

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту (декан
факультету)

Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » червень 2021 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » червень 2021 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Одержання лимонної кислоти культивуванням *Aspergillus niger*
Виконав: здобувач IV курсу, групи 2

Вавілова Анастасія Ігорівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

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

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

Рецензент Мамчур Л.М.
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю .
Кафедра біотехнології і мікробіології .
Освітній ступінь бакалавр .
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія» .
(шифр і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнологія» .
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

_____ Пирог Т.П.

«01» квітня 2021 року

**З А В Д А Н Н Я
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

_____ Вавілової Анастасії Ігорівни _____

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання лимонної кислоти культивуванням *Aspergillus niger* _____

керівник роботи _____ Тетеріна Світлана Миколаївна, к.т.н., доцент _____ ,

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

затвердені наказом закладу вищої освіти від «30» березня 2021 року №228 кс

2. Строк подання здобувачем роботи _____ 26.05.2021 року _____ .

3. Вихідні дані до проекту (роботи) біологічний агент: *Aspergillus niger*, цільовий продукт: лимонна кислота, нормативно-технічний документ ГОСТ 31726-2012 «Кислота лимонная безводная Е330. Технические условия» _____

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема – 3 аркуши А1, Апаратурна схема – 3 аркуши А1, Схема автоматизації – 1 аркуш А3 _____

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
9	Клименко Олег Миколайович доцент, ктн., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика цільового продукту	01.04.2021- 03.04.2021	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	03.04.2021- 10.04.2021	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	10.04.2021- 17.04.2021	
4.	Біосинтез цільового продукту	17.04.2021- 25.04.2021	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми	25.04.2021- 03.05.2021	
6.	Специфікація обладнання	03.05.2021- 10.05.2021	
7.	Опис технологічної схеми виробництва	10.05.2021- 15.05.2021	
8.	Контроль виробництва	15.05.2021- 20.05.2021	
9.	Автоматизація ділянки виробництва лимонної кислоти	20.05.2021- 22.05.2021	
10.	Охорона довкілля	22.05.2021- 24.05.2021	
11.	Виконання графічної частини проекту	24.05.2021- 28.05.2021	

Здобувач _____

(підпис)

Вавілова А.І.

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____

(підпис)

Тетеріна С.М.

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічного процесу виробництва лимонної кислоти (продуцент *Aspergillus niger EB-12*) у вигляді кристалів.

Виробництво лимонної кислоти включає в себе допоміжні роботи такі, як: санітарна підготовка виробництва; основний технологічний процес в який входить: біосинтез цільового продукту, який здійснюється у ферментері об'ємом 100 м³, та підготовчі етапи для біосинтезу у ферментерах об'ємами 10 м³, 0,1 м³, 0,01 м³, 0,001 м³ та в колбах на качалці. Наступна частина роботи представлена виділенням лимонної кислоти з культуральної рідини після виробничого біосинтезу, зокрема (відділення біомаси, отримання лимонної кислоти у вигляді цитрату кальцію, відокремлення цитрату кальцію, розклад цитрату кальцію, випарювання розчину лимонної кислоти, освітлення розчину та фільтрування, концентрування, кристалізація, відділення кристалів на центрифугі, висушування кристалів) стадії фасування, пакування, маркування, відвантаження та знешкодження відходів, що наведені на технологічній та апаратурній схемах.

Кваліфікаційна робота викладена на 157 сторінках друкованого тексту, містить 19 таблиць, 2 схеми, 15 рисунків і складається з десяти розділів, списку використаної літератури (102 джерел) та графічної частини (6 креслення формату А1).

Ключові слова: *Aspergillus niger EB-12*, виробничий біосинтез, СФР (гідролізат курячого пір'я), меляса, виділення, центрифугування, випарювання, кристалізація, сушіння.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	4
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	9
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента.....	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культиву.....	12
2.2. Морфолого-культуральні ознаки біологічного агента.....	19
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	21
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	22
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	22
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	24
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	28
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	29
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту.....	33
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	33
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	35
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	37
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	37
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	38
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря.....	40
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	42
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	46
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	50
5.3. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	51
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	74
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.....	85

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.....	106
8.1. Карта постадійного контролю.....	114
8.2. Мікробіологічний контроль.....	116
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	116
8.3.1. Концентрація біомаси.....	117
8.3.2. Концентрація цільового продукту	117
8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	118
РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва.....	125
РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля.....	133
10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	133
10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	137
10.2.1. Схема знешкодження та утилізації рідких відходів.....	139
10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	139
10.2.3. Система знешкодження та утилізації газоповітряних викидів.....	143
10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів.....	145
ЛІТЕРАТУРА.....	147
ДОДАТКИ	

ВСТУП

На сьогоднішній день різні види бактерій і грибів використовують у мікробіологічній промисловості для виробництва вітамінів, антибіотиків, ферментів, гормонів, органічних кислот. У харчовій промисловості високопродуктивні штами мікроорганізмів дають можливість збільшити випуск високоякісних продуктів харчування (кисломолочних, сирів, пива), кормів для тварин (силос, кормові дріжджі) харчових добавок (лимонна кислота та ін.) [1].

Фахівці стверджують те, що лимонна кислота є, принаймні, в половині усіх харчових продуктів. Не випадково за об'ємом виробництва вона являється одним з найголовніших продуктів мікробного синтезу, і обсяг її виробництва сягає 400 тисяч тон в рік [2]. Основним споживачем виробленої таким чином лимонної кислоти є харчова промисловість. Через те, що продукти природного бродіння мають значні переваги перед хімічно синтезованими, і не містять токсичних домішок. Найголовнішим завданням у виробництві лимонної кислоти є досягнення її високого виходу [2].

Сьогочасне виробництво лимонної кислоти складне, вимагаюче спеціального обладнання та дотримання санітарно-гігієнічних нормативів. Тому на підприємствах невеликої потужності виробляють лимонну кислоту поверхневим методом культивування. Проте, при цьому немає ніякої гарантії стабільної якості отриманого продукту. Глибинний метод економічно вигідний тоді, коли потужність заводу перевищує 2500 тон лимонної кислоти в рік. Великі виробництва, як правило, забезпечують стабільно високу якість лимонної кислоти [2].

Велика кількість мікроорганізмів, включаючи гриби та бактерії, такі як: *Arthrobacter paraffinens*, *Bacillus licheniformis* та *Corynebacterium ssp.*, *Aspergillus niger*, *A. aculeatus*, *A. carbonarius*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. fonscaeus*, *A. phoenicis* та *Penicillium janthinellum*; і дріжджі, такі як:

Candida tropicalis, *C. oleophila*, *C. guilliermondii*, *C. citroformans*, *Hansenula anomala* та *Yarrowia lipolytica*, можуть бути використані для виробництва лимонної кислоти. *Aspergillus niger* – найпоширеніший продуцент для отримання лимонної кислоти завдяки його високій продуктивності, простоті та можливості використання різноманітної сировини [3].

Значне використання лимонної кислоти припадає зокрема на кондитерську галузь (29,1%). Донедавна в Україні основними постачальниками та виробниками були Смілянський цукровий завод та Харківський завод харчових кислот, який на початку 2006 року припинив випуск лимонної кислоти. Смілянський цукровий завод тривалий час залишався єдиним виробником лимонної кислоти на території України. Проте, вже у 2017 році завод постраждав від демпінгового імпорту з Китаю і збанкрутував. На сьогоднішній день вся лимонна кислота імпортується в Україну з Китаю, що значно знижує економіку країни. Саме тому, актуально відновити виробництво лимонної кислоти в Україні шляхом розробки проекту, що включає технологію мікробного синтезу консерванту для потреб кондитерської галузі.

Новизною даної роботи є використання штаму *Aspergillus niger* EB-12, (продукує 68,80 г/л), який у складі свого поживного середовища містить гідролізат кур'ячого пір'я (CFP) та патоку, при використанні яких знижується собівартість, збільшується утилізація відходів та підвищується біотехнологічний рівень виробництва. Знайдені нами дослідження [4] продемонстрували потенціал патоки, доповненої CFP, як альтернативного відносно дешевого субстрату для виробництва лимонної кислоти.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Лимонна кислота вперше була отримана з лимонного соку шведським дослідником у 1784 році. Без запаху, має натуральне або синтетичне походження. На початку 1900-х років дослідники виявили, що її можна отримати за допомогою чорної цвілі *Aspergillus niger*, який продукує лимонну кислоту у середовищах багатих на вуглеводи [5].

1.1. Хімічні властивості цільового продукту

E330 (лимонна кислота) - є трьохосновною карбоновою кислотою, має дуже низький рівень небезпеки. Солі і ефіри лимонної кислоти називають цитратами. Молекулярна формула - $C_6H_8O_7$. Виглядає як дрібні білі кристали, речовина має хорошу розчинність у воді і етиловому спирті. Проявляє слабкі властивості власне кислоти. Смак чисто кислий, не терпкий. Бере участь в обміні речовин в організмі. Безводна лимонна кислота має молекулярну масу 192,13 г/моль, щільність 1,66 г/см³ і температуру плавлення 153°C [6].

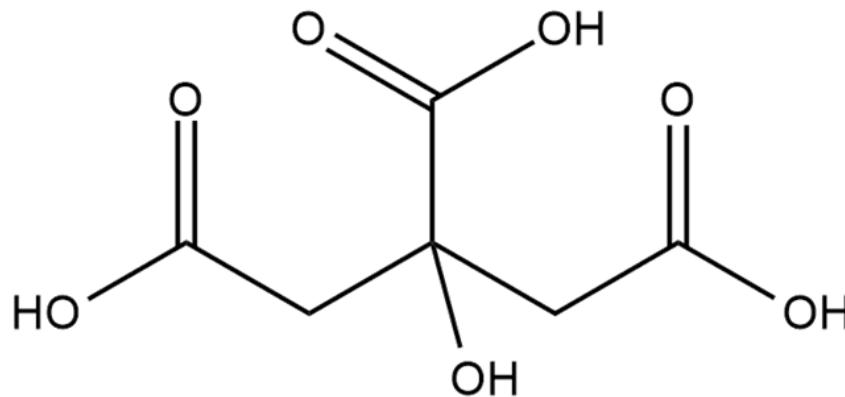


Рис. 1.1 Структурна формула лимонної кислоти [6].

					НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ		
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Вавілова А.І.				Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник	Тетеріна С.М.					9	9 149
Консультант					Кафедра БТМ		
Зав.каф.	Пирог Т.П.						

Моногідратна лимонна кислота має молекулярну масу 210,14 г/моль, щільність 1,540 г/см³ і температуру плавлення 70-75°C. Кристалізаційна вода втрачається при зберіганні та інтенсивно виділяється при температурах, що перевищують 40-50°C. При 100°C вода втрачається повністю. При температурі кристалізації 36,6°C і вище виділяється безводна лимонна кислота. При нагріванні вище 175 °C розкладається на вуглекислий газ і воду [7].

1.2. Загальні вимоги

За якістю лимонна кислота має відповідати показниками, передбаченими ГОСТ 31726-2012. Це повинні бути безбарвні кристали або білий порошок, без грудок. Для кислоти I сорту допускається жовтуватий відтінок, смак кислий, без стороннього присмаку, 2% -ний розчин кислоти в дистильованій воді повинен не мати запаху, бути прозорим і не містити механічних домішок, структура - сипка, суха, на дотик не липка, без сторонніх домішок [7].

Харчова безводна лимонна кислота нетоксична, пожежно- і вибухобезпечна. По мірі дії на організм людини лимонна кислота відповідно до ГОСТ 12.1.007 відноситься до помірно небезпечних речовин – третього класу небезпеки. При роботі з харчовою безводною лимонною кислотою необхідно використати спецодяг, засоби індивідуального захисту і дотримуватися правил особистої гігієни, передбачених відповідними інструкціями. Приміщення, в яких проводять роботи з харчовою безводною лимонною кислотою, мають бути обладнані припливно-витяжною вентиляцією. Концентрація лимонної кислоти в повітрі робочої зони не повинна перевищувати гранично допустимої норми – 1 мг/м³. Контроль повітря робочої зони проводить виробник відповідно до ГОСТ 12.1.005.

Лимонна кислота у великій фасовці повинна зберігатися у закритому приміщенні на дерев'яних стелажах чи піддонах при відносній вологості повітря не вище 70%. Гарантійний термін зберігання лимонної кислоти - 6

місяців з дня виготовлення; при упаковці в ящики з гофрованого картону з внутрішнім вкладишем з підпергаменту - 3 місяці. Для зберігання кристалічної кислоти велике значення має гігроскопічність. Під гігроскопічність розуміють властивість речовин поглинати водяну пару з повітря незалежно від характеру зв'язування ними вологи [8].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Виробництво лимонної кислоти методом ферментації за участю грибів - давно відомий біотехнологічний процес. Як продукт ферментації лимонна кислота займає друге місце за об'ємом виробництва у світі, поступаючись лише промислового спирту. Отримувати лимонну кислоту можна за допомогою грибів *Aspergillus* (*A. wamory*, *A. clavatus*, *A. fumaricas* та ін.), роду *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. luteum* та ін.) і роду *Mucor*. Також можна отримувати із *n*-парафінів за допомогою дріжджевих організмів роду *Candida* - *C. lipolytica*, *C. tropicalis*, *C. oleophilia*, *C. guilliermondii*, *C. zeylanoides*, *C. parapsilosis* [9].

Нині в якості продуценту лимонної кислоти традиційно використовують різні штами *A. niger*, які дають вихід лимонної кислоти 98 – 99 % в розрахунку на утилізовану сахарозу і яким властива підвищена осмоотолерантність (при початковому вмісті цукру в поживному середовищі близько 12 %). Синтез лимонної кислоти грибом-продуцентом здійснюється звичайно на середовищах з високою концентрацією вуглеводів (5 – 20 %), при низьких значеннях рН та при достатній аерації. Під час поверхневого культивування *A. niger* у середовищі, яке містило високу концентрацію цукру (близько 12%) було виявлено, що максимальне кислоутворення спостерігається на 5-6 добу, а максимальна інтенсивність росту міцелію спостерігається на 4-ту добу, що супроводжується активним тепловиділенням та утворенням діоксиду вуглецю [9].

У роботі [10] автори описали, що спосіб отримання лимонної кислоти включає безперервну постадійну ферментацію *Aspergillus niger* на

					НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Вавілова А.І.			РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Тетеріна С.М.					12	12 149
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.						

живильному середовищі що містить джерела вуглецю, азоту, мінеральні солі в батареї ферментаторів, підтримуючи на кожній стадії умови, необхідні для росту гриба і кислотоутворення, шляхом подачі необхідної кількості живильного середовища. Так у штама *Aspergillus niger* ВКПМ F-171 при культивуванні в умовах аерації та температурі 36°C вихід лимонної кислоти від субстрату дорівнював 93,7%, а вихід лимонної кислоти від цукру – 88,4%.

Загальну характеристику біосинтезу лимонної кислоти з використанням різних штамів гриба *Aspergillus niger*, використовуваних для одержання лимонної кислоти наведено у (табл. 2.1), у якій порівняно найкращі продуценти лимонної кислоти, а саме: *Aspergillus niger* EB-12, *Aspergillus niger* KA88 та штама *A. niger* OE55. Зокрема, найбільшу кількість лимонної кислоти синтезує *Aspergillus niger* KA88 - 138,24 г/кг, *Aspergillus niger* EB-12 – 64,40 г/л, а штама *A. niger* OE55 всього лише 34,69 г/л. Проте наведеної характеристики та концентрації продукту мало, для того щоб запевнитись у правильності вибору. Саме тому на наступному етапі вибору біологічного агента, необхідно порівняти вартість поживних середовищ, використовуваних продуцентами лимонної кислоти (табл. 2.2). Для того, щоб обрати найвигіднішого біологічного агента, розраховуємо умовну вартість 1 мг лимонної кислоти (табл. 2.3).

Таблиця 2.1

Особливості одержання лимонної кислоти за допомогою *Aspergillus niger* KA88, *Aspergillus niger* EB-12, *A. niger* OE55

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація продукту, г/л або г/кг	Особливості процесу культивування	Використана література
<i>Aspergillus niger</i> KA88	Сахароза - 525; (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 14; K ₂ PO ₄ – 17,5 MgSO ₄ × 7H ₂ O - 0,88; NaCl, 0,88; Кукурудзяні качани - 10	144	138,24	Твердофазне культивування; pH 5, 28°C	Addo M.G., Kusi A., Andoh L.A, and K. Obiri-Danso K. Citric Acid Production by <i>Aspergillus Niger</i> on a Corn Cob Solid Substrate using One-factor-at-a-time Optimisation Method. <i>International Advanced Research Journal in Science</i> .2016, 5 (4): 95-98.
<i>Aspergillus niger</i> EB-12	Меляса – 150 ; CFP(гідролізат курячого пір'я) - 4; KH ₂ PO ₄ - 0,15.	168	68,80	Глибинне культивування з дробним підживленням; pH 6, 30°C	Murat O., Esabi B. K.Citric Acid Production by <i>Aspergillus niger</i> from Agro-Industrial ByProducts. <i>Waste and Biomass Valorization</i> , 2018, doi: 10.1007/12649-018-0240

<i>A. niger</i> OE55	Меляса – 160 ; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 1; KH ₂ PO ₄ – 1; MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5; ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,000001; CuSO ₄ ×5H ₂ O – 0,000001.	144	34,69	Глибинне культивування; pH 4, 30°C	Guc S., Erkmen O., Citric Acid Production from Nontreated Beet Molasses by a Novel <i>Aspergillus niger</i> Strain. <i>J Food Microbiol Saf Hyg.</i> 2017, doi: 10.4172/2476-2059.1000122
----------------------	---	-----	-------	--	---

Продуцент *Aspergillus niger* КА88 у процесі твердофазного культивування на поживному середовищі, яке містить кукурудзяні качани (як твердий субстрат) та сахарозу, продукує 138,24 г/кг лимонної кислоти. Кукурудзяні качани, особливо після вилучення зерен, створюють ряд проблем утилізації, оскільки вони в основному не використовуються в інших процесах. Поки невелика кількість може використовуватися у виробництві сільськогосподарського гною, більшість розміщується на землях сільськогосподарських угідь та купах, де вони спалюються, спричиняючи проблеми із забрудненням, такі як забруднення землі, ґрунту та забруднення повітря. Саме тому, для фермерів особливо вигідно не скидати і не спалювати кукурудзу, забруднюючи навколишнє середовище, а збирати і відправляти її для продажу. Процес приготування кукурудзяних качанів проходив у такий спосіб: кукурудзяні качани подрібнювали і пропускали через сито сіткою 0,5 мм для отримання тонкого порошку. Після чого, висушували порошок до постійної ваги при 110°C в духовці з гарячим повітрям. Знайти ціну на приготований компонент нам не вдалося, тому обрахувати умовну та загальну вартість поживного середовища ми не можемо [11].

Саме тому, ліпшим є використання поживного середовища продуцента *Aspergillus niger* EB-12 (продукує 68,80 г/л), яке у своєму складі містить гідролізат кур'ячого пір'я (CFP) та патоку. Приготування CFP проходить таким чином: пір'я промивають деіонізованою водою та сушать у духовці при температурі 60°C. Потім нарізають на більш дрібні шматочки, які згодом припудрюють блендером і гідролізують. Пір'я складається понад з 90% білка, що складається з кератину. Кератин є джерелом цінних амінокислот і може гідролізуватися кислотою для використання мікроорганізмами. Цей дослід спрямований на доведення доцільності використання такого не традиційного субстрату для отримання лимонної кислоти, як гідролізат курячого пір'я [4].

Продуцент *A. niger* OE55 на середовищі з необробленої патоки синтезує лише 34,69 г/л лимонної кислоти [12].

Таблиця 2.2

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування
Aspergillus niger EB-12, *A. niger* OE55**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3, 4)*
<i>Aspergillus niger</i> EB-12	Меляса - 150	7	1,05	1
	K ₄ [Fe(CN) ₆](для освітлення меляси) – 0,1	150	0,015	4
	CFP – 4	2845	11,38	2
	KH ₂ PO ₄ - 0,15.	55	0.00825	3
	Вартість 1 л середовища – 12.45 грн			
<i>A. niger</i> OE55	Меляса – 160	7	1.12	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 1	24	0.024	4
	KH ₂ PO ₄ – 1	55	0.055	3
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5	6.90	0.00345	4
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O–0,000001;	36.63	0.00000003663	4
	CuSO ₄ ×5H ₂ O–0,000001.	77	0,000000077	4
	Вартість 1 л середовища – 1,20 грн			

Примітка. – Ціни наведено станом на лютий 2020 р.*

1. <https://flagma.ua/uk/>

2. <https://www.carlroth.com/com/en/>

3. <https://zhitomir.prom.ua/ua/>

4. <https://www.covalent.com.ua>

**Умовна вартість 1 г лимонної кислоти при культивуванні
Aspergillus niger EB-12, *A. niger* OE**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація лимонної кислоти г/л	Умовна вартість 1 г лимонної кислоти, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного продукту за годину, г/год
<i>Aspergillus niger</i> EB-12	12.45	68.80	0.18	168	0,41
<i>A. niger</i> OE55	1.20	34.69	0.035	144	0,24

Згідно розрахунків, ми можемо побачити значну різницю у вартості наших поживних середовищ. Проте, якщо у поживному середовищі з *Aspergillus niger* EB-12 ми не будемо купувати вже готовий гідролізат курячого пір'я, а будемо брати пір'я на птахофабриці і готувати його самі, то тоді ми можемо припустити, що вартість нашого поживного середовища буде коштувати всього 1,05 грн за 1 л. Оскільки пір'я викидаються як відходи і дуже повільно руйнуються в природі, вони можуть стати екологічною проблемою. А саме цей компонент і займає основну роль при визначенні вартості середовища. Технологія одержання гідролізат курячого пір'я відома і не надто складна. Таким чином, ми можемо створити вигідні для обох сторін умови, перетворюючи відходи на дохід.

Штам *Aspergillus niger* EB – 12 дозволяє отримати високий вихід цільового продукту (68.80 г/л), що значно вище у порівнянні з штамом *Aspergillus niger* OE55 (34.69 г/л), маючи у своєму складі мелясу (побічний продукт цукрового виробництва) та гідролізат курячого пір'я, що також сприяє підвищенню економічної ефективності. Вища вдвічі концентрація цільового продукту в культуральній рідині сприятиме також зменшенню затрат на її виділення.

Саме тому, найкращим у виробництві лимонної кислоти буде *A. niger* EB-12, оскільки цей штам дає високий вихід цільового продукту, з ним легко

працювати, а середовище для його культивування має запас для зниження вартості.

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

Морфолого-культуральні ознаки

Тіло *Aspergillus niger* складається з безбарвних, сильно розгалужених і переплетених між собою тонких ниток - гіфів, створюючих міцелій. Гіфи септовані – роздільні поперечними перегородками. Діаметр гіфів від 3 до 6 мкм (рис. 3.1) [13]. Для аспергілів характерний поверхневий ріст, при достатній аерації і суворому дотриманню асептики, вони можуть розмножуватись поверхнево на твердому і глибинно в рідкому середовищах. При поверхневому рості підносяться органи плодоносіння – конідієносці, які розвиваються на міцелії поодиночі або групами. На кінцях конідієносців з'являється перетяжка без перегородки, що виділяє «бульбашку» майбутньої голівки. Бульбашка округляється, збільшується до 400 мкм, на його поверхні зростають радіально розташовані довгасті одно- або дворядні клітки - стерігми. На вільних кінцях стерігм розміщуються ланцюжками дрібніші клітки - конідії. Клітина *A. niger* складається з оболонки (клітинної стінки) і протопласта. Клітинна стінка сформована з полісахаридів, в основному хітину, і невеликої кількості білків, ліпідів і поліфосфатів [14].

При рості на сусло – агарі вже на 5 день стає помітно чорно - забарвлену колонію діаметром – 90 мм. У радіусі 10 мм – рясне дозрівання конідій, а в іншій частині - голівки конідієносців утворюються групами, не дуже щільно. Периферична частина колонії утворює тонкий міцелій. Після 10 днів вирощування на сусло - агарі культура характеризується рясним дозріванням конідій. Конідії округлі, діаметр їх перетину 3,4- 4,6 мкм, в середньому 3,99 мкм [15].

