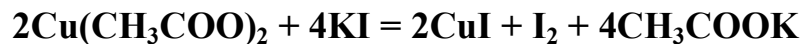
7.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Джерелом вуглецю в поживному середовищі є сирна сироватка, основним компонентом якої є лактоза, концентрацію якої будемо визначати кондуктометричним методом. Суть даної методики полягає в перетворенні лактози на пероксид водню та D-глюконолактон дією кількох ферментів (β -галактозидази, мутаротази та глюкозооксидази), після чого останній гідролізується до глюконової кислоти, внаслідок дисоціації якої змінюється електропровідність розчину, що й реєструється кондуктометричним перетворювачем [62].

Основним джерелом азоту в даному середовищі є дріжджовий екстракт, тому будемо визначати кількість амінного азоту, мідним способом. Суть даного методу полягає в тому, що до супернатанту (отриманого після відділення біомаси та підлужнення 0,1 М розчином натрію гідроксиду) додають надлишок суспензії ортофосфату міді $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні сполуки, які відділяють від нерозчинного ортофосфату міді фільтруванням. Потім до фільтрату додають оцтову кислоту,

яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді [63].

Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину додають йодид калію:



В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентному кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитровують розчином тіосульфату натрію, після чого обчислюють кількість амінного азоту в мг/л, врахувавши, що 1 мл 0,01 М розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту [63]

Список використаної літератури

1. Succinic acid [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1110>
2. Е363 Янтарная кислота - описание пищевой добавки, польза и вред, использование [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://calorizator.ru/addon/e3xx/e363>
3. Зефіров Н.С.Хімічна енциклопедія .2010.783 с.
4. Патент №114497.Властивості і спосіб одержання янтарної кислоти /Д.Живкович,Я.Крікен.Опубл.26.06.2017.
- 5.Кровоносова О.В. Бурштинова кислота та її похідні,способи отримання.2012,554 с.
6. Бурштинова кислота.Властивості, характеристики та застосування. [Електронний ресурс].Режим доступу: him-element.com.ua.
7. Pat.23677529 USA.Enhanced succinic acid production by Actinobacillus succinogenes after genome shuffling/K. Zhang, Q.Yan, Z.Sun.Publ.16.05.2013
8. Ferone M.,Raganati F., Olivieri G., Salatino P., Marzocchella A. Continuous Succinic Acid Fermentation by Actinobacillus Succinogenes: Assessment of Growth and Succinic Acid Production Kinetics. 2019 Mar;187(3):782-799. doi: 10.1007/s12010-018-2846-8
9. T .N Tanaschuk, A. V. Mardanov Genomics and Biochemistry of Saccharomyces cerevisiae Wine Yeast Strains. 2016 Dec;81(13):1650-1668. doi:10.1134/S0006297916130046.
10. A. Douglass , B. Stephanie B.Galleani. Population genomics shows no distinction between pathogenic Candida krusei and environmental Pichiakudriavzevii: One species, four names. 2018 Jul 19;14(7):e1007138.doi: 10.1371
- 11.Louasté, Bouchra, and Nouredine Eloutassi. "Succinic acid production from whey and lactose by *Actinobacillus succinogenes* 130Z in batch fermentation." Biotechnology Reports 27. 2020: e00481. doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00481
12. Honghui W, Jiachuan P, Jing W., «Succinic acid production from xylose mother liquor by recombinant Escherichia coli strain» Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2014 Vol. 28, No. 6, 1042 1049.

13. Pyung Cheon Lee, Sang Yup Lee. Kinetic Study of Organic Acid Formations and Growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* During Continuous Cultures. November 2009 *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(11):1379-84 DOI:10.4014/jmb.0905.05026
14. Guettler, M. V., Rumler D.C. *Actinobacillus succinogenes* a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen, *International Journal of Systematic Bacteriology* 2010, 49. 207-216.
15. Kim, P., M. Laivenieks, C. Vieille, . Effect of over expression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 2009, 70. 1238-1241.
16. McKinlay, J.B., Zeikus, J.G., Vieille, C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. *Applied and Environmental Microbiology* 2011, 71. 6651-6656.
17. Park, D.H., Zeikus, J.G. . Utilization of electrically reduced neutral red by *Actinobacillus succinogenes*: physiological function of neutral red in membrane-driven fumarate reduction and energy conservation. *Journal of Bacteriology*, 2012, 181. 2403-2410
18. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. 2010. 632 с.
19. Succinic acid [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1110>
20. E363 Янтарная кислота - описание пищевой добавки, польза и вред, использование [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://calorizator.ru/addon/e3xx/e363>
21. Позднякова А.В., & Резвицкий Т.Х. (2020). ЯНТАРНАЯ КИСЛОТА В УХОДЕ ЗА ОРХИДЕЯМИ (ФАЛЕНОПСИС). *The Scientific Heritage*, (50-3), 11-12.
22. Яковлева Елена Григорьевна, Анисько Роман Владимирович, & Горшков Григорий Иванович (2015). Янтарная кислота - природный адаптоген и иммуностимулятор. *Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии*, (7), 164-167.
23. Евглевский, А. А., Рыжкова, Г. Ф., Евглевская, Е. П., Ванина, Н. В., Михайлова, И. И., Денисова, А. В., & Ерыженская, Н. Ф. (2013). Биологическая роль и метаболическая активность янтарной кислоты. *Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии*, (9), 67-69.