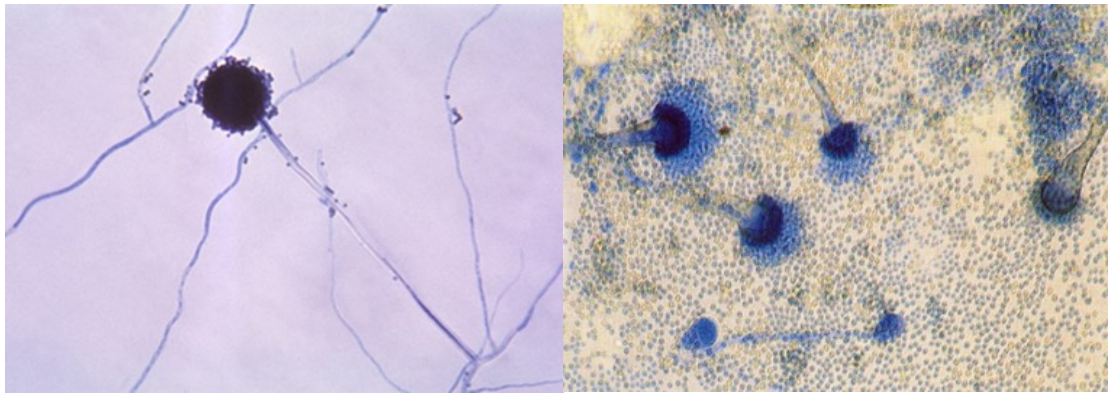


Рис. 3.1. *A. niger*: під електронним мікроскопом [12].

Фізіолого – біохімічні ознаки

A. niger є аеробом, здатним до росту і розмноження в діапазоні температури від 20 – 32 °С, оптимальна температура становить 20 - 25 °С. Культура грибка росте при рН 3.0 - 8.0 на середовищі Сабуро і Чапека. На агарі Сабуро утворюються білі пухнасті колонії, надалі зеленого або чорного кольору. На агарі Чапека – гладкі або зірчасті колонії, зеленого або чорного кольору [15].

По типу живлення – гетеротроф, поступання в клітину розчинених у воді речовин відбувається шляхом дифузії і осмосу через усю поверхню тіла і регулюється цитоплазматичною мембраною. Таким чином організм відбирає з довкілля необхідне живлення. Подібно до усіх живих організмів *A. niger* потребує звичайні органогени – вуглець, азот, кисень, водень і багато інших елементів. *A. niger* має здатність виробляти різноманітні ферменти - амілолітичні, протеази, пектиназу, ліпазу, глюкозооксидазу, хітин. Широке застосування отримала здатність до вироблення лимонної, щавлевої, глюконової, фумарової кислот. Гриб дуже чутливий до мінеральних джерел живлення, можливо використання спеціально відібрані штами для визначення дефіциту деяких елементів в ґрунті (фосфору, калію, міді та ін.) і вітамінів [13,16].

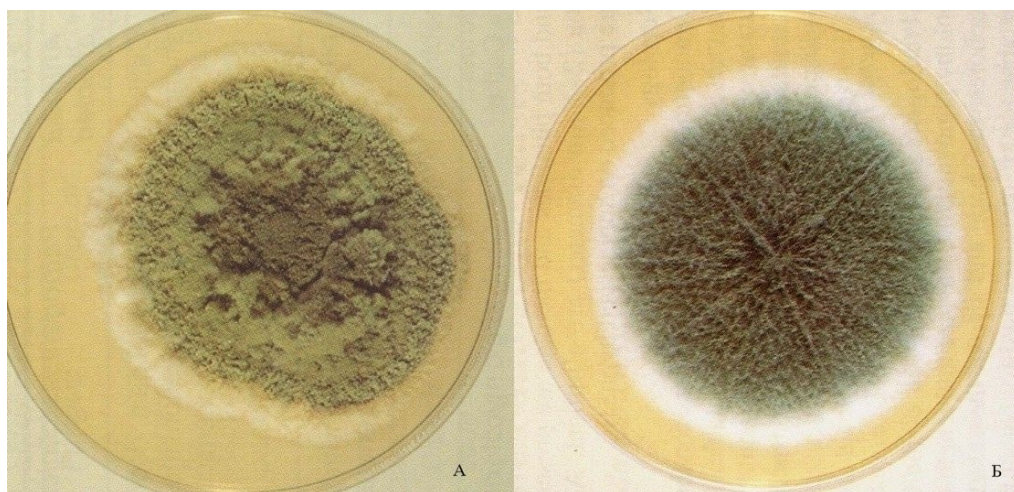


Рис. 3.2. *Aspergillus* на середовищах Чапека (А) і Сабуро (Б) [16].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента.

Філогенетична класифікація для *A. niger* наведена згідно On-line бази даних про таксономію грибів MycoBank [17].

Домен – *Eukaryote*

Відділ – *Ascomycota*

Клас – *Eurotiomycetes*

Родина – *Aspergillaceae*

Рід – *Aspergillus*

Вид – *Aspergillus niger*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Органічні харчові кислоти мають дуже велике значення в промисловостях. Їх застосовують у медицині, фармакології, косметології, ветеринарії, і, зокрема, у харчовій промисловості та кулінарії [18]. Найпопулярнішою органічною кислотою є лимонна кислота. Основне її застосування (Е330) припадає на харчову промисловість, а саме - виробництво хлібобулочних та кондитерських виробів, напоїв, желе, карамелі, в тому числі суха лимонна кислота спільно з харчовою содою – це всім відомий розпушувач тіста, що надає здобному тісту пишність і легкість. В якості фіксатора кольору, використовується у виготовленні ковбасних виробів. Лимонна кислота на 70% виконує роль підкислювача і антиоксиданту головним чином завдяки її гарній розчинності, низькому рівні токсичності, нешкідливості для оточуючого середовища та здатності змішуватись з іншими хімічними речовинами. Може також використовуватись в якості диспергуючої та подрібнюючої добавки. Має приємний смак [18].

Фармацевтична промисловість

У фармацевтичній промисловості, лимонну кислоту додають під час виробництва антикоагулянтів, котрі застосовується при переливанні крові. Використовується також для стабілізації або збереження ліків [2].

Медицина

У медицині лимонна кислота застосовується у засобах, що сприяють поліпшенню енергетичного обміну в людському організмі прискоренню метаболічних процесів, а також як дезінфікуючий засіб проти вірусів та бактерій [3]. Входить до складу багатьох препаратів лікарської властивості.

					НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ			
<i>Зн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Вавілова А.І.</i>						
<i>Керівник</i>		<i>Тетеріна С.М.</i>					22	149
<i>Консультант</i>						Кафедра БТМ		
<i>Зав.каф.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>						

В зв'язку з цим слід зазначити її якості, що приносять користь організму людини: протипухлинна дія, здатність підвищувати імунітет, очищати організм від різних видів токсинів, шлаків. Знаходиться лимонна кислота і у складі лікарських препаратів, що покращують зір [3].

Народна медицина

У народній медицині широко застосовують цю кислоту при захворюванні горла, додаючи в розчин для полоскання. Як жарознижуючий засіб, обтирають тіло бавовняною серветкою, змоченою в слабкому розчині лимонної кислоти. Для вибілювання зубів додають в зубний порошок [3].

Косметологія

У косметології ця хімічна сполука отримала широке застосування завдяки таким властивостям, як вибілювання, очищення, пом'якшення. Її додають до складу масок, кремів, що доглядають за шкірою обличчя і тіла. У початковому вигляді лимонна кислота дуже часто використовується для регулювання рН косметичних продуктів, здебільшого - засобів по догляду за шкірою. Додавання даного компонента до косметичної формулою робить продукт більш кислим, що оптимізує його функції, а також додатково консервує засіб. Однак це далеко не єдина функція даного інгредієнта, хоча і найбільш важлива. Використовується в продуктах по догляду за шкірою, які призначені для ексфоціації (відлущування) шкіри обличчя. При нанесенні на шкіру в досить концентрованої дозі, лимонна кислота руйнує білкові зв'язки між «мертвими» і «живими» клітинами епідермісу, в результаті чого старі, мертві клітини легко видаляються, залишаючи шкіру чистою гладкою і сяючою [13].

В очищуючих засобах, шампунів і мила, лимонна кислота додається таким чином, щоб вони легко пінилися. Лимонна кислота також має вирішальне значення в забезпеченні бажаних результатів фарбування: вона гарантує необхідну насиченість кольору як компонент багатьох фарб для волосся. На додаток до перерахованих властивостей лимонної кислоти в чистому вигляді, цей інгредієнт використовується у виробництві косметики в

з'єднанні з мінералами - в цьому виді вона проявляється в абсолютно несподіваних і часом суперечливих «ролях» [13].

Також використовується: у **металургійній промисловості** для процесів травлення міді і як засіб для видалення окалини, іржі ; у **текстильній промисловості** - застосовується поряд з оцтовою кислотою в процесі фарбування тканин, виступаючи в якості фіксатора; для **промислових і побутових потреб**, як засіб для очищення труб від нальоту та іржі; у **виробництві препаратів побутової хімії** входить до складу багатьох засобів для чищення [19].

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Донедавна в Україні основними постачальниками та виробниками були Смілянський цукровий завод, який використовував, як побічний продукт виробництва – мелясу, в якості сировини, та Харківський завод харчових кислот, який на початку 2006 року припинив випуск лимонної кислоти. Смілянський цукровий завод тривалий час залишався єдиним виробником лимонної кислоти на території України. У 2007 році завод виробив 2,2 тис. тон цукру, 423 тонн лимонної кислоти, а також 1 тис. тонн меляси. Проте, вже у 2017 році завод постраждав від демпінгового імпорту з Китаю і збанкрутував [20].

Щорічний імпорт в Україну лимонної кислоти становить 8-10 тис тон. Основним постачальником є Китай, який виробляє лимонну кислоту використовуючи у якості сировини зерно, значну частку якого імпортує з України. Таким чином основна додана вартість імпортованої в Україну лимонної кислоти формується в Китаї, що досить негативно впливає на економічну ситуацію в країні. Тому на даний час є доцільним відновлення власного виробництва лимонної кислоти, оскільки в Україні наявні для цього усі ресурси [21].

Як було сказано раніше основне застосування лимонної кислоти припадає на харчову промисловість, а саме – кондитерську (29,1%). У кондитерській промисловості лимонна кислота використовується як

підкислювач і підсилювач смаку, а також відіграє роль антиоксиданту. Може також використовуватись в якості диспергуючої та подрібнюючої добавки. Має приємний смак. Зокрема частка лимонної кислоти міститься у карамелі - 3,44%; драже - 2,1%; пастило-мармеладні вироби - 3,69%; глазуrowані цукерки -0,4%; вафлі - 2,5%; ірис - 0,74%; солодоші, печиво - 0,10%. Середня витрата лимонної кислоти на 1 т кондитерських виробів складає 1,25 кг [22].

За даними Державної статистики [23] кондитерське виробництво є одним з найбільших (за обсягами випуску продукції) сегментів харчової промисловості, що виготовляє кондитерські вироби на спеціалізованих фабриках. Українці стали витрачати на їжу майже вдвічі більше, ніж п'ять років тому – витрати на продовольство виросли на 75%. При цьому 12% всього бюджету віддають за солодоші. Останні декілька років ринок кондитерських виробів в Україні активно розвивається. До 2014 р. більше 70% ринку було сконцентровано у дев'ятьох компаній: Roshen, Konti Group, АВК, Бісквіт-Шоколад (Харків), Житомирські ласощі, Mondelez Україна («Корона»), Полтава кондитер, Nestle («Світоч»). У 2014 р. унаслідок військових дій на сході України відбувся переділ ринку: зменшили частку участі компанії Konti і АВК, значне поширення на ринку здійснила компанія Roshen. Отже, нині перелічені вище компанії контролюють дві третини всього ринку України і три чверті експорту [23].

На сьогоднішній день корпорація «Рошен» займає лідируючу позицію серед кондитерських виробників України. За результатами рейтингу Global Top-100 Candy Companies – 2018 вона увійшла до ТОП-30 кращих виробників кондитерської продукції світу [24]. Roshen виробляє понад 320 найменувань високоякісних кондитерських виробів. В асортимент корпорації входять шоколадні та желейні цукерки, карамель, ірис, шоколадні плитки та батончики, печиво, вафлі, бісквітні рулети, тістечка та торти. Деякі з них не мають аналогів на ринку України. Загальний обсяг виробництва продукції сягає близько 300 тисяч тон на рік [24].

Оскільки до складу корпорації «Рошен» входить Крижопільський цукровий завод і Смілянський цукровий завод, які мають значний обсяг виробництва цукру. Сьогодні Крижопільський цукровий завод є одним із найпотужніших цукрових заводів України із потужністю переробки 8 тисяч тон буряків за добу. Загалом упродовж 2011-2016 років Крижопільська цукроварня виробила 384 тис. тон цукру [25]. У 2019 р. за результатами виробничого сезону завод переробив 740 тис. т цукрового буряка, виготовив 117,2 тис. тон цукру, і посів 1 місце за кількістю виробленого цукру серед цукрових заводів України [26]. Під час переробки, крім основної продукції – цукру, із буряків отримується також меляса і жом. Саме тому корпорація повністю забезпечує себе цукром.

Отже, можна припустити, що керівник Roshen може зацікавити пропозиція забезпечення власної потреби лимонною кислотою за рахунок впровадження цеху по виробництві лимонної кислоти на одному із зазначених заводів.

Синтез здійснюється за допомогою штаму *Aspergillus niger* EB-12. Обраний штам дозволяє отримати високий вихід цільового продукту (68.80 г/л), маючи у складі поживного середовища мелясу та гідролізат курячого пір'я, що сприяє підвищенню економічної ефективності [27].

Середовище для культивування *Aspergillus niger* EB-12:

Меляса – 150 г/л

CFP (гідролізат курячого пір'я) – 4 г/л

K_2HPO_4 – 0,15 г/л

Основним компонентом поживного середовища є меляса(побічний продукт бурякоцукрового виробництва). Склад якої залежить від різновиду цукрових буряків, технології виробництва цукру, умов зберігання та транспортування (виду транспорту, температури) [28].

Крім того, слід зазначити, що значне формування вартості поживного середовища формує гідролізат курячого пір'я, який є доволі дорогавартісним на ринку і виготовляється лише закордоном. Відомо, що заводи з переробки

птиці щорічно переробляють мільйон тон курячого пір'я у вигляді біоорганічних відходів(сировини), створюючи ряд екологічних проблем. Пір'я займають до 10% від загальної ваги курки та містять у своєму складі білки (90%). Одним із них є кератин, який є джерелом цінних амінокислот, і відходи його можуть гідролізуватись за допомогою кислотного або ферментативного гідролізу для використання мікроорганізмами. Відома технологія приготування гідролізату: пір'я подрібнюють та гідролізують сечовиною при надлишковому тиску [27]. Тому в майбутній перспективі можливо підвищити економічну доцільність запропонованого виробництва за рахунок власного отримання гідролізату з курячого пір'я. Відомою птахофабрикою для постачання пір'я є «Вінницька птахофабрика», що входить у структуру агроіндустріального холдингу МХП і знаходиться у Вінницькій обл., м. Ладжин. Станом на початок 2019 року підприємство виробляє близько 31,2 тис т готової продукції щомісяця, або 374,4 тис т на рік [29].

Ефективне використання залишків та гідроліз для отримання лимонної кислоти мікроорганізмами має ряд переваг: збільшення доходу, утилізація відходів та підвищення біотехнологічного рівня виробництва [27].

Спираючись на дані, які було вказано вище, що корпорація «Рошен» виготовляє 300000 т кондитерських виробів в рік, проте відсотковий вміст лимонної кислоти в них буде різний, тому припустимо, що лимонна кислота буде використовуватися у 20% продукції.

$$1 \text{ т} - 1,25 \text{ кг} \qquad X = 75000 \text{ кг лимонної кислоти}$$

$$60000 \text{ т} - X$$

Така кількість необхідна для забезпечення річної потреби «Рошен» у лимонній кислоті. Кількість культуральної рідини для отримання 75000 кг лимонної кислоти:

$$68,80 \text{ г} - 1 \text{ л}$$

$$75000000 \text{ г} - x \qquad X = 1090116,28 \text{ л культуральної рідини}$$

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

$V_{\text{гп}} = 1090116,28 / (1 - (0,3 + 0,1)) = 1816860,5$ л. Для отримання такої кількості культуральної рідини необхідно меляси:

150 г – 1 л

$X - 1816860,5$ $X = 272529075$ г або близько 272,5 т

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для забезпечення цеху лимонною кислотою, потрібно одержати 1816,9 м³ культуральної рідини. Розрахуємо скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 330, тоді кількість продукту на добу ($V_{\text{д}}$) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{гп}} / \text{Трд} = 1816,9 / 330 = 5,5 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл ($V_{\text{кр}}$) буде становити:

$$V_{\text{кр}} = (K_1 * V_{\text{д}} * T_{\text{цф}}) / 24 = 1,1 * 5,5 * 178 / 24 = 45 \text{ м}^3 / \text{цикл}$$

$T_{\text{цф}}$ — цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (168 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год), K_1 — коефіцієнт запасу, що враховує нестерильність операцій ($K_1 = 1,1$ — 1,5).

Підготовка ферментатора включає: миття та огляд (2 год), перевірка та герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Геометричний об'єм ферментера:

$V_{\text{г}} = V_{\text{цк}} / K_{\text{зап}} = 45 / 0,5 = 90 \text{ м}^3$, приймаємо найближчий за об'ємом ферментер = 100 м³ де коефіцієнт заповнення — 0,5. Для уточнення коефіцієнта заповнення: $K_{\text{зф}} = V_{\text{цк}} / K_{\text{зап}} = 45 / 100 = 0,45$, що не перевищує заданого значення.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 45 \text{ м}^3$. При одержанні культуральної рідини необхідно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10-15%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом для одного ферментера буде становити:

$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-E_f) = 45/(1-0,1) = 50 \text{ м}^3$, де E_f – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері робочий об'єм якого: $V_{роб.1} = 50 \text{ м}^3$. При вибраному коефіцієнті заповнення 0,5, розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера (V_f), що становить:

$V_f = V_{роб.1}/K_{зап} = 50/0,5 = 100 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий коефіцієнт заповнення : $K_{зап1} = V_{роб.1}/V_{сф} = 50/100 = 0,5$. Цей коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища . Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+X_f) = 50/(1+0,1) = 45,45 \text{ м}^3$, де $X_f = 0,1$ доза посівного матеріалу для ферментера. Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 50 - 45,45 = 4,54 \text{ м}^3 .$$

Для одержання 4,54 м³ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становляться від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становити: $V_{роб.2} = V_{пм1}/(1-E_{па}) = 4,54/(1-0,1) = 5 \text{ м}^3$.

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища . Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити: $V_{пс2} = V_{роб.2}/(1+X_{па}) = 5/(1+0,1) = 4,54 \text{ м}^3$, де $X_{па} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 5 - 4,54 = 0,46 \text{ м}^3.$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.2}} = 5 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування *Aspergillus niger* EB-12 у посівному апараті геометричний об'єм якого $V_{\text{па2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 5 / 0,5 = 10 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення: $K_{\text{з1}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф}} = 5 / 10 = 0,5$

Для одержання $0,46 \text{ м}^3$ посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10% до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 0,46 / (1 - 0,10) = 0,5 \text{ м}^3 \text{ або } 500 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становиться 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 500 / (1 + 0,1) = 454,5 \text{ л, де } X_{\text{ін}} = 0,1 \text{ – доза посівного матеріалу для інокулятора.}$$

Кількість посівного матеріала для інокулятора становить: $V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 500 - 454,5 = 45,45 \text{ л.}$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.3}} = 0,5 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування *Aspergillus niger* EB-12 у посівному апараті геометричний об'єм якого $V_{\text{ін3}} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап}} = 500 / 0,5 = 1000 \text{ л або } 1 \text{ м}^3$, уточнюємо коефіцієнт заповнення

$$K_{\text{з1}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сф}} = 500 / 1000 = 0,5$$

Для одержання $45,45 \text{ л}$ посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10% до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в малому інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 45,45 / (1 - 0,10) = 50,5 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для малого інокулятора становить 10% від об'єму поживного середовища в малому інокуляторі. Тоді кількість

поживного середовища буде становити: $V_{пс4} = V_{роб.4} / (1 + X_{ін}) = 50,5 / (1 + 0,1) = 45,9$ л, де $X_{ін} = 0,10$ – доза посівного матеріалу для інокулятора. Кількість посівного матеріалу становить: $V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 50,5 - 45,9 = 4,59$ л.

Кількість інокуляту $V_{роб.4} = 50,5$ можна одержати під час культивування *Aspergillus niger* EB-12 у посівному апараті геометричний об'єм якого $V_{ін4} = V_{роб.4} / K_{зап} = 50,5 / 0,5 = 100$ л або 0,1 м³, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення: $K_{з1} = V_{роб.4} / V_{сф} = 50,5 / 100 = 0,505$

Для одержання 4,59 л посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10% до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в малому інокуляторі становитиме: $V_{роб.5} = V_{пм4} / (1 - E_{ін}) = 4,59 / (1 - 0,10) = 5,1$ л. Кількість посівного матеріалу для малого інокулятора становить 10% від об'єму поживного середовища в малому інокуляторі. Тоді кількість поживного середовища буде становити:

$V_{пс5} = V_{роб.5} / (1 + X_{ін}) = 5,1 / (1 + 0,1) = 4,63$ л, де $X_{ін} = 0,10$ – доза посівного матеріалу для інокулятора. Кількість посівного матеріалу становить:

$V_{пм5} = V_{роб.5} - V_{пс5} = 5,1 - 4,63 = 0,46$ л або 460 мл. Кількість інокуляту $V_{роб.5} = 5,1$ можна одержати під час культивування *Aspergillus niger* EB-12 у посівному апараті геометричний об'єм якого $V_{ін5} = V_{роб.5} / K_{зап} = 5,1 / 0,5 = 10,2$ або приблизно 10 л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення: $K_{з5} = V_{роб.5} / V_{сф} = 5,1 / 10 = 0,51$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{пм5} = 460$ мл можна одержати під час культивування *Aspergillus niger* EB-12 у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення 0,2. Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$N_{колб} = V_{пм5} / (V_{колб} \times K_{зк}) = 460 / (750 \times 0,2) = 3,06$. Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 качалочні колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу лимонної кислоти у одному ферментері об'ємом 100 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5 буде проходити у 5 етапи.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

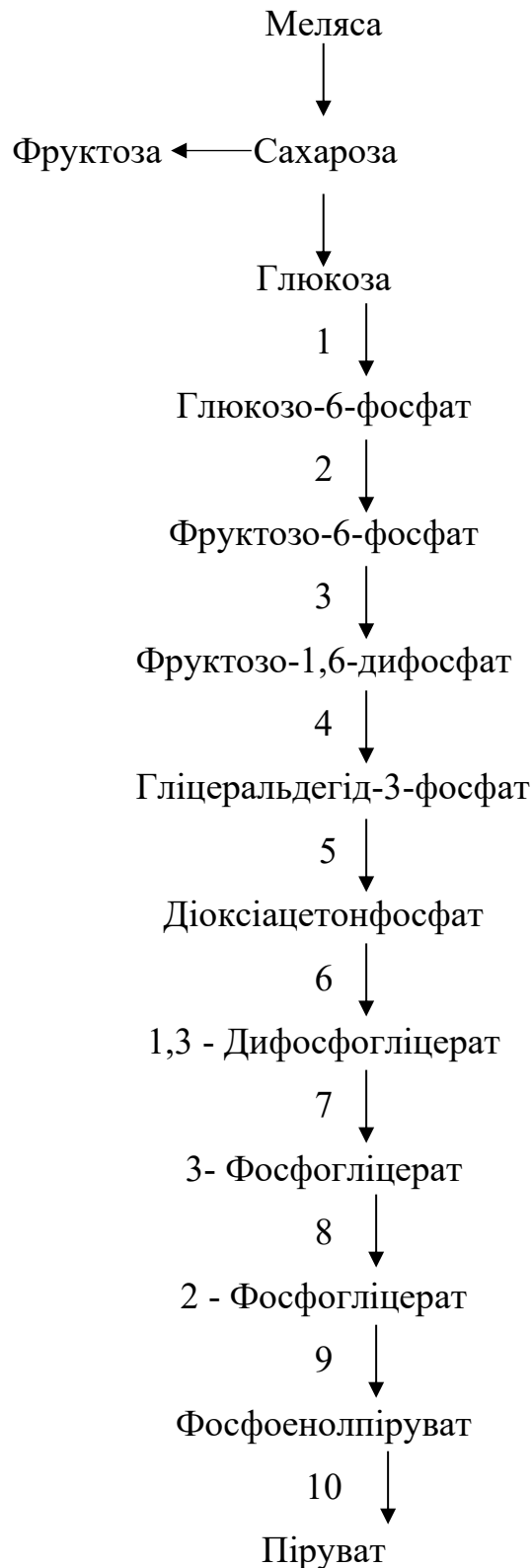
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Aspergillus niger EB-12 як джерело вуглецю може використовувати мелясу. Згідно літературних даних [30] за умов росту на мелясі у мікроорганізми *Aspergillus niger* функціонує гліколітичний і пентозофосфатний шлях. Найбільш важливіший – гліколітичний шлях (Рис. 4.1), його вклад становить 80%. Шлях метаболізму *Aspergillus niger* EB-12 наведено згідно даних Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [22].

Хімічний склад патоки на 50% - це розчинні цукри – переважно сахароза, а також в невеликій кількості – фруктоза та глюкоза. Саме тому, першим кроком буде розпад нашого субстрату до сахарози, яка в свою чергу розпадається на фруктозу та глюкозу.

Глюкоза за участю глюкокінази (КФ 2.7.1.1) перетворюється на глюкозу 6-фосфат, де вона за дії глюкозо-6-фосфат ізомераз (КФ 5.3.1.9) перетворюється на фруктозу-6-фосфат. Фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11) перетворює фруктозо-6-фосфат у фруктозо-1,6-дифосфат. Фруктозодифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13) зумовлює перетворення фруктозо-1,6-дифосфат на гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат, який під дією триозофосфатізомераз (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід 3-фосфат. Гліцеральдегід-3-фосфат, під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) перетворюється на 1,3 - дифосфогліцерат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у 3-фосфогліцерат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на 3-фосфогліцерат індукує його перетворення на 2-фосфогліцерат. 2-фосфогліцерат під дією енолази (КФ 4.2.1.11) переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40) [31].

					НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.	Літ.	Арк.	Акрушіє
Розроб.		Вавілова А.І.						
Керівник		Тетеріна С.М.					33	149
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.						



*Рис. 4.1 Шлях катаболізму меляси у *Aspergillus niger* EB-12 [22].*

Ферменти: 1 – глюкокіназа(КФ.2.7.1.1); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 3 – фосфоглюкокіназа (КФ.2.7.1.11); 4-фруктозодифосфатальдолаза(КФ.4.1.2.13); 5 - триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1.)6 - гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа(КФ.1.2.1.12);

7 - фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 8 – фосфогліцератфосфомутаза (КФ.5.4.2.12); 9 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40) [

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *Aspergillus niger* EB-12 з використанням меляси як джерела вуглецю, при функціонуванні гліколізу глюкоза перетворюється на піруват. Процеси перетворення глюкози на гліцеральдегід-3-фосфат пов'язане з витратами енергії. Під час подальшого окиснення гліцеральдегід-3-фосфату до пірувату енергія вивільнюється. Далі піруват окиснює фермент піруват:фередоксин-окидоредуктаза з утворенням ацетил-КоА, який далі залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК). Ацетил-КоА вводиться у цикл в результаті цитрат-синтазної реакції, в якій оксалоацетат і ацетил-КоА конденсуються з утворенням цитрату (лимонна кислота). Цей етап у ЦТК каталізується ферментом цитратсинтазою. Далі під дією фермента аконітатгідратази відбувається зворотне взаємоперетворення трьох трикарбонових кислот. Фермент ізоцитратдегідрогеназа каталізує реакції перетворення ізоцитрату на 2-оксоглутарат. Під дією 2-оксоглутаратдегідрогенази з 2 – оксоглутарату утворюється сукциніл-КоА, який перетворюється на сукцинат за участю сукцинаттіокінази. Далі відбувається окиснення сукцинату до фумарату за допомогою ферменту сукцинатдегідрогенази. На наступному етапі циклу фермент фумараза приєднує до фумарата воду з утворенням малату. Та за допомогою малатдегідрогенази відбувається дегідрування малату до оксалоацетату [31]. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт наведена на *рисунку 5.1.*

Анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення втрат інтермедіатів ЦТК, при рості на мелясі є [31]:

1. Карбоксилювання фосфоенолпірувату з утворенням оксалоацетату (фермент фосфоенолпіруваткарбоксилаза)
2. Карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату (фермент піруваткарбоксилаза)

3. Карбоксилювання пірувату з утворенням малату (фермент малатдегідрогеназа декарбоксилювальна).

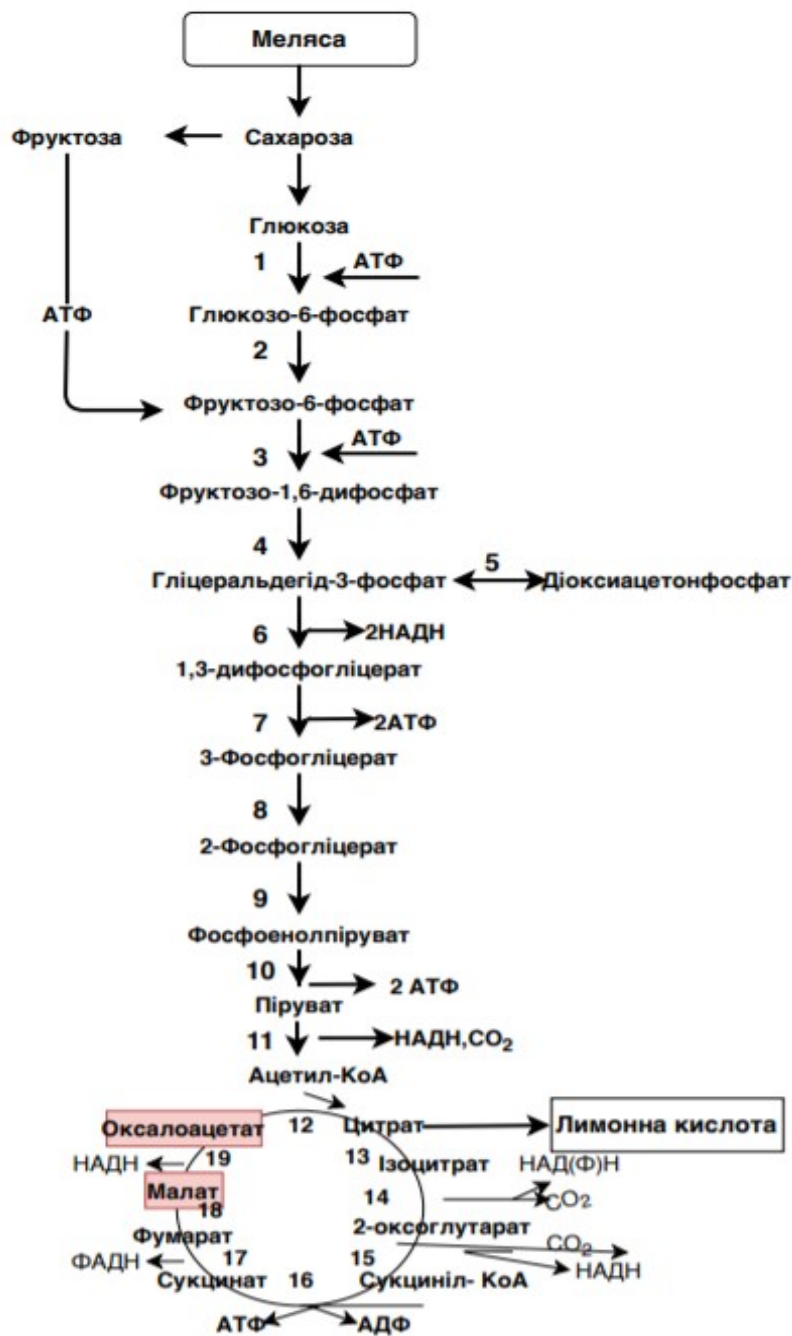


Рис. 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у лимонну кислоту [22].
 Ферменти: 11 - піруватдегідрогеназа; 12 – цитрат синтаза (КФ 2.3.3.1); 13 – аконітатгідратаза (КФ4.2.1.3); 14 – ізоцитдегідрогеназа(КФ 4.1.3.1); 15 – 2 - оксоглутаратдегідрогеназа (КФ 2.3.3.9); 16 – сукцинаттіокіназа (КФ1.1.1.42); 17 - сукцинатдегідрогеназа (КФ2.8.3.18); 18 – фумараза (КФ 4.2.1.2); 18 - малатдегідрогеназа (КФ 1.1.5.4);

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Для культивування *Aspergillus niger* EB-12 оптимальне значення рН = 6. При цих значеннях рН синтезується лимонна кислота. При відносно високих значеннях рН (вище 6,5) поряд з лимонною кислотою інтенсивно синтезується і щавлева кислота, а при рН = 5,0 ÷ 5,5 спостерігається тенденція до утворення глюконової кислоти [32].

Aspergillus niger EB-12 є аеробом, тому постачання кисню має значний вплив на виробничий процес лимонної кислоти. Аерація має відбуватися протягом всього ферментаційного процесу з однаковою інтенсивністю. Протягом всього процесу ферментації необхідно підтримувати оптимальну температуру. Вища за оптимальну температура призводить до денатурації ферментів, надмірної втрати вологи, пригнічує ріст продуцента, тоді як низька температура призводить до зниження метаболічної активності. *Aspergillus niger* EB-12, є мезофілом, тому температурний діапазон росту 25-35°C, а оптимальна температура 32°C [33,34].

Для *Aspergillus niger* характерний поверхневий ріст, при достатній аерації і суворому дотриманню асептики, вони можуть розмножуватись поверхнево на твердому і глибинно в рідкому середовищах [35]. Процесу глибинного культивування на сьогоднішній день надають значну увагу. Саме тому, що ферментація проходить у асептичних умовах та швидкість ферментації є високою – в одному апараті (біореакторі) одразу утворюється велика кількість культуральної рідини. Також такий спосіб виробництва лимонної кислоти має ряд суттєвих переваг: він ефективніший, легко піддається механізації та автоматизації.

					НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Вавілова А.І.			РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Тетеріна С.М.					37	149
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.						

Низьке значення рН під час ферментації та сама лимонна кислота спричиняють корозію, тому внутрішня частина біореактора виготовляється з матеріалу, стійкого до корозії. Важливою умовою у виборі біореактора для виробництва лимонної кислоти є забезпечення системою аерації, що здатна підтримувати високий рівень розчинного кисню [33,35].

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Як було вказано на початку, для культивування біологічного агента оптимальною температурою є 32°C, а значення рН = 6. *Aspergillus niger* EB-12 – це міцеліальний гриб, тому правильність вибору ферментера відіграє важливу роль, адже пошкодження міцелію призводить до зниження синтезу лимонної кислоти. У біотехнології найчастіше використовують біореактори з механічним перемішуванням, оскільки вони дають змогу легко змінювати технологічні умови й ефективно постачати клітинам повітря, що визначає характер розвитку мікроорганізму та його біосинтетичну здатність. У таких реакторах повітря подають у культуральне середовище під тиском через барботер. При цьому утворюються дрібні бульбашки повітря і за рахунок механічного перемішування забезпечується їх рівномірний розподіл. Для підвищення ефективності розподілу використовують мішалки – одну або кілька. Мішалки розбивають великі бульбашки повітря, разносять їх по всьому реактору і збільшують час перебування в культуральному середовищі. Ефективність розподілу повітря залежить від типу мішалки, кількості обертів, фізико-хімічних властивостей середовища [36]. З усіх конструкцій мішалок найчастіше використовують мішалки лопатеві, дисконтові та турбінні [37]. Лопатеві та дисконтові мішалки відрізняються простотою конструкції та забезпечують задовільне перемішування рідини з помірною в'язкістю. Турбінна мішалка служить для ефективного перемішування рідини зі значною в'язкістю (в нашому випадку меляса). З усіх типів мішалок перевага надається саме турбінним, оскільки вони забезпечують ефективне диспергування повітря при найбільшому ступені турбулізації [37].

Мотроненко В.В. [38] зазначає, що перемішування відіграє дуже важливу роль в біосинтезі грибів роду *Aspergillus*. Для забезпечення максимального виходу кінцевої продукції необхідно підібрати режим перемішування таким чином, щоб до клітин мікроорганізму надходили, в необхідній кількості, поживні речовини і кисень при збереженні його високої життєздатності. Особливо гостро дане питання постає при глибинному культивуванні міцеліальних грибів, так як підібрати оптимальний режим для їх культивування дуже складно враховуючи їх морфологічну будову, а саме розгалуженість міцелію. Механічне перемішування, за допомогою турбінних мішалок, і безперервна аерація створюють сприятливі умови для доступу поживних речовин і кисню до всіх клітин міцелію, забезпечуючи однаково сприятливі умови для росту і накопичення продуктів метаболізму. В умовах глибинного культивування і механічного перемішування міцелій фрагментується на відносно невеликі сегменти, які не втрачають здатність до розмноження і накопичення біомаси [38].

З усього сказаного вище видно, що при культивуванні міцеліальних грибів важливу роль відіграє інтенсивність механічного перемішування та тип мішалки. Процес біосинтезу лимонної кислоти буде проходити у ферментері механічного перемішування, який оснащений турбінною мішалкою. Одним із важливих етапів біосинтезу також є підготовка та стерилізація піногасника. В зв'язку з тим, що виробничий процес проходить за постачання кисню - відбувається піноутворення, тому необхідним є застосування піногасника (механічні: жирові і синтетичні; хімічні) [32,36,38].

Максимальний синтез лимонної кислоти (68,80 г/л) продуцентом *Aspergillus niger* EB-12 на середовищі складом (г/л):

Меяса – 150 г/л;

CFP(гідролізат курячого пір'я) - 4 г/л;

KH₂PO₄ - 0,15 г/л;

Концентрація меяси в поживному середовищі становить 150 г/л, що є достатньо високою. Така кількість джерела вуглецю не може вноситись

одразу, оскільки вона буде інгібувати ріст продуцента. Тому спочатку у середовище вносимо 60 г/л меляси, а решта (90 г/л) – дробно, певними порціями у процесі культивування.

Розрахунок підживлення

Тривалість культивування становить 168 годин. На початку культивування вноситься перша порція - 60 г/л. Оскільки об'єм поживного середовища становить 40910 л, тоді кількість меляси буде становити: $60 \times 40910 = 2454600$ г або 2455 кг меляси. Через 48 годин культивування [13] здійснюють підживлення розчину меляси порційно, кожні 24 години, загальна кількість розчину підживлення - 90 г/л. Тому необхідно $90 \times 40910 = 3681900$ г або 3682 кг меляси на заданий об'єм середовища. Кількість порцій підживлення: $120/24 = 5$. З однієї порції в середовище повинно вноситись $90/5 = 18$ г. Тобто $18 \text{ г} \times 40910 = 736380$ г або 736,380 кг меляси.

Для культивування *A. niger* EB-12 з метою виробництва лимонної кислоти використовують глибинний метод культивування з підживленням, що відбувається в стерильних умовах при постійній аерації середовища. Для забезпечення асептичних умов, які підвищують ефективність культивування, необхідно використовувати стерильне обладнання, стерильне поживне середовище, очищене аераційне повітря та чисту культуру, як посівний матеріал. Стороння мікрофлора недопустима, оскільки в результаті контамінації відбувається пригнічення процесів синтезу лимонної кислоти [36].

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Як було вказано раніше, постачання кисню має вплив на виробництво лимонної кислоти і має відбуватися протягом усієї ферментації. Також необхідною умовою для вирощування продуцента лимонної кислоти є асептичність, тому, повітря, що подається на аерацію, має бути стерильне [37]. Забір атмосферного повітря здійснюється на висоті двох метрів над рівнем даху будівлі. Оскільки висота виробничого ферментеру об'ємом 100 м³ становить 13 м, враховуючи коефіцієнт запасу можемо припустити, що висота

будівлі становитиме близько 16 м (14 м – висота стін, 0,5 м фундамент, 1,5 м – дах), атмосферне повітря відбирається на висоті 18 м. Навіть незначна кількість сторонньої мікрофлори в повітрі може призвести до контамінації поживного середовища та різкого зниження синтезу продукту. Споживання повітря досягає 80 м³/год. У повітрі є пил з концентрацією 5-100 мг/м³, що складає 106-108 твердих частинок розміром 5-150 мкм. Мікроорганізми осаджуються на пилу або знаходяться у вільному стані [38].

Для стерилізації повітря використовують два методи: знищення мікрофлори за допомогою нагрівання або іонізуючого випромінювання, наприклад, за допомогою УФ-опромінювання, та вилучення її методом фільтрування. Перший метод є більш надійним та ефективним, але для промислових масштабів є неприйнятним, оскільки у виробничих умовах витрачають занадто великі об'єми повітря, щоб можна було б говорити про економічну доцільність таких рішень. В промислових умовах використовують в основному метод фільтрування крізь шари насипного, пористого або волокнистого матеріалу [37].

Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізують за допомогою фільтрів грубої очистки, тонкої очистки та індивідуальних фільтрів [36,38].

Фільтр грубої очистки має ефективність фільтрації від 65% до 90%, використовується в якості першого ступеня очищення та призначений для затримки великих механічних частинок розміром більше 5 мкм. Основними вимогами до фільтрувальних волокон є висока пилоємність і здатність до ефективного функціонування за малих перепадів тиску до і після фільтра [5,7].

В якості фільтра грубої очистки використовуємо фільтр F 0010 DF, він має високу пропускну здатність - 1170 л/хв та має у своїй конструкції керамічний картридж на якому осідають мікрочастинки, які потім видаляються через конденсатовідвідник. Керамічний матеріал картриджа сприяє довготривалому використанню фільтра [39,40].

Фільтр тонкої очистки повітря використовують у якості другого ступеня очищення, він призначений для затримки мікрочастинок розміром 0,01 мкм. В якості фільтра тонкої очистки використовуємо фільтр ОМІ 04А.0180 потужністю 3000 л/хв, що сприяє високоефективному фільтруванню [40].

Індивідуальні фільтри встановлюються безпосередньо перед кожним ферментером, вони забезпечують видаленню залишкової кількості контамінантів [38]. В якості індивідуальних фільтрів використовуємо Ultradepth II P-SRF, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 % [41].

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Санітарна підготовка приміщень — один з найважливіших заходів щодо забезпечення чистоти. Ціль такої обробки — зведення до мінімуму механічних і мікробних забруднень. Дезінфекція поверхонь приводиться, як правило, до зниження мікроорганізмів на 40—60% від їхнього вихідного вмісту [42]. В харчовій промисловості очищення та дезінфекція є важливою частиною виробничого циклу. Ці дії можуть мати руйнівні наслідки, якщо не будуть виконані належним чином. Саме вони є базою для гарантії безпеки кінцевого харчового продукту [42].

Вид миючого засобу визначає його склад і його здатність справлятися з різними типами забруднення, тому в першу чергу потрібно звернути увагу на те, який тип забруднення потрібно видалити - органічне (жири, рослинні масла, кров і т.п.) або неорганічне (вапно, іржа, молочний камінь і т.п.).

З органікою найкраще справляються:

Засоби на основі каустичного лугу. Основна складова подібної побутової хімії - це гідроксид натрію, з додаванням поверхнево-активних речовин, ароматизаторів і барвників. Використовувати подібні засоби варто вкрай обережно, надягаючи захисні рукавички та в окремих випадках побутовий респіратор.

Для боротьби з неорганічними забрудненнями підійдуть:

Кислотні засоби. Основним миючим елементом в їх складі є фосфорна кислота, яка при змішуванні з хлорвмісними речовинами утворює небезпечний для здоров'я газоподібний хлор. Тому, перед тим як використовувати кілька засобів одночасно, необхідно перевіряти склад кожної упаковки

Універсальним варіантом є **нейтральні миючі засоби.** Являють собою суміш поверхнево-активних речовин універсального використання. Вони безпечніші для здоров'я людини та в залежності від склад подібного засобу, зможуть впоратися з будь-яким типом забруднення [43].

Варто зазначити, що основними критеріями вибору миючих засобів є їх ціна, миюча здатність та безпечність для використання, оскільки більшість використовуваних синтетичних миючих засобів містять небезпечні речовини, які негативно впливають на здоров'я споживачів та навколишнє середовище. Їх небезпека полягає у важкому вимиванні небезпечних сполук та поганій біологічній розкладності [44,45].

На будь-якому виробництві не допускається тривале застосування одного дезінфікуючого засобу, оскільки це може призвести до утворення резистентних штамів мікроорганізмів, тому слід періодично комбінувати дезінфікуючі засоби. Рекомендують дезінфікуючий засіб змінювати кожні 10 – 14 днів або застосовувати декілька типів. Різні об'єкти, що підлягають дезінфекції, зумовлюють потребу у використанні різних методів і засобів для їхнього знезараження.

Засіб дезінфікуючий «Alsoft V» діючою речовиною якого є спирт етиловий у межах 76,9 - 81,4 % , призначений для дезінфекції шкіри персоналу підприємств харчової і харчопереробної промисловості, має широкий спектр антимікробної дії по відношенню до транзиторної і резидентної мікрофлори. Активний до бактерій включаючи *Mycobacterium terrae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*; грибів роду *Candida*, вірусів – герпесу, грипу (H1N1, H5N1), ротавірусу, рінновірусу, коронавірусу (BCV).

«Alsoft V» згідно з ГОСТ 12.1.007-76 належить до малонебезпечних речовин при нанесенні на шкіру та при введенні у шлунок (4 клас небезпеки); шкірноподразнювальна та сенсibiliзуюча дія відсутня; в нативній формі спричиняє подразнення слизової оболонки очей. У насичуючих концентраціях, що можуть створюватись у приміщенні під час дезінфекції рук медичного персоналу, засіб не подразнює слизову оболонку верхніх дихальних шляхів та очей [46].

Дезінфекційний засіб “Тонік антисептичний „Біоцид плюс” - діючою речовиною якого є 0,5% полігексаметиленгуанідин гідрохлорид, виявляє бактерицидні, віруліцидні та фунгіцидні властивості. Засіб володіє пролонгованою дезінфікуючою дією на шкірі протягом 6 годин або до першого миття рук. Функціональні добавки зумовлюють виражену місцеву протизапальну та ранозагоюючу дію, пом’якшують та живлять шкіру, забезпечують її зволоження та еластичність, зберігають нейтральний рН шкіри. Засіб “Тонік антисептичний „Біоцид плюс” за діючою речовиною згідно з ГОСТ 12.1.007 при пероральному надходженні та при нанесенні на шкіру відповідає 4 класу малонебезпечних речовин. Засіб не має шкірно-подразнюючих, шкірно-резорбтивних, кумулятивних, мутагенних та канцерогенних властивостей, не виявляє ембріотоксичної, тератогенної та алергенної дії. Довгострокове застосування засобу нанесенням на шкіру не впливає на картину крові та її біохімічні показники [47].

Отже, як дезінфікуючі засоби для персоналу будуть використовуватися такі антисептики, як «Alsoft V» та «Біоцид плюс». Обидва засоби мають широкий спектр дії, гарний дезінфікуючий ефект, є безпечними для людини і відносно дешевими.

Згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502 на 1 м 2 затрачається приблизно 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікуючого засобу [42,46].