24. Рязанова, Е. А., & Хадарцев, А. А. (2006). Лазерофорез гиалуроновой и янтарной кислот в сочетании с электромиостимуляцией в практике дерматолога и косметолога. Вестник новых медицинских технологий, XIII (4), 79-80.
25. Янтарная кислота ХЧ, 1 кг - Мыло-опт [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://xn---utbcjbgv0e.com.ua/yantarnaya-kislota-hch-1-kg.html>
26. Ferreira, L. P., Moreira, A. N., Pinto, J. C., & de Souza, F. G. (2014). Synthesis of poly(butylene succinate) using metal catalysts. Polymer Engineering & Science, 55(8), 1889–1896. doi:10.1002/pen.24029
27. Xu, Y., Xu, J., Liu, D., Guo, B., & Xie, X. (2008). Synthesis and characterization of biodegradable poly(butylene succinate-co-propylene succinate)s. Journal of Applied Polymer Science, 109(3), 1881–1889. doi:10.1002/app.24544
28. Oishi, A., Zhang, M., Nakayama, K., Masuda, T., & Taguchi, Y. (2006). Synthesis of Poly(butylene succinate) and Poly(ethylene succinate) Including Diglycollate Moiety. Polymer Journal, 38(7), 710–715. doi:10.1295/polymj.pj2005206
29. Божков А.И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты. – Харьков, 2005. – 364 с.
30. Діти, жінки та сім'я в Україні - Державна служба статистики [Електронний ресурс] Режим доступа: http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2020/zb/09/DJS_2019_pdf.pdf
31. Рынок косметики в Украине: анализ и прогноз [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://alfaspa.ua/rynok-kosmetiki-v-ukraine-analiz-i-prognoz>
32. Pyung Cheon Lee, Sang Yup Lee. Kinetic Study of Organic Acid Formations and Growth of Anaerobiospirillum succiniciproducens During Continuous Cultures. November 2009 Journal of Microbiology and Biotechnology 19(11):1379-84 DOI:10.4014/jmb.0905.05026
33. Louasté, Bouchra, and Nouredine Eloutassi. "Succinic acid production from whey and lactose by Actinobacillus succinogenes 130Z in batch fermentation." Biotechnology Reports 27. 2020: e00481. doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00481
34. Люлина Н. В. Стандарты подготовки помещений // Чистые помещения и технологические среды. – 2014. – №1 (53).
35. Винаров А.Ю., Кухаренко А.А., Панфилов В.И. Лабораторные и промышленные ферментеры. – М.: РХТУ, 2004. – 487 с.