Для обробки приміщень, повітроводів, обладнання економічно вигідним варіантом є розчин перекис водню. Розчин не має запаху, розпадається на воду і атомарний кисень, який викликає окислення хімічних компонентів мікробних клітин. Недоліком є те, що перекис водню є сильним окисником, що ушкоджує об'єкти з заліза, хрому, свинцю, срібла, марганцю, чавуна, міді, латуні, нелегірованих і низьколегірованих сталей. Не сумісна з лугами. Перекис водню відноситься до високонебезпечних речовин (2 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). Подразнює шкіру, слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів. Саме тому використання такого дезінфікуючого засобу не є доцільним.

Біоактивний миючий засіб «Міродез універ» який у своєму складі має комплекс ЧАС, гліоксаль, синергисти біоцидів. Виявляє антимікробну властивість щодо бактерії (включаючи збудників туберкульозу, тестували на *M.terrae.*), віруси (тестовано на вакцині поліовірусу 1 типу), патогенні гриби. На вигляд цей розчин являє собою прозору рідину, яка може мати відтінок жовтуватого кольору. Що стосується запаху, то він досить легкий і приємний. До розчину «Міродез універ» інструкція вказує, що засіб за ступенем токсичної дії відноситься до класу № 3 помірно небезпечних речовин при попаданні в людський шлунок. Також це засіб відноситься і до класу № 4 малонебезпечних коштів по впливу на шкірний покрив і у вигляді пари. Термін зберігання «Міродез» безпосередньо залежить від того, в якому стані знаходиться ємність. Іншими словами, якщо розчин запечатаний, то зберігають протягом 5 років. У разі, коли ємність була відкрита, то розчин необхідно використовувати протягом двох тижнів. Далі його застосування буде недоцільним. «Міродез універ» зберігають в прохолодному місці, добре захищеному від сонця при температурі від 0 і до +35 градусів [48].

Дезінфікуючий засіб «ЕСТЕР ДЕЗ» використовують для проведення дезінфекції технологічного устаткування (резервуарів, ємностей, теплообмінників, ферментерів) та трубопроводів. Основною діючою речовиною є надоцтова кислота у межах 8,0 - 16,0 %. Ефективно діє проти

мікроорганізмів і вірусів при низьких температурах і нетривалому часі впливу (15-30 хв.). Володіє сильною бактерицидною активністю по відношенню до спороутворюючих бактерій, кишкової палички, дріжджів в 0,015-0,1% концентрації по НОК. Резистентність мікроорганізмів до дезінфікуючого засобу відсутня. Дезінфікуючий засіб «ЕСТЕР ДЕЗ» екологічно безпечний, після застосування розкладається на кисень, воду та оцтову кислоту [49].

Каустична сода також є ефективною для миття жирних поверхнь, для миття білкових залишків, залишків солей чи мікроорганізмів, та продуктів їх життєдіяльності. Недоліком є те, що каустична сода є шкідливою для людини (2 клас небезпеки за ГОСТ 12.1.007). При попаданні на шкіру викликає хімічний опік. Подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів. Використовувати дану речовину для миття обладнання недоцільно, адже вона є небезпечною [50].

Отже, проаналізувавши вищесказане, для миття обладнання доцільніше буде використовувати Дезінфікуючий засіб «ЕСТЕР ДЕЗ», а для миття стін, підлоги та дверей - «Міродез», оскільки вони є економічно вигідними для промислового виробництва, безпечними для персоналу та входять у Державний Реєстр дезінфекційних засобів станом на 2020 рік, що означає – відповідають усім вимогам та критеріям.

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

В попередніх пунктах було показано, що необхідним є підтримання асептичних умов культивування, тому є необхідним проведення стерилізації поживного середовища, посуду, інструментів та деяких пристроїв. Це робиться з метою недопущення розвитку сторонніх мікроорганізмів при роботі з досліджуваними культурами. Метою стерилізації є повне знешкодження матеріалу від вегетативних клітин мікроорганізмів та їх форм спокою [32]. Найбільш поширений та надійний спосіб стерилізації є стерилізація насиченою парою під тиском. Проводять за допомогою

автоклавів, металевих резервуарів, що герметично закриваються і здатні витримувати високий тиск [32].

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Aspergillus niger* EB-12, умовно можемо поділити його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: Меляса на 20-25% складається з води, близько 9% органічних азотистих сполук (переважно амідів), 58-60% залишкових вуглеводів головним чином це сахароза і рафіноза. Крім цього до складу входить до 7-10% золи (мінеральних речовин) [34]. Авторами літературного джерела [27], для подальшої стерилізації даної композиції, рекомендовано підкислювати розчин меляси сульфатом амонію та освітлювати фероціанідом калію для осадження іонів важких металів, оскільки дані компоненти, які містяться у її складі можуть впливати на ріст та розвиток продуцента. Меляса є термолабільним компонентом, який потребує м'якого режиму стерилізації. Тому, що має в своєму складі вуглеводи, які спричиняють карамелізацію при високій температурі. Тому стерилізація даної композиції буде проходити окремо від всіх компонентів при температурі 112°C і тиску 0,05 МПа, впродовж 30 хв.

Композиція Б: Гідролізат курячого пір'я (CFP). Оскільки відсутні дані про стерилізацію цього компоненту, і відомо [27], що CFP містить високий вміст білка, золи та низький вміст жиру, а також містить амінокислоти, стерилізація його буде проходити при температурі 112°C і тиску 0,05 МПа, впродовж 30 хв.

Композиція В: Монофосфат калію (KH_2PO_4). Режим стерилізації: при температурі 131°C і тиску 0,15 МПа, впродовж 40 хв.

Згідно розрахунків наведених у розділі 1, виробничий біосинтез лимонної кислоти буде відбуватися у ферментері об'ємом 100 м³, що містить 45,45 м³ поживного середовища. Одержання інокуляту відбувається у 5 етапів.

Особливості приготування композиції А

Для приготування розчину, наважку меляси розчиняють у воді нагрітої до 80°C. Наступним етапом є її підкислення до рН 5,5 розчином сірчаної кислоти та освітлення за допомогою фероціаніду калію. Для підкислення розчину до меляси додають 2 мл/л 1 н розчину сірчаної кислоти та нагрівають при 90°C протягом 15 хв. В попередньо підготований нагрітий розчин меляси вносять 0,1 г/л фероціаніду калію, подальше витримання проводять протягом 24 годин при температурі не нижче 25°C. Після витримання розчин центрифугують протягом 10 хв при 3000 об/хв [27].

Було розраховано, що на етапах виробничого біосинтезу будуть такі кількості поживного середовища

Таблиця 5.1.

Об'єм ферментера, м ³ або л	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, м ³ або л	Об'єм посівного матеріалу, м ³ або л	Об'єм поживного середовища, м ³ або л
100	0,5	50	4,54	45,45
10	0,5	5	0,45	4,54
1	0,5	500 л	45,45 л	454,5 л
0,1	0,5	50,5 л	4,59 л	45,9 л
0,01	0,5	5,1 л	0,46 л	4,6 л

Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалці

Для отримання посівного матеріалу у колбах на качалках потрібно 0,46 л середовища, тому стерилізація компонентів буде відбуватися у автоклаві. Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Aspergillus niger* EB-12, умовно можемо поділити його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: Меляса (112°C і тиску 0,05 МПа, впродовж 30 хв).

Композиція Б: Гідролізат курячого пір'я (112°C і тиску 0,05 МПа, впродовж 30 хв).

Так як кількість монофосфату калію, яку необхідно внести у поживне середовище є замалою, доцільно приготувати даний розчин у вигляді запасного. Для цього готують розчин солі та стерилізують його в автоклаві при температурі 131°C і тиску 0,15 МПа, впродовж 40 хв.

Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л.

Оскільки для даної стадії біосинтезу потрібно 4,6 л поживного середовища, стерилізувати його можна у автоклаві. Склад композицій та умови їх стерилізації аналогічно підпункту 2.3.1. Вже раніше приготовлений і простерилізований запасний розчин монофосфат калію використовується і на даному етапі.

Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

На даному етапі необхідно одержати 45,9 л поживного середовища. Приготування розчину меляси та її стерилізація (*композиція А*), буде відбуватися в призначеному для цього реакторі-змішувачі з робочим об'ємом 50 л при температурі 112°C і тиску 0,05 МПа, впродовж 30 хв. Приготування розчину *композиції Б* буде проходити в призначені для цього колбі об'ємом 5 л, стерилізація відбувається в автоклаві, оскільки об'єм даної композиції є замалий для стерилізації в інокуляторі. Режими стерилізації відповідно підпункту 2.3.1. Запасний розчин монофосфат калію використовується на даному етапі, оскільки його кількість, яку необхідно внести у поживне середовище є замалою. Вже простерилізовані розчини композицій подають у інокулятор об'ємом 100 л.

Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1000 л

На четвертому етапі необхідно одержати 454,5 л поживного середовища. Приготування і стерилізація *композиції А* буде відбуватися в призначеному

для цього реакторі-змішувачі об'ємом 500 л при температурі 112°C і тиску 0,05 МПа, впродовж 30 хв. Приготування і стерилізація *композиції В* буде відбуватися в реакторі-змішувачі з робочим об'ємом 40 л при 112°C і тиску 0,05 МПа, впродовж 30 хв. Стерилізація *композиції В* буде проходити в автоклаві, при температурі 131°C і тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв, оскільки об'єм даної композиції є малою для стерилізації в інокуляторі. Для попереднього розчинення солі використовується колба об'ємом 2 л.

Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в ферментері об'ємом 10000 л

Для цієї стадії необхідно одержати 4,5 м³ поживного середовища. З економічної точки зору доцільніше для стерилізації такої кількості поживного середовища застосовувати установку безперервної стерилізації (УБС). Її використання дозволяє зменшити витрати води, пари, теплової енергії і скоротити час обробки поживного середовища. Таку кількість середовища можна простерилізувати в УБС - 5, потужністю 5 м³ /год [11]. При стерилізації приготовленого поживного середовища допускається загальний час стерилізації від 1 до 1,5 год. Вже простерилізоване поживне середовище передається в ферментер об'ємом 10000 л.

Приготування та стерилізація середовища для виробничого біосинтезу у ферментері 100 м³

Для даної стадії біосинтезу потрібно 45,45 м³ поживного середовища. Як було вже сказано раніше, з економічної точки зору доцільніше для стерилізації такої кількості поживного середовища застосовувати установку безперервної стерилізації. Тому стерилізування його буде проходити в УБС – 20, потужністю 20 м³ /год. Після цього середовище переноситься в ферментер об'ємом 100 м³ для виробничого біосинтезу. На даному етапі вноситься і простерилізований розчин підживлення розрахований раніше.

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Культуральна рідина містить, як цільовий продукт (позаклітинну лимонну кислоту), так і залишки поживного середовища, продукти

метаболізму та клітини продуцента. Відомий традиційний спосіб отримання кристалізаційної лимонної кислоти включає в себе такі етапи [51]:

1. Відділення біомаси міцеліального гриба *Aspergillus niger* EB-12 від культуральної рідини.
2. Отримання лимонної кислоти у вигляді цитрату кальцію
3. Відокремлення лимонної кислоти у вигляді цитрату кальцію.
4. Розклад цитрату кальцію
5. Випарювання розчину лимонної кислоти
6. Освітлення розчину та фільтрування
7. Концентрування розчину лимонної кислоти
8. Кристалізація.
9. Відділення кристалів.
10. Висушування кристалів.
11. Фасування лимонної кислоти.

5.2.1. Вибір способу відокремлення біомаси та обладнання у виробництві лимонної кислоти

Культуральна рідина після біосинтезу містить, окрім лимонної кислоти, біомасу продуцента і продукти його життєдіяльності. Тому першим етапом в технології виділення цільового продукту є відділення біомаси продуцента. Існує велика кількість способів відокремлення біомаси продуцента від рідкої суспензії середовища, зокрема такі як осадження, фільтрування, флотація, центрифугування та сепарування [52].

Сепарування використовується при розділенні, концентруванні, очищенні, прояснюванні та для поетапної обробки рідини, наприклад, послідовного відділення грубодисперсного осаду від тонкодисперсних суспензій. Істотним недоліком даного способу є те, що швидко забиваються мундштуки та між тарілчастий простір механічними включеннями й мертвими клітинами бактерій.

Центрифугування. Відділення біомаси на звичайних центрифугах ускладнене, оскільки для перероблення рідин на центрифугах потрібно, щоб

концентрація дисперсної фази була не менше ніж 5 % (для центрифуг періодичної дії) або 10 % (для центрифуг безперервної дії), а вміст біомаси в КР не перевищує, як правило, 1...4%. У порівнянні з іншими методами відділення має такі переваги:

- швидке відокремлення біомаси
- здійснюється максимальне відділення культуральної рідини від біомаси та залишків компонентів поживного середовища;
- висока продуктивність;
- застосування для суспензій із високою концентрацією твердих частинок в середовищі
- відносно низька тривалість процесу;
- можливість варіювати розмір розділювальних часток [53].

У результаті центрифугування виходить осад з деяким вмістом рідкої фази та освітлена рідина, що називається фугатом. Даний метод потребує більш дорогого устаткування, ніж фільтрування. Тому він виправдовує себе, якщо: а) суспензія фільтрується повільно; б) поставлене завдання максимального звільнення культуральної рідини від клітин [53].

Оскільки біологічний агент є міцеліальним грибом, то найбільш доцільно відділення біомаси проводити шляхом фільтрування, оскільки міцелій грибів відділяється від рідкої фази без особливих труднощів [51,52]. Проте, тонкі гіфи міцелію забивають пори фільтруючого матеріалу і утворюють осад з високим гідравлічним опором. Тому культуральну рідину піддають спеціальній обробці. Найбільш поширений прийом поліпшення фільтрації – додавання реагентів, що утворюють малорозчинні осади [54].

Фільтрація – пропускання суспензії через фільтруючий матеріал, під дією різниці тисків рідина проходить через пори і збирається у вигляді фільтрату, а тверді частинки – біомаса, на фільтруючій мембрані. Фільтрація через тканинні фільтри проводиться для частинок розміром від 10 мкм до 1 мм. Основними перевагами методу фільтрації є:

- ✓ Менші енергозатрати;

- ✓ Простота та зручність методу;
- ✓ Селективність.

Для фільтрації традиційно використовуються: фільтр-прес, нутч-фільтр, друк-фільтр, вакуум-фільтр. Для відділення біомаси міцелію найчастіше використовуються фільтр-прес або вакуум-фільтр. В даному випадку, доцільніше використання фільтр-пресу, оскільки вони найбільш придатні для поділу суспензій в тих випадках, коли потрібно отримати досить зневоднений осад. Фільтр-прес – це обладнання періодичної дії, що призначене для фільтрування суспензій під тиском. Фільтр-преси дозволяють одержати чистий фільтрат, який містить менше 1 твердої фази, і зневоднений до транспортабельного стану осад [55].

Рамні фільтр-преси періодичної дії широко застосовують в малотонажних виробництвах для поділу важкофільтруючих суспензій з високим питомим опором при необхідності ретельного промивання осаду і подальшого його віджиму. Недоліки фільтра, пов'язані з трудомісткістю операцій його розбирання, розвантаження і збирання [56].

Фільтр-преси типу ФПАКМ (фільтр-прес автоматизований камерний модифікований) призначені для розділення тонко дисперсних суспензій з розмірами частинок не більше 3 мм і вмістом твердої фази від 10 до 500 при температурі до 80°C. Цей фільтр дозволяє здійснювати за заданої програми в автоматичному режимі всі технологічні і допоміжні операції: фільтрування, промивання, пресування і зняття осаду, підйом і спускання фільтрувальних плит [55].

Фільтр-прес ФПАКМ (*рис. 1.1.*) має ряд переваг перед іншими фільтрами. Він володіє розгорнутою фільтрувальною поверхньою; для його розміщення потрібна незначна виробнича площа; віджим окремого осаду, який виробляється під тиском 0,8-1,5 МПа, дозволяє отримати біомасу вологістю 60-70% при порівняно малій витраті електроенергії (0,8-1 кВт фільтрувальної поверхні); не великий час проведення допоміжних операцій,

що підвищує питоме виробництво установки в 6-8 раз порівняно з іншими фільтр-пресами [55].



Рис. 5.1. Камерно-мембранний фільтр-прес Екотон [55].

Фільтр-преси можуть комплектуватися мембранними фільтрувальними плитами. Від звичайних камерних вони відрізняються тим, що камера фільтрування оснащується рухомою перегородкою – мембраною. Під час подання повітря або води під мембрану вона по всій площі тисне на осад що приводить до технологічних переваг [56].

Фільтр-прес працює наступним чином. Культуральна рідина піддається по бічним працівникам колектора одночасно до всіх плит. Де відбувається фільтрування. Фільтрат поступає в збірник, а осад залишається на поверхні фільтрувальної тканини. Відділення культуральної рідини від біомаси відбувається достатньо добре, і фільтрат виходить прозорим при фільтрації і відтисненні осаду при тиску 0,4 МПа. При подальшому підвищенні тиску відтиснення до 0,8 МПа і витримуванні на протягом 5-6 хв. залишкова вологість осаду досягає 65-70%. Винесення твердої фази з фільтром при тиску 0,4 МПа не відбувається, а при відтисненні осаду під тиском 0,8 МПа максимальне винесення складає не більш 0,09 г/л фільтрата. При фільтруванні відділений міцелій промивають незначною кількістю води [57].

Переваги камерно-мембранних фільтр-пресів:

- Висока надійність конструкції
- Простота експлуатації та обслуговуванні
- Велика фільтрувальна поверхня
- Можливість використовувати підвищений тиск у роботі з матеріалами, які погано фільтруються.
- Висока стійкість до корозії, завдяки застосуванню у конструкції корозійностійких матеріалів
- Сучасна система автоматизації.
- Низька вологість осаду
- Мінімальна кількість промивної води та низьке витрачання повітря під час просушування
- Низький рівень споживання енергії
- Тривалий термін служби фільтрувальної тканини
- Прості вивантаження осаду та відведення фільтрату [57].

Отже, найдоцільніше буде використання саме камерно-мембранних фільтр-пресів. Оскільки дані фільтри дають просте вивантаження осаду та відведення фільтрату, низьку вологість осаду та мають велику фільтрувальну поверхню, що досить важливо для виділення лимонної кислоти.

5.2.2. Отримання лимонної кислоти у вигляді цитрату кальцію

В процесі виділення з культуральної рідини лимонну кислоту осаджують у вигляді малорозчинного цитрату кальцію. Культуральну рідину обробляються вапняним молоком (15 916, 54 л) до рН > 6 при температурі близько 90 °С. Згідно літературного джерела [58] відомо, що 1 т сухого вапна/1 т лимонної кислоти. Концентрація цільового продукту складає 68,80 г/л, тоді кількість лимонної кислоти у 41 791,43 л культуральної рідини буде: $68,80 \text{ г/л} \times 41791,43 = 2875 \text{ кг}$. Проте, для осадження лимонної кислоти необхідно саме вапняне молоко. Згідно літературного джерела [59] відомо, що на 1 кг сухого

вапна необхідно 4,5 л води. Тоді кількість води для приготування 2,9 т вапна буде 13050 л.

5.2.3. Відокремлення цитрату кальцію.

Спираючись на порівняння фільтраційного обладнання представленого в пункті *1.1.1. Вибір способу відокремлення біомаси*, переваги камерно-мембранного фільтр-пресу будуть ключовими і у випадку відділення осаду цитрату кальцію. Дана конструкція має ряд переваг порівняно з іншими фільтрами, оскільки дозволяє отримати практично сухий осад. Далі отриманий осад промивають на фільтрі водою з температурою не нижче 90°C. Воду для промивання осаду подають на фільтр-прес спеціальним насосом, яка потім самопливом спускається в резервуар промивного фільтра [55].

5.2.4. Розклад цитрату кальцію

Практично в усіх відомих джерелах [52,54,57] для відділення лимонної кислоти з цитрату кальцію, осад обробляється сірчаною кислотою в реакторі з кислотійкої сталі. Відомо, що з осаду готують суспензію, концентрація якої забезпечить отримання 25%-го розчину лимонної кислоти. Температуру суспензії доводять до 75°C і додають технічну сірчану кислоту в кількості 5 г/л. При цьому відбувається розклад цитрату кальцію з утворенням лимонної кислоти та осаду гіпсу, температура реакційної суміші зростає приблизно до 90°C [52,57]. Відділення осаду гіпсу відбувається на барабанному вакуум-фільтрі. Як було сказано раніше, традиційно для фільтрування використовуються: фільтр-прес, друк-фільтр, нутч-фільтр, вакуум-фільтр. Нутч-фільтри - прості ємнісні фільтри, працюючі як під вакуумом, так і під надмірним тиском. У цих фільтрах співпадають напрями дії сили тяжіння і руху фільтрату. Проте, суттєвими недоліками даного фільтра є те, що він найчастіше використовуються в малотоннажних виробництвах і в лабораторних умовах; невелика швидкість фільтрування внаслідок того, що різниця тисків практично не перевищує 0,75 атм; громіздкість установки; ручне вивантаження осаду [60].

Друк-фільтри застосовують для розділення тонкодисперсних суспензій з низькою концентрацією твердої фази, що також є недоцільним для виробництва. Тому, для відділення осаду гіпсу найкращим є використання барабанного вакуум-фільтра. Він є фільтром безперервної дії для розділення середньо- і грубодисперсних суспензій зі змістом твердої фази до 30%. У барабанному вакуум-фільтрі зниження вологості зневодненого матеріалу є на 2-3% менше, у порівнянні з іншими фільтрами [60].

5.2.5. Перше концентрування розчину лимонної кислоти

Однією з основних стадій технологічного процесу виділення є концентрування лимонної кислоти. Спосібів концентрування відомо кілька:

- 1) без зміни фаз (мембранні, ультрафільтрація);
- 2) зі зміною фаз (виморожування, випарювання, вакуум-випарюванням).

Згідно літературних джерел [52,57] відомо, що концентрування розчину лимонної кислоти відбувається саме за допомогою процесу випарювання. Цей процес полягає в тому, що шляхом нагрівання і зниження тиску, деяку частину розчинника (води) у вигляді пари видаляють з розчину. Даний процес широко використовують для часткового розділення (концентрування) розчинів та для повного виділення твердих речовин із нього. Випарювання у промислових умовах відбувається у апаратах одноразової та багаторазової дії. Найчастіше процес відбувається безперервно у однокорпусних та багатокорпусних апаратах [61,62]. Процес випарювання може здійснюватися під вакуумом, при атмосферному та надмірному тиску [63].

Випарювання під вакуумом має певні переваги перед випарюванням при атмосферному тиску. У апараті вакуум створюється шляхом конденсації вторинної пари у конденсаторі та відсмоктуванні з нього газів, які не конденсувалися за допомогою вакуумного насоса. Застосування вакууму дозволяє збільшувати рушійну силу теплопередачі, а отже, зменшувати площу поверхні випарних апаратів. У випадку однакової корисної різниці температур при випарюванні під вакуумом можна використовувати гріючі теплоносії більш низьких робочих параметрів (температура і тиск). Застосування вакууму

дає можливість використовувати у якості гріючого теплоносія, крім первинної пари, вторинну пару самої випарної установки, що знижує витрати первинної гріючої пари [63].



Рис. 5.2. Вакуум-випарний апарат Молком [64]

При випарюванні під атмосферним тиском вторинна пара, що утворюється, як правило, скидається в атмосферу. Такий спосіб випарювання є найбільш простим, але й найменш економічним [64].

Випарювання розчину лимонної кислоти проводять періодично, у два етапи, у вакуум-випарних апаратах з виносною гріючою камерою. Використовують апарати таких конструкцій тому, що в процесі випарювання утворюється гіпс, який не лише забруднює сам розчин, але і відкладається на поверхні гріючих труб, що зумовлює зниження коефіцієнта теплопередачі. Перше випарювання проводиться у вакуум-випарному апараті при залишковому тиску близько 80 кПа. Кінцева густина складає 1,26-1,28 г/см³.

5.2.6. Освітлення розчину та фільтрування

Розчин лимонної кислоти після першого випарювання зливають в реактор з мішалкою, нагрівають до 70°C і додають активоване вугілля в кількості 1,5% від маси лимонної кислоти в розчині, що дозволяє зменшити колірність розчину. Суспензію перемішують 30-35 хвилин і фільтрують для відділення осаду вугілля. Для відділення осаду вугілля використовується вже обраний нами раніше барабанний вакуум-фільтр. Оскільки переваги барабанного вакуум-фільтру над іншими конструкціями, будуть ключовими і

у випадку відділення осаду вугілля. Як було сказано раніше, у барабанному вакуум-фільтрі зниження вологості зневодненого матеріалу є на 2-3% менше, у порівнянні з іншими фільтрами. Він являє собою горизонтальний циліндричний перфорований барабан, покритий ззовні фільтрувальною тканиною. Барабан обертається навколо своєї осі і на 0,3-0,4 поверхні занурений у суспензію, яка міститься в ємності. Всередині барабан розділений радіальними герметичними перегородками на окремі комірочки, з'єднані трубками з розподільною головкою [53,54].

Серед основних переваг барабанного вакуум-фільтра хочеться зазначити:

- Безперервність процесу, що сприяє значному підвищенню
- продуктивності виробництва;
- Висока швидкість;
- Зручність промивки осаду;
- Легкість захисту від корозії;
- Менша трудомісткість обслуговування [65].



Рис 5.3. Барабанний вакуум-фільтр БОН [65].

5.2.7. Друге концентрування розчину лимонної кислоти

Для подальшої кристалізації лимонної кислоти, необхідно досягнути стану пересичення. Саме для цього проводять ще одне концентрування розчину. Освітлений розчин лимонної кислоти надходить у вакуум випарний апарат.

Розчин концентрують до густини 1,37-1,38 г/см³, при тиску 80 кПа, при цьому вміст кислоти в розчині складає 71%. Концентрований розчин подають в кристалізатор [52,58].

5.2.8. Кристалізація лимонної кислоти

Кристалізація - процес виділення твердої фази у вигляді кристалів, головним чином з розчинів і розплавів. Відомі такі способи кристалізації: з витяганням частини розчинника (часткове витягання розчинника проводиться при його випаровуванні чи виморожуванні); кристалізація при зміні температури (проводиться при зниженні розчинності речовини при зміні температури системи); комбінований спосіб кристалізації (вакуум-кристалізаційний, коли випаровування відбувається не шляхом підведення тепла крізь стінку, а за рахунок віддавання розчином свого фізичного тепла, яке витрачається на випаровування частини розчинника) [66].

Згідно літературного джерела [53] кристалізацію проводять охолодженням при безперервному перемішуванні. Пересичення, необхідне для утворення центрів кристалізації, досягається при зниженні температури розчину. При температурі близько 37°C вносять затравку, яка провокує утворення кристалів лимонної кислоти в кількості 0,05% від маси розчину. Утворення і ріст кристалів відбуваються при зниженні температури до 8°C. При цій температурі утфель, який є сумішшю кристалів і маточного розчину, витримують протягом 30 хв [52,54,58].

Кристалізаційна установка складається із двох модулів :

- Вакуумний охолоджувач
- Станція кристалізації

Вакуумний охолоджувач виконує функцію охолодження концентрату в потоці. Концентрований продукт піддається миттєвому охолодженню внаслідок адіабатного скипання в усьому об'ємі, за один цикл охолодження, під тиском нижче атмосферного. Тиск, необхідний для роботи установки створюється і підтримується за допомогою вакуумного насоса і конденсації

вторинної пари на поверхнях трубчастого конденсатора. Охолоджений продукт з охолоджувача подається в станцію кристалізації [67].

Станція кристалізації складається з декількох кристалізаторів, кожен з яких працює і управляється автономно і незалежно від інших. Загальним елементом для усіх кристалізаторів є резервуар оборотної крижаної води. Мережа крижаної води призначена для забезпечення виконання процесу кристалізації в температурах, що передбачаються технологією (37 °С). Циркуляція крижаної води в сорочці здійснюється насосами [67].

5.2.9. Відділення кристалів лимонної кислоти на центрифугах

Відділення кристалів лимонної кислоти відбувається за допомогою центрифугування. Центрифугування - процес розділення суспензій або емульсій на окремі фази (дисперсну і дисперсійну) в центрифугах. Центрифуги є машинами для фільтрування суспензій або осадження фаз з суспензій і емульсій під дією відцентрових сил. Відцентрові сили в центрифугу виникають внаслідок обертання її ротора [68].

Осаджувальні центрифуги застосовують для розділення суспензій при помітній різниці щільності рідкої і твердої фаз при виділенні часток розміром менше 100 мкм. При цьому початкова суспензія може містити до 40% твердої фази [68].

Фільтрувальні центрифуги використовують при розділенні суспензій для відділення твердих часток розміром до 10 мм, при об'ємній концентрації твердої фази в початковій суспензії від 1 до 60%, а також при необхідності отримання осаду невисокої кінцевої вологості або високої чистоти (необхідності його промивання) [68].

Періодичні центрифуги застосовують в малотоннажних виробництвах, при низьких концентраціях [68].

Кристали лимонної кислоти відокремлюють від маточного розчину на горизонтальній осаджувальній шнековій центрифугі. Оскільки при використанні фільтрувальної центрифуги будуть великі втрати. Тому, що кристали лимонної кислоти можуть просочуватись через фільтрувальний

матеріал. Значною перевагою горизонтально-осаджувальної шнекової центрифуги є її горизонтальне положення ротора, оскільки при такому розташуванні простіше організувати безперервне відведення осаду і фугату [68].

Вихідний утфель завантажувальним пристроєм подається у середину шнека і через отвори в ньому надходить в ротор. В роторі відбувається відцентрове осадження частинок і розділення суспензії на тверду і рідку фази. Тверда фаза шнеком переміщується до розвантажувальних патрубків, через які вона відцентровими силами розвантажується з ротора. Рідка фаза по спіральних каналах, що створені витками шнека і стінкою ротора, рухається у протилежному напрямку і витікає через зливні вікна. Отримані кристали пробілюють – обприскують водою з температурою не вище 35°C для видалення плівки маточного розчину на їх поверхні. Після центрифугування вологість кристалів лимонної кислоти складає 2-3% [58,69]



Рис. 1.4. Осаджувальна шнекова центрифуга

5.2.10. Висушування кристалів лимонної кислоти

Наступним етапом є висушування отриманих кристалів лимонної кислоти. Після процесу концентрування, лимонній кислоті потрібно надати товарну форму, адже продукт повинен бути сухим. Сушіння може здійснюватися у пневматичних, розпилюючих, сублімаційних сушарках, конвективних сушарках, з киплячим шаром та у вакуумних сушарках [70].

Розпилювальна сушарка є більш ефективною та легкою в обслуговуванні. У даній сушарці суспензія висушуваного матеріалу безперервно подається зверху на відцентровий механізм та поступово розпилюється на частинки розміром 60—70 мкм. Теплоносій поступає знизу через направляючу насадку конічної форми із тангенціальними щілинами, та забезпечує високу швидкість руху теплоносія. Завдяки високим швидкостям руху частинок суспензії, великій поверхні контакту та сушильного агента процес висушування продукту відбувається швидко. **Недоліком** сушіння розпиленням є контакт продукту в стані високої дисперсності з киснем повітря, що призводить до часткового окиснення його складових. До недоліків розпилювальних сушарок за відносно невисоких температур повітря для сушіння (130 - 160 °С) належить висока витрата пари (2,5- 3,0 кг/кг вологи), що випаровується внаслідок малого насичення відпрацьованого повітря і низького коефіцієнта використання сушарки [70].

Сушарки із киплячим шаром часто використовуються для сушіння рідких, сипких, та пастоподібних матеріалів. Даний тип сушарки характеризується високою інтенсивністю масо- і теплообміну, безперервність процесу. **Основний недолік:** мала внутрішня гідродинамічна стійкість киплячого шару, яка може призвести до утворення великих зон злежування матеріалу та припинення процесу безперервної роботи установки [70].

Конвективні сушарки - апарати, в яких випаровування вологи з матеріалу, що висушується, відбувається за рахунок теплоти газоподібного сушильного агента при контакті матеріалу і теплоносія. До цієї групи сушарок відносяться камерні, тунельні, барабанні, розпилювальні, сушарки зі зваженим шаром, пневматичні.

Пневматична сушарка є простою в обслуговуванні .

Основні недоліки пневматичних сушарок:

- високі витрати сушильного агента та теплоти;
- завелике навантаження на роботу циклону із огляду на необхідність вивантаження висушеного матеріалу.

Кристали лимонної кислоти сушать в умовах, які забезпечують видалення поверхневої вологи [52,53]. При сушінні лимонної кислоти використовується барабанна сушарка, яка відноситься до конвективних.

Барабанна сушарка складається з циліндричного корпусу і опор, на яких цей корпус встановлений. Причому корпус нахилений у бік вивантаження матеріалу. Сушильною камерою в таких сушарках служить барабан, який зазвичай представляє собою обертовий пустотілий сталевий циліндр, усередині якого по всій довжині розташована розподільна насадка з полочками і лопатями. Насадка призначена для перемішування і рівномірного розподілу матеріалу по барабану в процесі сушіння. Через завантажувальну камеру вологий матеріал подається в сушильний барабан і надходить на внутрішню насадку. Спочатку частки матеріалу захоплюються і піднімаються лопатями, потім падають вниз, пересипаються з однієї полиці на іншу. Висушуються частки матеріалу під дією сушильного агента (гарячого повітря або суміші повітря з топковими газами), який продувається через барабан вентилятором. Безперервно перемішуючись, матеріал переміщається до виходу з барабана. Висушений матеріал вивантажується через розвантажувальну камеру [70].

Переваги в порівнянні з іншими видами сушарок :

- Універсальність;
- Висока якість сушіння за рахунок інтенсивного перемішування матеріалу;
- Можливість сушити високовологий матеріал;
- Простота монтажу (для запуску в роботу не потрібно капітальних споруд);
- Надійність роботи (виключається утворення застійних зон);
- Прийнятна ціна;
- Низьке споживання електроенергії [71].



Рис. 1.5. Барабанна сушарка [72].

5.2.10. Фасування лимонної кислоти

Після висушування кристали кислоти охолоджують, просівають і упаковують на фасувально-пакувальній лінії. Лимонну кислоту випускають в упакованому вигляді. Для постачання на підприємства лимонна кислота фасується в льняні продуктові мішки масою 25 кг з вкладишем з поліетиленової плівки [52].

5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадій виділення та очищення

Підготовка повітря для барабанної сушки. Повітря перед поступанням у вентилятор необхідно очистити від домішок, для цього повітря проходить через фільтр грубої очистки повітря. Одними з таких є механічні фільтри грубої очистки повітря. Механічні фільтри використовуються в якості першого ступеня очищення повітря в приміщеннях з підвищеними вимогами до чистоти повітря і в якості фільтруючого обладнання в приміщеннях без підвищених вимог до якості повітря. Фільтруючим матеріалом є металева сітка або синтетична тканина. Такі фільтри є обов'язковим елементом фільтрації в будь-якій системі вентиляції, оскільки вони дозволяють вловлювати великі частинки [73]. Сітчасті фільтри є багаторазовими – для очищення від пилу їх досить промити в теплій воді.

Вже очищене повітря у механічному фільтрі подається вентилятором у нагрівач. У якості підігрівача повітря використовуються каналні водяні теплообмінники. Дворядні каналні теплообмінники застосовують в системах вентиляції і кондиціонування, призначені для нагріву та охолодження повітря. Канальні нагрівачі дозволяють використовувати в якості теплоносія не тільки воду, але і незамерзаючі суміші. Конструктивно теплообмінники є 2-х рядними мідно-алюмінієвими пластинчастими теплообмінними апаратами. Поверхня теплообміну виготовлена з алюмінієвих пластин товщиною 0,13мм і проходять через них мідних трубок (діаметр 3/8 "/9.52мм). Розташування трубок шахове [74].

Вже підігріте повітря поступає у фільтр тонкої очистки. Існують такі види даних фільтрів: вугільні фільтри та губчасті фільтри. Вугільні фільтри використовуються в якості фільтрів тонкого очищення і їх основною перевагою є те, що вони вловлюють неприємні запахи і видаляють шкідливі гази за рахунок адсорбційних матеріалів у їх складі, які ці шкідливості в себе вбирає. Їх ефективність визначається площею фільтруючого матеріалу і кількістю мікропор [73]. Основа фільтруючого елемента-гранульований активоване вугілля, який при контакті з домішками і газами затримується великими порами фільтрує основи. Потім під впливом інших сил, які всередині і зовні вугільних гранул, молекули домішок перетворюються в маленькі пори і утримуються. Вугільний фільтр забезпечує універсальну очищення як припливного, так і рециркуляційного потоку [75].

Повністю очищене від сторонніх домішок та підігріте повітря поступає у сушильну камеру через трубу гарячого повітря, де відбувається процес сушіння цільового продукту.

5.4. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків здійснювався по стадіях обґрунтування вибору обладнання згідно до *підрозділу 1.1.*

Вихідні дані:

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації - $V_{кр} = 45 \text{ м}^3$; КП «Основи проектування»
2. Концентрація цільового продукту у КР $C_{ант} = 68,80 \text{ г/л}$ ($= 68,80 \text{ кг/м}^3$)
3. Концентрація біомаси у КР $C_{БМ} = 22,41 \text{ г/л}$ ($= 22,41 \text{ кг/м}^3$) – АСБ,
4. Втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 40% (прийнято для розрахунку ТЕО КП «Основи проектування»):

Початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає $45 \text{ м}^3 \times 68,80 \text{ кг/м}^3 = 3096 \text{ кг}$; кінцева кількість (з урахуванням 40% втрат) має становити **1858 кг.**

Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у *таблиці 1.1.*

Таблиця 5.1.

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 40 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 2. Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 2.1. Зберігання культуральної рідини	КР	45 м ³ (45000 л)	-	45 м ³ (45000 л)	Збірник КР 50 м ³
ТП 3. Відокремлення біомаси						
2	ТП 3.1. Фільтрування	Біомаса	1008,45 кг (45×22,41) АСБ, з урахуванням 90% вологості 1 916,055 кг	-	-	Камерно-мембранний фільтр-прес з повер. фільтрув. 5000 м ³
		Фільтрат культуральної рідини	43 083,95 л (45000-1916,055)	1292,518(3%)	41 791,43 л	
		Кількість лимонної кислоти у фільтраті	3 096 кг	92,88 (3%) кг	3 003,12 кг	

Продовження таблиці 5.1.

ТП 4. Отримання цитрату кальцію						
3.	ТП 4.1. Утворення цитрату кальцію	Фільтрат культуральної рідини	41 791,43 л	-	-	-
		Вапняне молоко	15 916,54 л	-	-	Збірник для вапняного молока об'ємом 20 м ³
		Реакційна суміш	-	-	57 707,97 л	Реактор об'ємом 63 м ³
	ТП 4.2. Відокремлення осаду цитрату кальцію	Реакційна суміш	57 707,97 л	-	-	Камерно-мембранний фільтр-прес з поверхністю фільтрування 5000 м ³
Осад цитрату кальцію вологістю 10%	-	99,1 кг (3%)	3 204,34 кг			
ТП 5. Одержання розчину лимонної кислоти						
4	ТП 5.1. Отримання суспензії	Осад цитрату кальцію вологістю 10%	3 204,34 кг	-	-	Реактор об'ємом 16 м ³
		Вода	9 613,02 л	-	-	
		Суспензія	-	-	12 817,36 л	
	ТП 5.2. Розклад цитрату кальцію	Суспензія	12 817,36 л	-	-	
	Сірчана кислота (5 г/л)	35 л	-	-		
	Реакційна суміш	-	-	12 852,36 л		

Продовження таблиці 5.1.

	ТП 5.3. Фільтрування	Реакційна суміш	12 852,36 л	-	-	Барабанний вакуум-фільтр потужністю 2000 л/год
		Фільтрат	-	385,6 л (3%)	9 203,8 л	
		Осад гіпсу	-	-	3 263 кг	На утилізацію
		Промивна вода	-	-	5 890,4 л	Збірник для розчину лимонної кислоти 25 м ³
		Розчин лимонної кислоти	-	-	15 094,19 л	
ТП 6. Перше концентрування						
5	ТП 6.1. Концентрування розчинну лимонної кислоти	Розчин лимонної кислоти	15 094,19 л	-	-	Вакуум-випарник потужністю 5000 л/год
		Концентрат (55%-й)	4 440 л	222 л (5%)	4 218 л	

Продовження таблиці 5.1.

ТП 7. Освітлення та фільтрування						
8	ТП 7.1. Освітлення розчину лимонної кислоти	Концентрат (55%-й)	4 218 л	-	-	Реактор об'ємом 6,3 м ³
		Активоване вугілля (1,5% від маси лимонної кислоти в розчині)	37,155 кг	-	-	
		Реакційна суміш	-	-	4 255,155 л	
	ТП 7.2. Фільтрування осаду вугілля	Реакційна суміш	4 255,155 л	-	-	Барабанний вакуум-фільтр потужністю 1000 л/год.
		Фільтрат	-	85 л (2%)	4 170,155 л	
		Відпрацьоване вугілля	122,155 кг	-	122,155 кг	На регенерацію
ТП 8. Друге концентрування						
9	ТП 8.1. Концентрування у вакуум-випарнику	Фільтрат	4 170,155 л	-	-	Вакуум-випарник потужністю 1000 л/год
		Концентрат (71%-й)	3 208 кг	160,4(5%)	3 047,6 кг	

Продовження таблиці 5.1.

1	2	3	4	5	6	7
ТП 9. Кристалізація цільового продукту						
10	ТП 9.1. Кристалізація лимонної кислоти	Концентрат	3 047,6 кг	-	-	Кристалізатор потужністю 5 м ³ /год
		Утфель	-	183(6%)	2 865 кг	
ТП 10. Відділення кристалів лимонної кислоти						
11	ТП 10.1. Центрифугування	Утфель	2 865 кг	-	-	Центрифуга потужністю 2 м ³ /год
		Кристали (з урахуванням 3% вологості)		143,25 кг (5%)	2 803,4 кг	
ТП 11. Сушіння цільового продукту						
12	ТП 11.1. Сушіння у конвективній сушарці	Кристали (з урахуванням 3% вологи)	2 803,4 кг	140,2 кг (5%)	-	Барабанна сушка потужністю 3000 кг/год
		Висушені кристали (вологість 0,5%)	-	-	1901 кг	

Продовження таблиці 5.1.

ПМВ 12. Пакування, маркування, відвантаження						
13	ПМВ 12.1. Просіювання	Висушені кристали (вологість 0,5%)	1 901 кг	-	-	Вібросито продуктивністю 1000 кг/час
		Просіяні кристали (вологість 0,5%)	-	38,02 кг (2%)	1 863 кг	
	ПМВ 12.2. Фасування, пакування, маркування цільового продукту	Просіяні кристали (вологість 0,5%)	1 863 кг	18,63 (1%)	1 844,4 кг	Фасувально-пакувальна лінія потужністю 4-6 мішків, межа пакування 10 – 50 кг.
		Упакований у мішки (25 кг) цільовий продукт	-	-	73 мішки	

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Відомості та специфікація обладнання, що зображене на апаратурній схемі, наведені в *табл. 6.1.*

Таблиця 6.1.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
СП-1	СП-мийка	1	Автоматична станція мийки призначена для автоматизованої мийки та дезінфекції технологічного обладнання та трубопроводів. М 60 для ємностей до 600 л, автоматика з пультом управління і екраном Siemens. Виробник: «Роза ветров» (Росія) ¹
ПЗ-2	Повітрозбірник	1	Повітрозбірник АІИ 017.000-01. Фірма: «Вектор-Кондвент». Обладнаний металевією сіткою, що слугує для видалення механічних забруднень. Робочий тиск: до 0,6 МПа (6 кгс/см ²) та до 1,2 МПа (12 кгс/см ²) [1]. Габаритні розміри: висота 219, ширина 602, довжина 398. ²
Ф-3	Фільтр грубої очистки повітря	1	Магістральний фільтр F 0010 DF грубого очищення повітря від частинок розміром до 10мкм. Продуктивність 1170 л/хв. Виробник: компанія «ОМІ» (Італія) ³
К-4	Компресор	1	Компресор Albert E65-R з прямим приводом. Продуктивність: 1000 л/хв. Потужність: 7,5 кВт. Виробник «АТМОС» Габаритні розміри: 1558x646x1300 (Росія) ⁴
Т-5	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря VENTS ОКВ 500x250-3. Максимальний робочий тиск 0,15 Мпа (15 бар). Виробник : «Vents» (Україна) ⁵

НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ					
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	
Розроб.	Вавілова А.І.				
Керівник	Тетеріна С.М.				
Консультант					
Зав.каф.	Пирог Т.П.				
РОЗДІЛ 6.Специфікація обладнання					
			Літ.	Арк.	Акрушіє
				74	74 149
Кафедра БТМ					

Продовження таблиці б.1.

Р-6	Ресивер	1	Ресивер ПЗВ 270-500-11-01.Об'єм 270 л, максимальний робочий тиск 11 бар. Габаритні розміри: 1540х500. Виробник: «Zelko» (Україна). ⁶
Т-7	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний нагрівач припливного повітря НКВ 400х200-4. Максимальний робочий тиск – 1,6 Мпа (16 бар) та максимальна робоча температура +100 °С. Виробник : «Vents» (Україна). ⁷
Ф-8	Фільтр тонкої очистки повітря	1	Магістральний фільтр ОМІ 04А.0180 тонкого очищення. Фільтруючий матеріал – поліестер. Ступінь очищення становить 0,01 мкм. Продуктивність 3000 л/хв. Габаритні розміри:28 х 9 см. Виробник: компанія «ОМІ» (Італія) ⁸
Ф-10, Ф-18, Ф-22, Ф-26, Ф-28, Ф-30, Ф-32, Ф-41, Ф-43	Індивідуальний фільтр очистки повітря	10	Фільтр повітряний Ultradept II P-SRF. Фільтруючий матеріал - боросилікат, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 %. Виробник: «Donaldson company» (США) ⁹
Д-9 Д-13	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Об'ємно-ваговий дозатор АД-200 БЖ, об'єм дозування від 60 л до 200 л. Виробник «УЗВ»(Україна) ¹⁰
Р-11	Реактор-змішувач для олеїнової кислоти	1	Реактор - змішувач об'ємом 150 л. Реактор оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм (150 об/хв). Максимальний робочий тиск: 0,5 МПа. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L. Габаритні розміри усієї конструкції: 550×862×1850 мм. Виробник: «Yqsock» Китай ¹¹

Продовження таблиці 6.1.

Н-12 Н-15	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий герметичний з нержавіючої сталі серії СТН. Продуктивність від 200 л/год., Фірми «Тарфло» ¹²
Р-14	Збірник для сульфатної кислоти	1	Збірник з робочим об'ємом 100 л. Оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм (150 об/хв), з підігрівом. Габаритні розміри усїєї конструкції: 450×660×1825 мм. Виробник: «Yiwu Changyi Machinery Equipment Co» Китай. ¹³
Д-16 Д-20	Об'ємно- ваговий дозатор	2	Об'ємно-ваговий дозатор з максимальним об'ємом дозування – 50 л. Виробник «Flintec» (Україна) ¹⁴
Р-17	Реактор- змішувач для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 50 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм(85 об/хв). Максимальний робочий тиск: 0,5 МПа. Габаритні розміри: 55×55×236 см. Матеріал: нержавіюча сталь: AISI 304. Виробник: «Ruian Xuanli Machinery» Китай ¹⁵ .
Н-19 Н-23	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий герметичний з нержавіючої сталі серії СТН. Продуктивність від 100 л/год., Фірми «Тарфло» ¹²
Р-21	Реактор- змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 40 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм(85 об/хв). Максимальний робочий тиск – 0,5 МПа. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Виробник «Єврохіммаш»(Україна) ¹⁵
Д-24	Об'ємно- ваговий дозатор	1	Об'ємно-ваговий дозатор АД-200 БЖ, об'єм дозування 200 л. Виробник «УЗВ»(Україна) ¹⁰

Продовження таблиці 6.1.