- 36.Супераль- сильно низькопінний миючий засіб.[Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://novahim.com.ua/superal-sir-mojushchee-sredstvo-dlja-mytja-truboprovodov-metodom-cirkuljacii>
- 37.Каулучна сода .[Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://womo.pp.ua/4055-kaustichna-soda.html>
38. Сучасні дезінфікуючі засоби .[Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://velvis.uaprom.net/ua/p116443909-moyusche-dezinfitsiruyuschee-sredstvo.html>
39. Гембар-універсальний засіб .[Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://datonal.org/?m0prm=3&m1prm=4&showItem=25>
- 40.Хлор Ліквід-професійний засіб для дезінфекції .[Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://dom-online.com.ua/ua/p1066171325-hlor-likvid-chlorine.html>
- 41.Бланідаз 300-засіб для дезінфекції .[Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://profiplus.in.ua/ua/p77094040-blanidas-300-sredstvo.html>
42. ФИЛЬТРУЮЩИЙ МАТЕРИАЛ G3-G4-F5(M5) [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/gruboy-ochistki/klass-g4-eu4/filtr-vozdushnyj-panelnyj-fvp-fyap-vp-klass-ochistki-g2-g5-iz-himvolokna/#tabs-tehnicheskie_harakteristiki
43. Comprag FV-3710 - винтовой компрессор [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.compressortyt.ru/stanciya/kompr/vintovye/comprag/f-3710/>
44. Осушувач RDX-65 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://kms-market.com.ua/p504451339-osushitel-rdx.html>
45. Ресивер для компрессора [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://drobesfera.ru/product/resiver-dlya-kompressora-na-6000-litrov-8-bar-vertikalnyy>
46. Водяной канальный нагреватель Salda AVS 160 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.realvent.ru/catalog/ventilyaciya/teploobmenniki/vodyanye-nagrevateli/salda/avs-160-71372/>
47. Класс фильтра вентиляции тонкой очистки [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/tonkoy-ochistki/klass-f9-eu9/filtr-vozdushnyj-karmannyj-fvk-fyak-tonkoj-ochistki-f5-f9-na-lente/>
48. Фильтры для вентиляции - ЭлВент [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/filtry-absolyutnoj-ochistki/filtr_vozdushnyj_absolyutnoj_ochistki_hepa_mkr_klass_ochistki_h11_h13_h14/

49. Ферментеры из нержавеющей стали с механической мешалкой от 10 до 1000 литров и более [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-\(laboratornyie-i-promyishlennyye\)/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-\(-kitaj\)/fermenteryi-iz-nerzhaveyushhej-stali-s-mexanicheskoy-meshalkoj-ot-10-do-1000-litrov-i-bolee.html](https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-(laboratornyie-i-promyishlennyye)/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-(-kitaj)/fermenteryi-iz-nerzhaveyushhej-stali-s-mexanicheskoy-meshalkoj-ot-10-do-1000-litrov-i-bolee.html)
50. Перистальтический насос Dynamik | Logrus [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://logrus.ua/ru/peristaltic-pump-dynamik/>
51. Аппараты с механическим перемешивающим устройством [Электронный ресурс] Режим доступа: http://euromash.kiev.ua/ru/aparati_emal_mexanicheskim_perem_ustroystvom_ru.php
52. Лабораторный реактор с гомогенизатором - Тирит [Электронный ресурс] Режим доступа: https://tirit.org/reactor_him/lab_steel_gomo.php
53. Реактор-ферментер РФ-100 для биологических препаратов [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://promvit.com.ua/reactor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rabochim-obemom-100-1/>
54. ТОВ «Артмаш» - виробник обладнання [Электронный ресурс] Режим доступа: https://artmash.ua/category/dozatory?utm_source=google&utm_medium=cpc&keyword=%2B%D0%B2%D0%B0%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%B9%20%2B%D0%B4%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80&utm_campaign=%D0%B4%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80_%D1%83%D0%BA%D1%80&gclid=CjwKCAiA2O39BRBjEiwApB2IkoL7YZVDQaZBCjZ1cSRCfVLsszsHp3nzLIc2GiFSTHOFqyEJb6ny6RoCBKAQAvD_BwE
55. Реактор нержавеющей с мешалкой [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://tdredoctober.com/catalog/reactor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy/reactor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy-v0063-m3-025-m3.html>
56. Вакуумные насосы Rietschle [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.kolossal.com.ua/index.php?page=production&id=17&sid=46>
57. Ферментер - Ведущая торговая площадка B2B [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/fermentyery/promyishlennyy-fermenter-biotechno-obemom-1000-2000-1/>
58. Красінько, В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Электронный ресурс] : конспект лекцій для здобувачів освіт. ступ. "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія" ден. і заоч. форм навч. / В. О. Красінько ; Нац. ун-т харч. технол. – Київ: НУХТ – 2019. – 252 с.
59. Патент №114497. Властивості і спосіб одержання янтарної кислоти /Д.Живкович,Я.Крікен.Опубл.26.06.2017.

60. Красінько В.О. Основи екобіотехнології: Конспект лекцій для студ. Напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2011. – 143 с.
61. Аристова Н. И., Панова Э. П., Чирва В. Я. Определение янтарной кислоты в винах хроматографическими методами. Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». 2011, 24 (63): 180-184.
62. Пешкова В.М. Ферментний кондуктометричний біосенсор для визначення лактози // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 4.
63. Визначення вмісту амінного азоту [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5193901/page:15/>.