Р-25	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 500 л, оснащений паровою сорочкою та перемішувачим пристроєм (180 об/хв). Максимальний робочий тиск – 1,6 МПа. Матеріал: нержавіюча сталь 316(L). Габаритні розміри усїєї конструкції :800×800×1700мм. Виробник:«Hundom» (Китай) ¹⁶
Н-27	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий Sprut MRS 3. Продуктивність: 83 л/хв, потужність: 750 Вт. Габаритні розміри: 395x175x184 мм ¹⁷
Ін-29	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 10 л оснащений сорочкою, барботером та турбінною мішалкою. Матеріал: нержавіюча сталь 316L. Габаритні розміри усїєї конструкції:890×660×890 мм. Виробник: «BSS» (США) ¹⁸
Ін-31	Інокулятор	1	Інокулятор Ф-100 об'ємом 100 л, оснащений сорочкою, барботером та турбінною мішалкою потужністю 200-400 об/хв. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316(L). Габаритні розміри: 1300x700x1600. Виробник «Промвіт» (Україна) ¹⁹
Ін-33	Інокулятор	1	Інокулятор Ф-1000, робочий об'єм 1000 л. під замовлення оснащений сорочкою, барботером та турбінною мішалкою 180 об/хв. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316 (L). Габаритні розміри: 2800×1000. Виробник «Агромаш» Росія ²⁰
Д-34	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Об'ємно-ваговий дозатор АД-400 БЖ, максимальний об'єм дозування 400 л. Виробник «УЗВ»(Україна) ¹⁰

Продовження таблиці 6.1.

Р-35	Реактор-змішувач для приготування розчину підживлення	1	Робочий об'єм 25 м3. Реактор оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Максимальний робочий тиск 0,5 МПа. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Габаритні розміри: 2800х740х4530мм. Виробник : «МашХім» (Росія) ²¹
Н-36	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий Sprut TTDF 40-72 Продуктивність :667 л/хв , потужність: 7,5 кВт ²²
Д-37	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Об'ємно-ваговий дозатор АД-400 БЖ, максимальний об'єм дозування 400 л. Виробник «УЗВ»(Україна) ¹⁰
УБС-38	УБС (LXM) - 5	1	Установка безперервної стерилізації потужністю 5 м3/год. Температура стерилізації: 135°C. Тиск пари: 0,5 МПа. Тиск стиснутого повітря: 0,4 МПа. Габаритні розміри: 2500х1500х2000. Виробник : «Saideli» (Китай) ²⁴
Ін-42	Інокулятор	1	Інокулятор Ф-10000 під замовлення оснащений сорочкою, барботером, турбінною мішалкою. 23 Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316. Габаритні розміри: розмір баку: 2300х2440мм, висота 5050 мм. Виробник: «Frings» (Німеччина) ^{25 26}
Д-39	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Об'ємно-ваговий дозатор, максимальний об'єм дозування – 1000 л. Виробник «Delta Rozliv» (Україна). ²⁷

Продовження таблиці 6.1.

Р-40	УБС(LXM) - 20	1	Установка безперервної стерилізації потужністю 20. Температура стерилізації: 135°C. Тиск пари: 0,5 МПа. Тиск стиснутого повітря: 0,4 МПа. Габаритні розміри: 3000х2500х3000.Виробник «Saideli» (Китай) ²⁴
Ф-44	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 100000 л оснащений сорочкою, барботером та турбінною мішалкою. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316. Габаритні розміри: діаметр 340, висота всієї конструкції 13690 м. Виробник: «Frings» (Німеччина) ^{26 28}
П-46	Повітрозабірник		Повітрозабірник АІІ. Обладнаний металевою сіткою, що слугує для видалення механічних забруднень. Робочий тиск: 0,6 МПа. Габаритні розміри, мм: висота 426, ширина 219. Виробник: Вектор Кондвент (Росія) ²
Ф-47	Фільтр грубої очистки		Фільтр грубої очистки повітря G2-66-25/С. Площа фільтруючого матеріалу: 0,36 м ² , номінальна потужність повітря: 3400 м ³ /год. Тип матеріалу: скловолокно.Габаритні розміри,мм:592×592.Виробник:Елвент(Росія) ²⁹
Т-48	Теплообмінник нагрівач		Теплообмінник водяний ТЕW 02.80-50. Площа поверхості теплообміну: 12, 9 м ² . Витрата теплоносія (max), м ³ / год: 6,2. Габаритні розміри (Д*Ш*В): 932×150×540 мм. Виробник: СЭВ (Росія) ³⁰
Ф-50	Фільтр тонкої очистки повітря		Вугільний фільтр тонкого очищення. Фільтруючий матеріал: гранульоване активоване вугілля. Потужність: 1000 м ³ /год. Габаритні розміри,мм: 592х592х292. Виробник: Теко (Україна) ³¹

Продовження таблиці 6.1.

З-51	Збірник для культуральної рідини	1	Об'єм 50 м ³ . Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Робочий тиск: 0,095 МПа. Габаритні розміри (Ш*В), мм: 3869×11175. Виробник: Роза ветров (Росія) ³²
Н-52	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий КМ 70. Продуктивність: від 1 до 65 м ³ /год. Матеріал: в корпусі з фторопласта (PVDF), служить для перекачування хімічно активних середовищ. Виробник: Debet (Італія) ³³
Ф-53 Ф-59	Камерно-мембранний фільтр-прес	1	Камерно-мембранний фільтр прес Flagma. Потужність: 5000 м ³ /год. Площа фільтрації 30 м ² . Габаритні розміри плит(мм×мм): 800×800×60×65. Матеріал фільтрованих плит: поліпропілен. Виробник: Чекс (Росія) ³⁴
Д-54	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Об'ємно-ваговий дозатор АД-400 БЖ, об'єм дозування 400 л. Виробник «УЗВ»(Україна) ³⁵
З-55	Збірник для зберігання вапняного молока	1	Об'ємом 20 м ³ . Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Робочий тиск: 0,5 МПа. Габаритні розміри(Ш*В),мм:2800×8115.Виробник: Стройторгсервис (Україна) ³⁶
Н-56	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий КМ 70. Продуктивність: від 1 до 65 м ³ /год. Матеріал: в корпусі з поліпропілену (PP) або фторопласта (PVDF), служить для перекачування хімічно активних середовищ. Виробник: Debet (Італія) ³³
Р-57	Реактор для обробки лимонної кислоти вапняним молоком	1	Об'єм 63 м ³ . Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Реактор оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм (150 об/хв). Робочий тиск: 0,5 МПа. Габаритні розміри (Ш*В),мм: 3200×13065. Виробник: Дзержинськ Химмаш (Україна) ³⁷

Продовження таблиці 6.1.

Н-58	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий продуктивністю: від 1 до 75 м ³ /год. Матеріал: в корпусі з поліпропілену (PP) або фторопласта (PVDF), Перекачує хімічно активні рідини в'язкістю до 500 сПз і можливим вмістом твердих частинок до 9 мм. Виробник: Debet (Італія) ³⁸
Д-60	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Об'ємно-ваговий дозатор АД-400 БЖ, максимальний об'єм дозування 400 л. Виробник «УЗВ»(Україна) ³⁵
Р-61	Реактор для отримання розчину лимонної кислоти та розкладу	1	Об'єм 16 м ³ . Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Реактор оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм (150 об/хв). Робочий тиск: 0,6 МПа. Габаритні розміри (Ш*В),мм: 3108×7115.Виробник: Дзержинськ Химмаш (Україна) ³⁹
Н-62	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий КМ 70. Продуктивність: від 1 до 65 м ³ /год. Матеріал: в корпусі з фторопласта (PVDF), служить для перекачування хімічно активних середовищ. Виробник: Debet (Італія) ³³
Ф-63	Барабанний вакуум-фільтр	1	Барабанний вакуум-фільтр продуктивністю 2000 л/год. Габаритні розміри конструкції (Д*Ш),мм: 5200×2100. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Виробник: Letina (Україна) ⁴⁰
ВВ-64	Вакуум-випарний апарат		Вакуум-випарний апарат ВВА-10000. Потужністю 5000 л/год. Частота обертів мішалки – 30 об/хв. Має у своєму складі вакуумний насос. Робочий тиск у паровій рубашці: 0,5 МПа. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Габаритні розміри(Д*Ш*В),мм: під замовлення. Виробник: Молком (Росія) ⁴¹

Продовження таблиці 6.1.

Р-66	Реактор для освітлення розчину лимонної кислоти	1	Об'єм 6,3 м ³ . Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Реактор оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм Робочий тиск: 0,6 МПа. Габаритні розміри (Ш*В),мм:2220×4555.Виробник: Держинськ Химмаш (Україна) ³⁷
Н-67	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий КМ 70. Продуктивність: від 1 до 65 м ³ /год. Матеріал: в корпусі з фторопласта (PVDF), служить для перекачування хімічно активних середовищ. Виробник: Debet (Італія) ³³
Ф-68	Барабанний вакуум-фільтр	1	Барабанний вакуум-фільтр продуктивністю 1000 л/год. Габаритні розміри конструкції (Д*Ш),мм: 4700×1900. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Виробник: Letina (Україна) ⁴⁰
ВВ-69	Вакуум-випарний апарат	1	Вакуум-випарний апарат ВВА-10000. Потужністю 1000 л/год. Має у своєму складі вакуумний насос. Робочий тиск: 0,25 МПа. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Габаритні розміри (Д*Ш*В), мм: 1750х1275х2840 під замовлення. Виробник: Мидас-А (Україна) ⁴²
К-70	Кристалізатор	1	Кристалізатор продуктивністю 5 м ³ /год. Потужність: 10,5 кВт. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Габаритні розміри: діаметр 400 мм, висота 3500 мм. Виробник: Milk System (Україна) ⁴³
Н-71	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий продуктивністю: від 1 до 75 м ³ /год. Перекачує хімічно активні рідини в'язкістю до 500 сПз і можливим вмістом твердих частинок до 9 мм. Виробник: Debet (Італія) ³⁸

Продовження таблиці 6.1.

Ц-72	Центрифуга	1	Осаджувальна шнекова центрифуга продуктивністю 2 м ³ /год. Потужність 5,5 кВт. Габаритні розміри (Д*Ш*В), мм: 1455x1080x790. Виробник: Центробрежные системы (Москва) ⁴⁴
ШТ-73 ШТ-75	Шнековий транспортер	2	Шнековий транспортер продуктивністю: 3,5 м ³ /год. Радіус вигину: 2600 мм. Потужність: 1,5 кВт. Матеріал зовнішньої труби: нержавіюча сталь. Виробник: Технік (Україна) ⁴⁵
С-74	Барабанна сушарка	1	Барабанна сушарка Vangton. Продуктивність: 3000 кг/год. Потужність: 22 кВт. Габаритні розміри: діаметр барабана 1,8 м. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Виробник: Китай ⁴⁶
ВС-76	Вібраційне сито	1	Вібросито продуктивністю: 1000 кг/год. Потужність: 0,47 кВт. Габаритні розміри (Д*Ш*В), мм: 2070x1310x1070. Виробник: Bronto (Україна) ⁴⁷
ФПМ-77	Фасувально пакувальна машина	1	Фасувально пакувальна машина у мішки. Маса дозування: від 10 кг до 50 кг. Точність дозування 0,5-1%. Продуктивність 4-6 уп./хв. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316. Виробник: Техноаги (Україна) ⁴⁸

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

1. <https://www.rozavetrov.ua/index.php?cPath=332>
2. <http://condvent.ru/vozduhosborniki.html>
3. https://www.autom.com.ua/ua/oborudovanie_sto/kompressory_fini/filter_ochistki_vozduha/f0010-df/
4. <https://top-compressor.ru/catalog/vintovye-kompressory/kompressor-vintovoy-atmos-albert-e65-r/>
5. <https://vent-market.com.ua/shop/product/vents-okv-500h250-3>
6. https://www.zelko.ua/vozduhopodgotovka/resivery?gclid=Cj0KCQjw59n8BRD2ARIsAAmgPmLOWoJxYq3NSyhyGYUoGyBZKfgfJWHrbYbDCgBBFoFVeNMJWKdz7jlaAkpcEALw_wcB
7. <https://vents-shop.com.ua/vodyanoy-nagrevatel-nkv-400h200-4/>
8. <http://otvertki.com.ua/p/786506135-hf-0030-3-4-filtr-tonkoy-ochistki-szhatogo-vozdruha-omi-04a-0180-hg00-h-0000-italiya/>
9. <https://www.ahequip.net/wp-content/uploads/2015/07/ultrafilter-sterile-filter-PSRF.pdf>
10. <https://vesmaster.com.ua/images/dozators/doz5.html>

11. <https://a6libaba.en.made-in-china.com/product/YZnQIRIAOJVi/China-Stainless-Steel-Industrial-Mixing-Tank.html>
12. https://tapflo.ua/images/pdf_uk/cti_and_cth_web_2014.pdf
13. <https://a6libaba.en.made-in-china.com/product/YZnQIRIAOJVi/China-Stainless-Steel-Industrial-Mixing-Tank.html>
14. <https://technowagy.com.ua/ru/product/vesovoj-diskretnyj-doзатор-rashodomer-dlya-zhidkih-2/>
15. https://www.alibaba.com/product-detail/promotional-price-50l-pilot-reactor-made_60308640783.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.30f64751qO0Now
16. http://euomash.kiev.ua/ua/home_ua.php
16. https://www.alibaba.com/product-detail/200-liter-white-latex-adhesive-reaction_1600114673121.html
17. <https://cnkosun.en.made-in-china.com/product/mbSnRiWjXCTe/China-20L-30L-50L-Stainless-Steel-and-Glass-Industrial-Fermentor-Bioreactor.html>
17. <https://trudovik.com.ua/ua/shop/product/nasos-centrobezhnyj-sprut-mrs-3>
18. file:///C:/Users/chaun/Downloads/CATALOG_Bioreactor_System_Innova_2016_мiнiферментери.pdf
19. <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rabochim-obemom-100-l/>
20. <http://npkagromash.ru/fermentator.html>
21. <https://mash-him.ru/promyshlennye-apparaty>
22. <https://in-green.com.ua/sprut/sprut-ttdf-40-72>
23. <https://mash-him.ru/promyshlennye-apparaty>
24. <http://sdlcentrifuge.ru/9-continuous-sterilization-system/192767/>
25. <https://russian.alibaba.com/product-detail/10000-liter-12000-liters-yoghurt-fermenter-62534414415.html?spm=a2700.8699010.normalList.53.3c5b1e83nBBdAx>
26. <https://www.frings.com/PROREACT-B-Large-Scale.181+M52087573ab0.0.html>
27. <https://delta-rozliv.com.ua/p623392948-doзатор-vesovoj-dlya.html>
28. <https://chimmash.ru/ferment.htm>
29. <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-g4-iz-steklovolokna/>
30. <https://sev-vent.ru/teploobmenniki/tew-02-80-50>
31. <https://sev-vent.ru/teploobmenniki/tew-02-80-50>
32. <https://www.rozavetrov.ua/index.php?cPath=341>
33. https://www.debem.com.ua/nasos/km/km_70/
34. <https://blagoveshchensk.flagma.ru/kamerno-membrannyj-filtr-press-o2279503.html>
35. <https://vesmaster.com.ua/images/dozators/doz5.html>
36. <https://stprom.com.ua/p1016501611-reaktor-20000-litrov.html>
37. <https://chimmash.ru/meshalka.htm>
38. https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/centrobezhnye_nasosy/mb_180/
39. <https://chimmash.ru/meshalka.htm>
40. http://www.letina.in.ua/?page_id=136
41. <https://molkom22.ru/tehnologicheskoe-oborudovanie/vakuum-vyparnye-ustanovky/vakuum-vyparnoj-apparat/>
42. <https://ub.ua/ru/market/view/679976/all/vakuum-vyparnoy-apparat-mzs-320/>
43. <https://www.milk-system.com/produksiia/okholodzhuvalno-krystalizatsiina-ustanovka#foto>
44. <https://www.centsys.ru/produksiya/tsentrifugi-ogsh.html>
45. <https://technik.ua/uk/zaglushka/produksiya/shnekovi-transporteri-spiralni-gnuchki-pruzhinni-dlya-tsukru-soli-ta-inshikh-abrazivnikh-produktiv/shnek-spiralnij-gnuchkij-pruzhinnij-dlya-tsukru-soli-ta-inshikh-abrazivnikh-produktiv>
46. <https://hydromarket.com.ua/p711624225-barabannaya-sushilka-rd1818.html>
47. <https://bronto.ua/ru/katalog-mashin-2/shelushilki-i-drobilki/vibrosito-vs-1/>
48. <https://technowagy.com.ua/products/fasovochnaya-mashina-dlya-sypuchih-produktov-v-otkrytye-meshkido-50-kg/>

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Технологічна схема біосинтезу лимонної кислоти включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, підготовка та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез лимонної кислоти *Aspergillus niger EB-12*).

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Приготування миючих та дезінфікуючих засобів

ДР 1.1.1. Приготування робочого (2%) розчину «Міродез Універ»

Для миття обладнання та комунікацій необхідно приготувати мийний розчин. Зі складу надходить концентрат «Міродез Універ», який розводять до потрібної концентрації (2%). Відомо, що для отримання 10 л 2-% робочого розчину необхідно взяти 9,8 літрів води і додати 200 мл концентрата [48,76]. У емальовану ємність вносять готовий концентрат «Міродез Універ» та додають холодну водопровідну воду, після чого інтенсивно перемішують при частоті обертів 50-100 об/хв.

ДР 1.1.2. Приготування робочого (1%) розчину «Естер Дез»

Зі складу надходить концентрат «Естер Дез», який розводять водою до концентрації 1%. У емальовану ємність вносять готовий концентрат та додають підігріту до температури 60°C водопровідну воду, після чого інтенсивно перемішують при частоті обертів 50-100 об/хв.

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень

Щоденне прибирання проводять вологим способом після кожного робочого дня у виробничих, лабораторних, підсобних і побутових приміщеннях.

					НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Вавілова А.І.			РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Тетеріна С.М.					85	85 149
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.						

При проведенні вологого прибирання використовують приготований 2-% розчин «Міродез Універ» (від ДР 1.1.2).

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання приміщень

Генеральне прибирання проводять один раз в місяць вже приготовленим 2-% розчином «Міродез Універ». Під час прибирання миють вікна, поверхні, підлогу, робочі інструменти.

ДР 1.3. Підготовка технічного обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття обладнання

Для миття обладнання використовують СІР-мийку (СІП-1) та робочий 1-% розчин «Естер Дез» (від ДР 1.1.1)

ДР.1.3.2. Ополіскування обладнання

Ополіскування обладнання здійснюється водою, протягом 20-30 хвилин.

ДР 1.3.3. Технічний огляд

Перед початком технологічного процесу перевіряють технологічний одяг персоналу на наявність механічних пошкоджень або забруднень, для запобігання контамінації.

ДР 1.3.4. Перевірка на герметичність

Під час перевірки, у апараті закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря, при значенні тиску ($P = 0,1 - 0,2$ МПа). Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують покази манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважається, що апарат герметичний.

Також може здійснюватися пошук нещільностей на апараті та у місцях з'єднання запірної арматури з комунікаціями за допомогою галогенових речовин. Для цього в апарат вносять невелику кількість леткої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон), і закривають усю запірну арматуру. Апарат нагрівають до температури 80°C і збільшують

тиск до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість операції – 1,5-2 год. У разі виявлення неущільнень здійснюють їх ліквідацію.

ДР 1.3.5. Стерилізація обладнання

Процес стерилізації поділяють на три етапи: нагрівання апарату, стерилізація, охолодження.

Під час нагрівання у сорочку апарату подають глуху пару і прогрівають апарат до температури 80°C. Відкривають усю запірну арматуру і подають гостру пару безпосередньо в апарат через барботер або нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарата. При досягненні в апараті температури стерилізації 130-135 °С закривають усю запірну арматуру, крім парової, і витримують 1,5 год (тиск 0,2 МПа). При стерилізації апарата паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря. Для охолодження спочатку закривають усю запірну арматуру подачі пари в апарат і потім у сорочку подають холодну воду. В апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження триває приблизно 3,5 год. до досягнення температури 30-40 °С і надлишкового тиску $P = 0,003-0,005$ МПа

ДР 2. Підготовка стерильного технологічного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрозбірник (ПЗ-2) на висоті 18 м.

ДР 2.2. Грубе очищення повітря

Повітря очищається від грубого аерозолю (пилу) на фільтрі грубої очистки (Ф-3). Ступінь очищення $E=70\%$.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Повітря стискають у турбокомпресорі (К-4) до 0,4 МПа. Стиснення повітря в компресорі призводить до підвищення його температури до $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ і збільшення вмісту вологи на одиницю об'єму.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Для відведення надлишкової вологи стисненого повітря його «переохолоджують» в охолоджувачі повітря (Т-5) до температури $18\text{-}19\text{ }^{\circ}\text{C}$ і подають на ресивер (Р-6) для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи ($W = 60\%$).

ДР 2.5. Нагрівання повітря

З метою запобігання утворення конденсату пари, на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, охоложене повітря у теплообміннику (Т-7) нагрівають за допомогою водяного нагрівача припливного повітря до $30\text{-}35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі (Ф-8), в якому фільтрувальним матеріалом є поліестер. Ступінь очищення становить 95% .

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Кожен інокулятор, ферментер та реактор оснащують індивідуальним фільтром (Ф-10, Ф-18, Ф-22, Ф-26, Ф-28, Ф-30, Ф-32, Ф-35, Ф-41, Ф-43), фільтруючим матеріалом якого є боросилікат. Ступінь очищення становить $E = 99,995\%$.

ДР 3. Підготовка та стерилізація піногасника

ДР 3.1 Підготовка та стерилізація олеїнової кислоти

У реактор (Р-11) об'ємом 150 л за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-10) вносять 125 л олеїнової кислоти, вмикають перемішуючий пристрій та стерилізують шляхом подачі гострої пари в ферментер при температурі 120°C, упродовж 30 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація підживлювального розчину меляси

ДР 4.1. Приготування розчину меляси

У реактор (Р-35) об'ємом 25 м³ за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-34) вносять 3682 кг меляси, додають 15416 л питної води та вмикають перемішуючий пристрій.

ДР 4.2. Підкислення розчину меляси

Для підкислення меляси у реактор (Р-35) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-34) вносять 38 л 1 н сульфатної кислоти, вмикають перемішуючий пристрій.

ДР 4.3. Освітлення розчину меляси

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-34) у гарячий розчин меляси який міститься у реакторі (Р-35) подають 1,9 кг фероціаніду калію для освітлення та осадження важких металів. Даний розчин витримують протягом 24 години при температурі не нижче 25° С, і перемішують при 150 об/хв протягом 10 хв.

ДР 4.4. Стерилізація розчину меляси

Вже освітлений та попередньо підготовлений розчин меляси стерилізується в УБС-5 (УБС-38) при температурі 112°C впродовж 30 хв.

ДР 5. Підготовка повітря для барабанної сушарки

ДР 5.1 Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють на висоті 18 м за допомогою пристрою для забору повітря (ПЗ-46).

ДР 5.2 Очистка від грубих домішок

Очистку повітря здійснюють у фільтрі грубої очистки (Ф-47). При проходженні повітря через фільтр грубого очищення затримується пил та механічні частки, а очищене повітря надходить у теплообмінник-нагрівач (Т-3). Ступінь очищення $E = 70 \%$.

ДР 5.3 Нагрівання повітря

Нагрівання повітря відбувається у теплообміннику-нагрівачі до $70 \text{ }^\circ\text{C}$. (Т-48).

ДР 5.4 Очищення повітря на фільтрі тонкої очистки

Очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі (Ф-50). Ступінь очищення становить 95% . Далі очищене повітря прямує на стадію сушіння цільового продукту (до ТП 19.1.)

ДР 6. Приготування і стерилізація запасного розчину

ДР 6.1. Приготування і стерилізація запасного розчину монофосфату калію.

На технічних вагах зважують 6,7 г монофосфату калію, вносять у колбу об'ємом 250 мл і розчиняють у 100 мл дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі $131 \text{ }^\circ\text{C}$ упродовж 40 хв.

ДР 7. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 7.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Для приготування посівного матеріалу на качалочних колбах необхідно приготувати 460 мл поживного середовища. Вміст компонентів для середовища наведено у *табл. 7.1*

Таблиця 7.1.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 460 мл поживного середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, мг/мл	Вміст компонента у 460 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Меляса	60	27,6	А	430
Вода		402		
СФР	4	1,8	Б	28,6
Вода		26,8		
Запасний р-н		1,07		
Разом:		460		460

ДР 7.1.1 Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 27,6 г меляси та вносять у відтаровану колбу об'ємом 1 л, додаючи 402 мл дистильованої води, і перемішуючи. У приготовлений розчин додають 0,86 мл сірчаної кислоти та нагрівають при 90°C протягом 15 хв. Вже у гарячий розчин додають зважений на аналітичних вагах, 0,043 г фероціанід калію для освітлення та осадження іонів важких металів. Даний розчин витримують 24 години при температурі не нижче 25°C і центрифугують при 3000 об/хв протягом 10 хв. Колбу з приготовленим розчином закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хв.

ДР 7.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б.

На технічних вагах зважують 1,8 г гідролізату курячого пір'я. Наважку поміщають у відтаровану колбу об'ємом 150 мл, додають 26,8 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хв.

ДР 7.2. Приготування і стерилізація середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л.

Для вирощування інокуляту необхідно 4,6 л поживного середовища. З урахуванням рідкого посівного матеріалу, об'єм якого 0,46 л та конденсату, що утворюється в процесі стерилізації, загальна кількість води, яку необхідно додати для приготування середовища – 3,4 л. Вміст компонентів для приготування 4,6 л середовища наведено в *табл. 7.2*

Таблиця 7.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4,6 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 4,14 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Меляса	60	0,24	А	3,44
Вода		3,2		
СФР	4	0,016	Б	0,226
Вода		0,21		
Запасний р-н KH_2PO_4		0,0086		
Конденсат		0,414		
Разом:		4,14		4,14

ДР 7.2.1 Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 240 г меляси та вносять у відтаровану колбу об'ємом 5 л, додають 3,2 л дистильованої води та перемішують. У приготовлений розчин додають 6,8 мл сірчаної кислоти та нагрівають при 90°C протягом 15 хв. Вже у гарячий розчин подається зважений на аналітичних вагах 0,34 г фероціанід калію для освітлення та осадження іонів важких металів. Даний розчин витримують 24 години при температурі не нижче 25°C і центрифугують при 3000 об/хв протягом 10 хв. Колбу з

приготовленим розчином закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв

ДР 7.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б.

На технічних вагах зважують 16 г гідролізату курячого пір'я. Наважку поміщають у відтаровану колбу об'ємом 250 мл, додають 210 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°С упродовж 30 хв.

ДР 7.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

Для вирощування інокуляту необхідно 45,9 л поживного середовища. З урахуванням рідкого посівного матеріалу, об'єм якого становить 4,59 л, конденсату, що утворюється в процесі стерилізації, загальна кількість води, яку необхідно додати для приготування середовища – 34,6 л. Вміст компонентів для приготування 45,9 л середовища наведено в *табл. 7.3.*

Таблиця 7.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 45,9 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 41,31 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Меляса	60	2,4	А	34,8
Вода		32,4		
СФР	4	0,16	Б	2,32
Вода		2,16		
Запасний р-н КН ₂ РО ₄		0,086		
Конденсат		4,1		
Разом:		41,31		41,31

ДР 6.7.1 Приготування та стерилізація композиції А.

Для приготування розчину у реактор (Р-17) об'ємом 50 л за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-16) вносять 2,4 кг меляси та через провідні комунікації подають 34,8 л питної води. Вже у приготовлений розчин за допомогою насоса перекачують близько 70 мл сульфатної кислоти та нагрівають. 0,37 г фероціаніду калію, зваженого на аналітичних вагах, подають у гарячий розчин для освітлення та осадження іонів важких металів. Даний розчин витримують 24 години при температурі не нижче 25°C і перемішують при 150 об/хв, протягом 10 хв. Стерилізація проходить при температурі 112°C упродовж 30 хв.

ДР 6.7.2 Приготування та стерилізація композиції Б.

На технічних вагах зважують 160 г гідролізату курячого пір'я. Наважку поміщають у відтаровану колбу об'ємом 5 л, додають 2,16 л дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хв.

ДР 7.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м³.

Для вирощування інокуляту необхідно 454,5 л поживного середовища. З урахуванням рідкого посівного матеріалу, об'єм якого становить 45,45 л, конденсату, що утворюється в процесі стерилізації, загальна кількість води, яку необхідно додати для приготування середовища – 342 л. Вміст компонентів для приготування 454,5 л середовища наведено в *табл. 7.4*

Таблиця 7.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 454,5 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 409 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Меляса	60	24,5	А	345
Вода		320		
CFP	4	1,63	Б	23
Вода		21,3		
КН ₂ РО ₄	0,15	0,06	В	0,86
Вода		0,8		
Конденсат		40,9		
Разом:		409		409

ДР 7.4.1 Приготування та стерилізація композиції А.

У реактор (Р-25) об'ємом 500 л за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-24) вносять 24,5 кг меляси та через провідні комунікації - 345 л питної води, вмикаючи перемішувач. У розчин при нагріванні подають 0,689 л 1 н сульфатної та 34,45 г фероціаніду калію для освітлення меляси. Приготовлений розчин витримують 24 години при температурі не нижче 25°C і перемішують при 150 об/хв, протягом 10 хв. Стерилізація відбувається подачею гострої пари у ферментер та сорочку ферментеру при температурі 112°C упродовж 30 хв.

ДР 7.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б.

У реактор (Р-21) об'ємом 40 л за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-20) вносять 1,63 кг гідролізату курячого пір'я та через провідні комунікації подають 23 л питної води. Стерилізація відбувається подачею гострої пари у ферментер та сорочку ферментеру при температурі 112°C упродовж 30 хв.

ДР 7.4.3 Приготування та стерилізація композиції В.

На технічних вагах зважують 60 г монофосфат калію. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2 л, додають 800 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

ДР 7.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 м³.

Для вирощування інокуляту необхідно 4,54 м³ поживного середовища. З урахуванням рідкого посівного матеріалу, об'єм якого становить 0,45 м³, конденсату, що утворюється в процесі стерилізації, загальна кількість води, яку необхідно додати для приготування середовища – 3010 л. Вміст компонентів для приготування 4,54 м³ середовища наведено в *табл. 7.5*

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4,54 м³ середовища

Таблиця 7.5

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 4090 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Меляса	60	245,4	А	4090
СФР	4	16,3		
КН ₂ РО ₄	0,15	0,61		
Конденсат		818		
Разом:		4090		

ДР 7.5.1 Приготування та стерилізація композиції А.

У реактор, який входить до складу УБС – 5 м³, за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-37) вносять 245,4 кг меляси та через провідні комунікації подають 3060,4 л питної води. У розчин меляси при перемішуванні за допомогою відцентрового насоса перекачують 6,1 л сульфатної кислоти та нагрівають до 90°C. Далі вносять попередньо

зважений на технічних вагах фероціанід калію у кількості 306,04 г для освітлення меляси. На наступному етапі у реактор через об'ємно-ваговий дозатор вносять 16,3 кг гідролізату курячого пір'я та 0,61 кг монофосфату калію, додають 1030 л питної води та вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізація розчину відбувається в УБС-5, при температурі 131°C.

ДР 7.6. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури ферментері об'ємом 100 м³.

Для виробничого біосинтезу необхідно 45,45 м³ поживного середовища. З урахуванням рідкого посівного матеріалу, об'єм якого 4,54 м³, конденсату, що утворюється в процесі стерилізації, та розчину підживлення об'ємом 19097,7 л загальна кількість води, яку необхідно додати для приготування середовища – 14787,3 л. Вміст компонентів для приготування 45,45 м³ середовища наведено в *табл. 7.6*

Таблиця 7.6

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 45,45 м³ середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 40,91м³середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Меляса	60	2455	А	21812
CFP	4	163,6		
КН ₂ РО ₄	0,15	6,1		
Вода		14787,3		
Конденсат		4400		
Разом:		21812		

ДР 7.6.1 Приготування та стерилізація композиції А.

У реактор, який входить до складу УБС – 20 м³ за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-39) вносять 2455 кг меляси, та через провідні комунікації подають 13831 л питної води. У розчин меляси, при перемішуванні, за допомогою відцентрового насоса подають 32 л сульфатної кислоти та нагрівають до 90°C. Далі вносять попередньо

зважений на технічних вагах фероціанід калію у кількості 3,2 г для освітлення меляси. На наступному етапі у реактор через об'ємно-ваговий дозатор (Д-39) вносять 163,6 кг гідролізату курячого пір'я та 6,1 кг монофосфату калію, додають 956,3 л питної води та вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізація відбувається при температурі 131°C протягом 1 години.

ТП 8. Підготовка посівного матеріалу

ТП 8.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру підтримують на косому картопляно-декстрозному агарі (КДА) при 4°C. Пересіви культури здійснюються кожні 3-4 місяці, в асептичних умовах.

ТП 8.2. Отримання робочої культури на агаризованих середовищах.

Культуру, що зберігається в пробірках зі скошеним КДА, пересівають на чашки Петрі. Через 3 доби роблять пересів культури з чашки Петрі на необхідні 5 пробірок зі скошеним КДА, і вирощують у термостаті 72 год. при температурі 30 °C.

ТП 8.3. Одержання робочої культури

Для приготування конідиальної суспензії *A. niger* EB – 12 штам вирощують в пробірках зі скошеним КДА при 30°C протягом 3 днів. Конідиальну суспензію готують додаванням 10 мл стерильної дистильованої води, що містить 0,1% Твін – 80.

ТП 8.4. Вирощування культури в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 1 л вносять простерилізовані розчини компонентів (*від ДР 7.1.1; ДР 7.1.2*) та вже раніше приготований і простерилізований запасний розчин монофосфату калію. Перемішують і розливають стерильним мірним циліндром (200 мл) по 100 мл у 3 качалочні колби об'ємом 750 мл. У пробірку, з робочою культурою *A. niger* EB-12 вирощеною на скошеному КДА, додають 10 мл дистильованої води, що містить 0,1% Твін-80 для отримання конідиальної суспензії, і переносять у

поживне середовище. Для засіву однієї колби використовують конідіальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Гриб вирощують у колбах на качалці (150 об/хв) упродовж 72 годин. Після закінчення процесу культивування здійснюють мікробіологічний контроль. Після вирощування в асептичних умовах, все зливають в одну колбу і передають (до ТП 8.5.) для вирощування культури в малому інокуляторі об'ємом 10 л.

ТП 8.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л

В інокулятор (Ін-29) через засівну колбу вносять композицію композицію А (від ДР 7.2.1), композицію Б (від ДР 7.2.2) та раніше приготований і простерилізований запасний розчин монофосфату калію. Далі через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 8.4.). Вирощують впродовж 72 годин при температурі 30°C, швидкість перемішування – 100-150 об/х. В якості піногасника для запобігання піноутворення та контамінації поживного середовища у інокулятор подається олеїнова кислота (від ДР 4.1.). Піногасник вноситься в розрахунку 0,1% від загального об'єму поживного середовища.

Періодично (кожні 8 годин) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю. Далі культуру передають у інокулятор об'ємом 100 л.

ТП 8.6. Вирощування культури в великому інокуляторі об'ємом 100 л

В інокулятор (Ін-31) через засівну колбу вносять композицію Б (від ДР 7.3.2) та запасний розчин монофосфат калію (від ДР 6.1.) далі за допомогою відцентрового насосу (Н-19) подають композиції А (від ДР 7.3.1.) та посівний матеріал через трубу перетискування (від ТП 8.5.). В апарат за допомогою відцентрового насосу подається піногасник – олеїнова кислота (від ДР 3.1.) в розрахунку 0,1% від загального об'єму поживного середовища. Температура культивування 30 °С, швидкість перемішування становить 150 об/хв. Тривалість культивування становить 72 год.

Періодично (кожні 8 годин) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю. Культуру подають в інокулятор об'ємом 1000 л.

ТП 8.7. Вирощування культури в великому інокуляторі об'ємом 1 м³.

У інокулятор (Ін-33) через засівну колбу вносять композицію В (від ДР 7.4.3.), далі за допомогою відцентрових насосів (Н-27; Н-23) подають композицію А (від ДР 7.4.1), композицію Б (від ДР 7.4.2) та посівний матеріал через трубу перетискування (від ТП 8.6). В апарат за допомогою відцентрового насоса подається піногасник – олеїнова кислота (від ДР 3.1) в розрахунку 0,1% від загального об'єму поживного середовища. Температура культивування 30°C, швидкість перемішування становить 150 об/хв. Тривалість культивування становить 72 год.

Періодично (кожні 8 годин) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю.

ТП 8.8. Вирощування культури в великому інокуляторі об'ємом 10 м³.

У попередньо інокулятор (Ін-42) об'ємом 10 м³ перекачують простерилізоване в УБС-5 поживне середовище (від ДР 7.5.1). Далі через трубу перетискування перекачують посівний матеріал (від ТП 8.7). В апарат за допомогою відцентрового насоса подається піногасник (від ДР 3.1) в розрахунку 0,1% від загального об'єму поживного середовища. Температура культивування 30°C, швидкість перемішування становить 150 об/хв. Тривалість культивування становить 72 год.

Періодично (кожні 8 годин) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю.

ТП 9. Виробничий біосинтез

ТП 9.1. Виробничий біосинтез в ферментері об'ємом 100 м³

У попередньо простерилізований ферментер (Ф-44) об'ємом 100 м³ перекачують за допомогою насоса простерилізоване в УБС – 20 поживне середовище (від ДР 7.6.1). Далі через трубу перетискування перекачують

посівний матеріал (від ТП 8.8). Через 48 годин культивування здійснюють підживлення простерилізованого розчину меляси порціями по 736,380 кг кожні 24 год. Загальна кількість порцій – 5. В якості піногасника для запобігання піноутворення та контамінації поживного середовища у ферменер подається олеїнова кислота (від ДР 3.1.). Піногасник вноситься в розрахунку 0,1% від загального об'єму поживного середовища. Температура культивування 30°C, рН=6, швидкість перемішування становить 150 об/хв. Тривалість культивування становить 168 год.

Періодично (кожні 8 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю.

ТП 10. Зберігання культуральної рідини

ТП 10.1. Зберігання

Культуральна рідина надходить з ферменеру до збірника культуральної рідини (З-51) та направляється на подальше отримання цільового продукту за допомогою насосу (Н-52). Зберігання температури проходить при 10°C.

ТП 11. Відокремлення біомаси

ТП 11.1. Відділення біомаси на фільтр-пресі

Біомасу гриба *Aspergillus niger* EB-12 відділяють за допомогою фільтр-пресу (Ф-53). Далі фільтрат культуральної рідини перекачується самоплином на стадію отримання цитрату кальцію (до ТП 12.1).

ТП 12. Отримання лимонної кислоти у вигляді цитрату кальцію

ТП 12.1. Отримання цитрату кальцію

Відділений від міцелію фільтрат культуральної рідини обробляють вапняним молоком до рН 7 при температурі 90°C, для осадження малорозчинного цитрату кальцію. Для цього фільтрат доводять до кипіння і, у реактор (Р-57) подають 15 916,54 л вапняного молока, при безперервно працюючій мішалці (близько 1500 об/хв). Далі отримана суспензія перекачується за допомогою відцентрового насоса (Н-58) на фільтрування.

ТП 12.2. Відокремлення осаду цитрату кальцію

Фільтрування проводять у камерно-мембранному фільтр-пресі (Ф-59) під тиском 0,9 МПа. Осад, що утворився промивають гарячою водою. І передають на стадію одержання розчину лимонної кислоти (ТП 13.1.).

ТП 13. Одержання розчину лимонної кислоти

ТП 13.1. Отримання розчину

У реакторі (Р-61) з осаду готують суспензію, концентрація якої забезпечить отримання 25-% лимонної кислоти.

ТП 13.2. Розклад цитрату кальцію

Далі у реактор (Р-61) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-60), при температурі 75°C, подають 35 л технічної сірчаної кислоти. В результаті утворюється лимонна кислота та важкорозчинний гіпс, що випадає в осад. Температура реакційної маси близько 90°C; рівень рН – 1,5. Далі реакційна маса подається за допомогою відцентрового насосу (Н-62) на повторне фільтрування

ТП 13.3. Фільтрування

Фільтрування реакційної маси проводять на барабанному вакуум-фільтрі (Ф-63) при температурі 90°C. Отриманий осад промивають водою до тих пір, доки середня концентрація лимонної кислоти не буде становити 16%. Далі розчин подається самоплином за допомогою створеного вакуума на концентрування (до ТП 14.1.)

ТП 14. Перше концентрування

ТП 14.1. Концентрування розчинну лимонної кислоти

Випарювання розчину лимонної кислоти проводиться періодично, у два етапи. Перше випарювання проводиться у вакуум-випарнику (ВВ-64) при надлишковому тиску близько 80 кПа. Кінцева густина розчину складає 1,28 г/см³, при цьому вміст кислоти у розчині складає 55%.

ТП 15. Освітлення та фільтрування

ТП 15.1. Освітлення активованим вугіллям

Розчин лимонної кислоти після першого випарювання за допомогою насоса перекачують в реактор з мішалкою (Р-66), нагрівають до 70°C і через об'ємно-ваговий дозатор (Д-65) додають активоване вугілля в кількості 1,5- % від об'єму. Суспензію перемішують 30-35 хвилин. Далі суспензія подається за допомогою відцентрового насоса (Н-67) на фільтрування під надлишковим тиском 0,2-0,3 МПа.

ТП 15.2. Фільтрування розчину

Фільтрування відбувається при надлишковому тиску 0,3 мПа у барабанному вакуум-фільтрі (Ф-68) для відділення вугілля і гіпсу, що утворився при випарюванні. Отриманий фільтрат перекачується самоплином за допомогою створеного вакуума на друге випарювання у вакуум – випарному апараті (ВВ-69).

ТП 16. Друге концентрування розчину лимонної кислоти

ТП 16.1. Концентрування у вакуум-випарнику

Випарювання проводять у вакуум-випарному апараті (ВВ-69), при тиску – 80кПа. Концентрування ведеться до тих пір, доки густина розчину не буде становити 1,38 г/см³, при цьому вміст кислоти в розчині складає 71%. Після випарювання концентрований розчин за допомогою вакуум насоса, подається на стадію кристалізації (до ТП 17.1.)

ТП 17. Кристалізація концентрованого розчину

ТП 17.1. Кристалізація лимонної кислоти

Охолодження гарячого розчину проводять в кристалізаторі (К-70) при безперервному перемішуванні. Пересичення, необхідне для утворення центрів кристалізації, досягається при зниженні температури. При температурі 37°C вносять затравку кристалів лимонної кислоти в кількості 0,05% від маси розчину. Утворення і ріст кристалів відбуваються при зниженні температури до 8°C. При цій температурі утфель (суміш кристалів

і маточного розчину) витримують протягом 30 хв. Далі утфель перекачується відцентровим насосом (Н-71) на центрифугування.

ТП 18. Відділення кристалів лимонної кислоти

ТП 18.1. Центрифугування

Кристали відокремлюють від маточного розчину на центрифугі (Ц-72). Швидкість обертів ротора сягає 1500-3000 об/хв. Отримані кристали пробілюють – обприскують водою з температурою не вище 35°C, для видалення плівки маточного розчину на їх поверхні. Після центрифугування вологість кристалів лимонної кислоти сягає 3%.

ТП 19. Сушіння цільового продукту

ТП 19.1. Сушіння у барабанній сушарці

Кристали подаються в барабанну сушарку (С-74). Паралельно з ними вводиться нагріте до 70°C повітря. Кристали висушують повітрям при температурі 35°C. Висушені кристали охолоджують і шнековим транспортером (ШТ-73) передають на сито (С-76). Вологість висушених кристалів становить 0,05%

ТП 20. Просіювання, фасування та пакування лимонної кислоти

ТП 20.1. Просіювання

Просіювання кристалів лимонної кислоти проходить на вібраційному ситі (С-76).

ТП 20.2. Фасування та пакування

Упаковують вже просіяні кристали за допомогою фасувально-пакувальної машини (ФПМ – 77). Для постачання на підприємство лимонну кислоту фасують в льняні продуктові мішки 25 кг з вкладишем з поліетиленової плівки.

ТП 21. Знешкодження відходів

ЗВ 21.1. Знешкодження твердих відходів

Пакувальна тара (від ДР 1.1.1., ДР 1.1.2.) утилізується шляхом відправлення відходів до спеціальних пунктів прийому вторинної переробки сировини для подальшої переробки.

Знешкодження біомаси від (ТП 11.1.), а саме *Aspergillus niger* EB-12 найкраще буде проводити шляхом утилізації біомаси шляхом виготовлення кормових добавок для молодняка великої рогатої худоби.

Утворений гіпсовий шлам від (ТП 13.3.), який являється твердим відходом виробництва слугує для використання у виробництві будівельних матеріалів, а саме: у виготовленні SIP-панелей.

Фільтрат від (ТП 16.1.) після концентрування використовується як добавки до кормів тварин з метою збільшення протеїну до 25%, який містить всі незамінні амінокислоти. Концентрований фільтрат згодовують молодняку великої рогатої худоби.

Також під час проведення процесу кристалізації (ТП 17.1.) можуть утворюватися кристали, розмір яких не відповідає стандарту. Дані кристали розчиняють і подають на випарювання. До того ж, частина з них використовується, безпосередньо, як затравка для наступної кристалізації.

ЗВ 21.2. Знешкодження рідких відходів

Відпрацьовані розчини (від ДР 1.2.1, ДР 1.2.2., ДР 1.3.2.) додатково очищуються за допомогою аеротенків перед викидом у централізовану каналізацію.

ЗВ 21.3. Знешкодження газоподібних відходів

Відпрацьоване повітря (від ТП 8.5., ТП 8.6., ТП 8.7., ТП 8.8., ТП 9.1.) попередньо очищується за допомогою промислового Скрубера Вентурі.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів.

Контроль технологічного процесу ведеться відповідно до вимог GMP. У процесі виробництва контролюють відповідність сировини, допоміжних матеріалів, контролюють санітарний стан цехів та робочих місць, виконання регламентованих технологічних операцій і виконання технологічних режимів роботи. На підставі аналізу критичних точок виробництва складають карту постадійного контролю. До переліку контрольних точок входять лише ті, які безумовно, потрібні для забезпечення коректного ходу технологічного процесу і випуску якісної продукції, що відповідає вимогам. У таблиці 8.1. наведена карта постадійного контролю доферментаційних процесів виробництва лимонної кислоти

НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ

Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Вавілова А.І.			Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Тетеріна С.М.				106	149
Консультант					Кафедра БТМ ¹⁰⁶		
Зав.каф.		Пирог Т.П.					

РОЗДІЛ 9. Контроль
виробництва

Карту постадійного контролю виробництва лимонної кислоти *Aspergillus niger* EB-12 наведено у табл. 8.1.

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю біосинтезу лимонної кислоти

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
ДР 1. Підготовка аераційного повітря				
Кт 1.1. Очищення на фільтрі грубої очистки	Ступінь чистоти повітря на виході з фільтра, перепад тисків	Манометр. Перевірка ступеня очистки	Безперервно під час очистки повітря в фільтрі грубого очищення	E = 70 %.
Кт 1.2. Стиснення повітря	Стиснення повітря, температура, тиск.	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,4 МПа, t = 250 °C,
Кт 1.3. Охолодження повітря у теплообміннику	Температура	Технічний термометр	Безпосередньо під час проведення процесу	t = 18-19°C
Кт 1.4. Видалення вологи	Волога	Вологомір	Безпосередньо під час проведення процесу	Чисте W=60%.
Кт 1.5. Нагрівання повітря	Температура	Технічний термометр	Безпосередньо під час проведення процесу	t = 30-35 °C

Кт 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Ступінь очищення , перепад тисків.	Перевірка ступеню очищення, манометр.	Після очистки повітря в фільтрі тонкого очищення	E = 95%
Кт 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Ступінь очищення	Перевірка ступеню очищення.	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	E = 99,999%,
ДР 2. Стерилізація олеїнової кислоти				
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Кт,Км 2.1. Стерилізація олеїнової кислоти	Олеїнова кислота, температура, час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 3. Приготування та стерилізація розчину підживлення				
Кт,Км 3.1 Приготування та стерилізація розчину підживлення	Розчин підживлення, температура, час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
ДР 4. Приготування та стерилізація запасного розчину				
Кт,Км 4.1 Приготування та стерилізація запасного розчину монофосфат калію	Розчин підживлення, температура, час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

Р 5.1 Приготування та стерилізація компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці				
Кт,Км 5.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 5.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, Температура час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
ДР 5.2 Приготування та стерилізація компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л				
Кт,Км 5.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 5.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, Температура час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
ДР 5.3 Приготування та стерилізація компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л				
1	2	3	4	5

Продовження таблиці 8.1.

Кт,Км 5.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 5.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, Температура час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
ДР 5.4 Приготування та стерилізація компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1000 л				
1	2	3	4	5
Кт,Км 5.4.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 5.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, Температура час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 5.4.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, Температура час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

ДР 5.5 Приготування та стерилізація компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10000 л				
1	2	3	4	5
Кт,Км 5.5.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 5.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, Температура час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 5.5.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, Температура час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 5.6 Приготування та стерилізація компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в ферментері об'ємом 100000 л				
Кт,Км 5.6.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 5.6.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, Температура час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контр.	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсут.мікроб.

Продовження таблиці 8.1.

Кт,Км 5.6.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, Температура час,стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ТП 6. Підготовка посівного матеріалу				
Кт,Км 6.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, фотоелектроколориметр,м ікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	t = 30°С, τ = 72 год, n = 150 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт,Км 6.5 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, фотоелектроколориметр,м ікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	t = °С, τ = год, n = 150 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт,Км 6.6 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, фотоелектроколориметр,м ікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	t = 30°С, τ = 72 год, n = 150 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт,Км 6.7 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1000 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72$ год, $n = 150$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт,Км 6.8 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10000 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72$ год, $n = 150$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 7. Виробничий біосинтез				
Кт, Км, Кх 7.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина, швидкість перемішування, температура, рН, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація лимонної кислоти	Термометр технічний, годинник, датчик рН, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль та визначення рівня біомаси проводять кожні 8 годин, концентрація лимонної кислоти визначається після закінчення процесу культивування	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $\tau = 168$ год, $n = 150$ об/хв, $X = 68,80$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

8.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу і культуральної рідини здійснюють двома методами: прямим висівом на агаризовані поживні середовища і мікроскопіюванням [77]. Контроль здійснюють шляхом розсівання проби готового посівного матеріалу і культуральної рідини на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем до ізольованих колоній і подальшим мікроскопуванням мікроорганізмів з окремих колоній, які виростили на середовищі. Після інкубації посівів на середовищах з м'ясо-пептонним агаром (МПА) не повинно бути виявлено ріст мікроорганізмів, а на середовищі з глюкозо-картопляним агаром (ГКА) або картопляно-декстрозним агаром (КДА) – не повинно бути виявлено ріст сторонньої мікрофлори. Мікробіологічний контроль здійснюють кожні 8 годин [77].

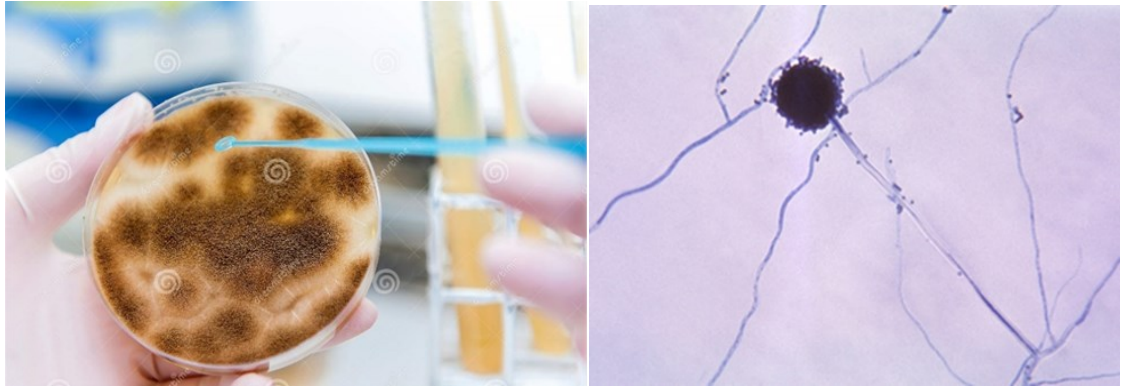
Культуральні ознаки *Aspergillus niger* на щільних поживних середовищах:

- край колонії – ворсистий;
- поверхня – також ворсиста, шорстка;
- розміри колоній *Aspergillus niger* можуть бути різними: від кількох міліметрів до кількох десятків сантиметрів у діаметрі;
- за оптичними властивостями колонії *Aspergillus niger* можна визначити як непрозорі;
- характерним кольором для колоній цього аспергілового гриба є чорний, через утворювані конідії, що забарвлені у цей колір;

- структура колонії чорного аспергіла – неоднорідна, волокниста. Гриб виростає у агар-агар, але легко знімається мікробіологічною голкою;
- консистенція колоній даного представителя аспергілів – суха та пухка [78].

Штам *A. niger* EB-12, що виростає на картопляно-декстозному агарі, було виявлено за допомогою мікроскопічних спостережень, таких як морфологічні ознаки міцелію та конідії . Цей штам підтримували на чашках з КДА при 30 °С. протягом 7 днів.

Для мікроскопіювання використовують препарати «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, накривають накривним скельцем і розглядають з об'єктивом 40х, а також мікроскопують препарат з імерсійною системою. Для приготування препарату на чисте знежирене скло в асептичних умовах для запобігання контамінації з допомогою стерильної петлі нанести невелику краплю культуральної рідини та розподілити по склу (діаметр мазка - 1 см). Висушують при кімнатній температурі, поки вся волога не випарується. І проводять мікроскопіювання в об'єктиві 40х та також з імерсійною системою для цього на сухий препарат за допомогою скляної палички потрібно нанести 1-2 краплі імерсійного масла. Після всієї роботи потрібно за допомогою вати та етилового спирту протерти залишки масла з імерсійного об'єктива мікроскопа. За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти ми побачимо клітини *Aspergillus niger* EB-12 [79].



А

Б

Рис. 8.1 Aspergillus niger EB – 12: А– колонії на агаризованому середовищі; Б – під мікроскопом

8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

Підготовка проби

У центрифужні пробірки наливають 50 мл культуральної рідини. Умови центрифугування становлять - 5 хв при 1500 об/хв. Після центрифугування надосадову рідину обережно зливають для подальшого аналізу, а осад, що залишився, промивають дистильованою водою та висушують в лабораторній сушильній шафі при температурі 105°C протягом ночі для розрахунку біомаси. Супернатант використовується для визначення концентрації лимонної кислоти, джерела вуглецю та концентрації джерела азоту.

8.3.1. Визначення концентрації лимонної кислоти

Концентрацію лимонної кислоти визначають за допомогою високоефективної рідиної хроматографії (ВЕРХ), оснащеної детектором УФ та індексом заломлення відповідно. Для аналізу лимонної кислоти використовують нуклеозильну колонку (ЕС 4,6 x 250 мм) та колонку Shodex Sugar SH1011 (8 x 300 мм, BioRad). Елюент, використовуваний для аналізу лимонної кислоти становить 5 мМ H₂SO₄. Аналіз ВЕРХ проводять в таких робочих умовах: витрата насоса - 1,0 мл / хв; температура колонки, 30 ° С для лимонної кислоти; кількість зразка (фільтрату) - 20 мкл; метод

інтеграції, площа піку. Концентрацію розраховують за стандартною кривою [12].

8.3.2. Визначення концентрації джерела вуглецю.

Джерелом вуглецю в середовищі для культивування *Aspegillus niger* EB-12 є меляса, яка містить близько 50% цукру за сухою масою, переважно сахарози, фруктози та глюкози. Фруктоза, глюкоза та сахароза в мелясі визначаються одночасно високоефективною рідинною хроматографією з використанням мальтози як внутрішнього стандарту з детектором заломлення.

Суть методу полягає в розділенні компонентів сумішей, засновуючись на відмінності в рівноважному розподілі їх між двома фазами, що не змішуються, одна з яких нерухома, а інша рухома. Суміші нерівно

розподіляються між двома фазами завдяки своїй полярності, розміру або іншим властивостям [80].

Обладнання та реактиви:

Система ВЕРХ складається з моделі бінарного насоса 1525, моделі 7725 з ручним пробовідбірником, моделі 2414 RID та вуглеводного стовпчика Agilent Zorbax (250 × 4,6 мм, ID, 5 мкм), захищеного захисною колонкою (12,5 × 4,6 мм ID). Стовпчик Ultimate™ XB-NH2 (250 × 4,6 мм ідентифікатор, 5 мкм), ультрафіолетовий спектрофотометр типу UV2802SH, центрифуга TGL-19G (5 мл) та мембранні фільтри (0,22 мкм) та картридж Waters Sep-Pak C18 SPE (WAT020805). Ацетонітрил для ВЕРХ (A998-4), метанол, вода, яка використовувалась у дослідженні, була деіонізованою.

Техніка визначення:

10 мл супернатанту культуральної рідини фільтрували через мембрану 0,22 мкм перед введенням. Хроматографічне розділення цукрів (сахарози, фруктози та глюкози) було досягнуто в ізократичному режимі. Зразки аналізували на вуглеводній колонці (250 × 4,6 мм ID, 5 мкм), забезпеченій стовпчиком (12,5 × 4,6 мм ID). Температури колонки встановлювали

відповідно 30 і 35 °С. Рухома фаза складалася з ацетонітрилу та води (75:25,об/об), швидкість потоку становила 1,0 мл/хв. Об'єм ін'єкції становив 10 мкг. Виявлення та інтеграцію піку проводили за допомогою хроматографічної системи Breeze. Мальтозу використовували як внутрішній стандарт (ІС), а для кількісного визначення застосовували внутрішній метод. Після того, як колонку врівноважували рухливою фазою, швидкість потоку підтримували на рівні 1,0 мл/хв і 10 мкг стандартного розчину вводили в хроматографічну колонку. Розчини зразка ІС визначали за стандартами, і виявлення кожного розчину зразка ІС повторювали в трьох примірниках. Колонку промивали в кінці кожного експерименту більше 30 хв рухливою фазою [80].

8.3.3. Визначення концентрації джерела азоту.

Джерелом азоту в середовищі для культивування *Aspegillus niger* EB-12 є гідролізат курячого пір'я, який містить у своєму складі амінний азот. Визначення проводять мідним способом. Суть даного методу полягає у тому, що визначається кількість амінокислот у певній кількості досліджуваного розчину, при додаванні фосфорнокислої міді у боратному буфері та відтитруванні йоду розчином тіосульфату натрію. Визначається за різницею кількості розчину тіосульфату натрію витраченого на титрування дослідного зразка та контролю.

Обладнання та реактиви: мірна колба на 25 мл; складчастий фільтр з малопористого фільтрувального паперу або центрифуга до 10000 об/хв; конічна колба чи фарфорова чаша; тимолфталеїну; 1 н. розчин гідроксиду натрію; ортофосфату міді у боратному буфері; 80% оцтова кислота; калій йодид; 0,01 н. розчин тіосульфату натрію; розчин крохмалю; дистильована вода.

Техніка визначення:

10 мл супернатанту культуральної рідини наливають у мірну колбу на 25 мл і додають одну – дві краплі тимолфталеїну і по краплях 1 н. розчин

гідроксиду натрію до блідо-синього забарвлення. У колбу додають 10-15 мл суспензії ортофосфату міді у боратному буфері, потім доводять вміст колби до мітки дистильованою водою. Добре збовтують і фільтрують через складчастий фільтр з малопористого фільтрувального паперу або центрифугують. Фільтрат повинен бути зовсім прозорий, бо за наявності частинок осаду завищується кінцевий результат. 5 - 10 мл фільтрату відбирають у конічну колбу або у фарфорову чашку, додають 0,25 - 0,5 мл 80% оцтової кислоти, 0,2 - 0,4 г калій йодиду. Йод, що виділився, відтитрують 0,01 н. розчином тіосульфату натрію, додаючи в кінці титрування 1 - 4 краплі крохмалю до зникнення синього забарвлення. Паралельно проводять контрольний дослід, де замість досліджуваного досліді беруть дистильовану воду [81].

Відбір та підготовка проб

Для складання сумарної проби харчової безводної лимонної кислоти з різних місць кожної пакувальної одиниці, відбирають миттєві проби за допомогою пробовідбірника, занурюючи його не менше чим на $\frac{3}{4}$ глибини. Маса миттєвої проби має бути не більше 100 г. Маса миттєвої проби і число миттєвих проб від кожної пакувальної одиниці, що потрапила у вибірку, мають бути однаковими [82].

Миттєві проби поміщають в чисту суху скляну або поліетиленову ємність і ретельно перемішують. Маса сумарної проби має бути не менше 500 г [82].

Підготовлену сумарну пробу ділять на дві рівні частини і поміщають в чисті сухі банки, що щільно закриваються, або поліетиленові пакети з "харчової" плівки. Пакети заварюють або зав'язують нитками. Одну частину сумарної проби опечатують, пломбують і залишають для повторних випробувань у разі виникнення розбіжностей в оцінці якості харчової безводної лимонної кислоти. Цю частину сумарної проби зберігають до

закінчення терміну придатності продукту. Другу частину проби передають в лабораторію для проведення випробувань [82].

Визначення органолептичних показників

Згідно ГОСТ 31726-2012 [82] за органолептичними показниками харчова безводна лимонна кислота повинна відповідати вимогам, зазначеним в *таблиці 4.1*.

Таблиця 8.1.

Найменування показника	Характеристика
Зовнішній вигляд	Сухий, сипучий кристалічний порошок без грудок, на дотик НЕ липкий, без сторонніх включень
Колір	Білий
Запах	Без запаху
Смак	Кислий, без стороннього присмаку

Проведення випробувань на визначення зовнішнього вигляду та кольору

Зовнішній вигляд і колір харчової безводної лимонної кислоти визначають переглядом наважки проби масою 50 г, вміщеної на аркуш білого паперу або на скляну пластинку, при розсіяному денному світлі або освітленні люмінесцентними лампами. Освітленість поверхні робочого столу повинна бути не менше 500 лк [82].

Проведення випробувань на визначення запаху

Для визначення запаху готують розчин масовою часткою 2%. Для цього розчиняють наважку проби масою 2 г в 98 мл дистильованої води в склянці місткістю 250 мл. Чистий, без стороннього запаху стаканчик заповнюють приготованим розчином. Стаканчик закривають кришкою і витримують протягом 1 год при температурі повітря $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$. Запах

визначають органолептично на рівні краю стаканчика відразу ж після відкриття кришки [82].

Проведення випробувань на визначення смаку

Для визначення смаку частину розчину, приготованого раніше (4.1.2.), відбирають чайною ложкою і пробують кінчиком язика на смак. Смак повинен бути кислим, без стороннього присмаку [82].

Визначення хімічних показників

За хімічними показниками харчова безводна лимонна кислота повинна відповідати вимогам, зазначеним в *таблиці 8.2.*

Таблиця 8.2.

Найменування показника	Характеристика
Тест на іони водню	Витримує випробування
Тест на цитрат-іони	Витримує випробування
Масова частка води, %, не більше	0,5
Масова частка сульфатної золи, %, не більше	0,05
Масова частка оксалатів, млн (мг/кг), не більше	100
Масова частка сульфатів, млн (мг/кг), не більше	150
Тест на фероціаніди	Витримує випробування
Тест на залізо	Витримує випробування

Проведення тесту на іони водню

Суть методу: метод заснований на зміні кольору розчину, що містить іони водню, в присутності індикатора (лакмусу).

Обладнання та реактиви:

Ваги неавтоматичного дії, що забезпечують точність зважування з межами допустимої абсолютної похибки $\pm 0,1$ г; мірний стакан (Стакан В (Н) -1-250

ТЗ (ТШХ)); термометр рідинний скляний з діапазоном вимірювання від 0 °С до 100 °С, ціною поділки 1 °С; білий папір; стаканчик для зважування; циліндр; лампи люмінесцентні типу ЛД; вода дистильована.

Техніка визначення:

Наважку проби масою від 1 до 2 г розчиняють в 100 мл дистильованої води. До 10 мл приготованого розчину додають 2-3 краплі розчину лакмусу. Зміна кольору розчину з безбарвного в червоний свідчить про наявність іонів водню (кисле середовище) [82].

Проведення тесту на цитрат-іони

Суть методу: метод заснований на утворенні цитрат-іонів з піридином і оцтовим ангідридом, пофарбованого в червоний колір (випробування слід проводити у витяжній шафі).

Обладнання та реактиви: електроплитка; ваги неавтоматичного дії, що забезпечують точність зважування з межами допустимої абсолютної похибки $\pm 0,01$ г; стаканчик для зважування СВ-14/8 (19/9); мірний стакан (стакан В (Н) -1 (2) -100 ТЗ (ТШХ)); циліндр 1(3)-25; піпетки; термометр рідинний скляний з діапазоном вимірювання від 0 °С до 100 °С, ціною поділки 1 °С; оцтовий ангідрид; піридин.

Техніка визначення:

До суміші, що містить 5 мл піридину і 1 мл оцтового ангідриду, додають від 0,3 до 0,5 г аналізованої проби і суміш нагрівають до температури 70 °С. Поява червоного забарвлення свідчить про присутність в розчині цитрат-іонів [33].

Визначення масової частки лимонної кислоти

Суть методу: метод заснований на титриметричному визначенні лимонної кислоти при нейтралізації розчином гідроксиду натрію в присутності фенолфталеїну.

Обладнання та реактиви: ваги неавтоматичного дії OIML R 76-1, що забезпечують точність зважування з межами допустимої абсолютної

похибки $\pm 0,0005$ г; бюретки; колби; воронка; стаканчики для зважування; циліндр; склянка з тубусом; трубка хлоркальцієва; натрію гідроксид; фенолфталеїн (індикатор); спирт етиловий; вода дистильована.

Техніка визначення:

Готують (1-н) розчин гідроксиду натрію та спиртовий розчин фенолфталеїну з масовою часткою 1%. У сухому стаканчику зважують 2 г аналізованої проби. Наважку з стаканчика кількісно переносять в конічну колбу місткістю 250 мл, розчиняють в 50 мл дистильованої води, додають 2-3 краплі розчину фенолфталеїну і титрують розчином гідроксиду натрію до слабого рожевого забарвлення, не зникає протягом 1 хв [82].

Масову долю безводої лимонної кислоти X_1 , %, обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{0,064KV \cdot 100}{m},$$

де $0,064$ - еквівалентна маса безводої лимонної кислоти, що відповідає 1 см розчину гідроксиду натрію концентрації точно 1 міль/дм, г/см; K - поправочний коефіцієнт титру розчину гідроксиду натрію; V - об'єм розчину гідроксиду натрію концентрації (NaOH) = 1 міль/дм, витрачений на титрування проби, см; 100 - коефіцієнт перерахунку результату у відсотки; m - маса аналізованої проби.

Обчислення проводять до другого десяткового знаку із записом результату до першого десяткового знаку. За результат випробування набувають середньоарифметичного значення двох паралельних вимірів.

Межа повторюваності (збіжності) r - абсолютне значення різниці між результатами двох вимірів, отриманими в умовах повторюваності при $p = 95\%$ не повинен перевищувати 0,2%.

Межа відтворюваності R - абсолютне значення різниці між результатами двох вимірів, отриманими в умовах відтворюваності при

$p=95\%$, не повинен перевищувати 0,4%. Межі абсолютної похибки методу $\pm 0,2\%$ при ймовірності 95% [82].

Визначення вологості лимонної кислоти

Визначення вологості лимонної кислоти після сушіння проводять за допомогою аналізатора вологості Елвіз-2 С (рис. 4.2.)



Рис. 8.2. Аналізатор вологості Елвіз-2 С [83].

Аналізатор вологості – прилад для контролю вмісту вологості в зразку із удосконаленою технологією висушування зразка [83]. Даний аналізатор слід віднести до непрямого вимірювання вмісту вологості. Вимірювання вмісту води в досліджуваному зразку відбувається у такий спосіб: проводиться попереднє зважування зразка, потім його нагрівають за спеціально розробленими методиками, режимами і температурними показниками, після чого знову зважують й визначають втрату води. При такому аналізі теплового нагрівання зразка можливо також визначити масову частку вільної та зв'язаної води в досліджуваному зразку[84].

Максимальна маса аналізованої речовини становить 200 грам. Мінімальна маса аналізованої речовини – 50 грам. Діапазон вимірювання вмісту вологості становить від 0...10%. Відносна точність вимірювання вмісту вологості приблизно 0,01% [84].

РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

Автоматизація виробництва — застосування технічних засобів, економіко-математичних методів і систем керування, що вивільняють людину від функцій управління й залишають за людиною функції контролю та прийняття рішень. Автоматизація сприяє загальному технологічному прогресу суспільства й полягає у створенні можливостей для поліпшення умов і продуктивності праці, зростання якості продукції і, як результат, — підвищенню конкурентноспроможності продукції на ринку [85].

Використання сучасних засобів і систем автоматизації дозволяє вирішувати наступні задачі: автоматично враховувати безперервні зміни технологічних параметрів; постійно враховувати динаміку виробничого плану для відповідності номенклатурі випущеної продукції шляхом оперативного переналаштування режимів технологічного обладнання; автоматично керувати технологічними процесами в умовах шкідливих або небезпечних для людини факторів, яких багато на виробництвах [86].

Процес отримання лимонної кислоти з використанням *A. niger* проводиться в ферментері об'ємом 100 м³. Як посівний матеріал використовують конідії гриба. Попередньо до ферментера подають стерильне та охолоджене поживне середовище. Після проростання спор підсилюють аерацію. За оптимальних умов процес ферментації становить 5-10 днів за постійної аерації та температури 30°C. Необхідним є додавання піногасника, оскільки під час перемішування утворюється піна. У якості піногасника використовується олеїнова кислота, оскільки вона не має високу харчову цінність, не споживається продуцентом та відносно дешева.

					НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ		
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Вавілова А.І.			Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Тетеріна С.М.				126	125 157
Консультант					Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.					

Важливою умовою у виборі біореактора для виробництва лимонної кислоти є забезпечення системою аерації, що здатна підтримувати високий рівень розчинного кисню. Низьке значення рН під час ферментації та сама лимонна кислота спричиняють корозію, тому внутрішня частина біореактора виготовляється з матеріалу, стійкого до корозії [28].

ЗАВДАННЯ НА РОЗРОБКУ СХЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ

Таблиця 9.1

№	Машина,агрегат, установка	Параметр	Значення параметру	Вид автоматизації	Характер контролю та управління	Засіб управління та контролю, реалізації
1	Ємність для піногасника(олеїнова кислота)	Рівень рідини в апараті	80% ± 3%	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
		Температура	131°C±2°C	Контроль	Відображення,реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
2	Насос	Стан насосу для подачі рідини у ферментер	Ввімкнення/Вимкнення	Управління	Ручне/дистанційне	Пуск, зупинка з АРМ оператора і кнопка «Стоп» по місцю
5	Виробничий ферментер	Рівень рідини в апараті	80% ± 3%	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
		Час культивування	168 год	Контроль	Відображення,реєстрація	АРМ оператора
		Рівень рН середовища	6.0 од рН ± 0,5 од.рН	Контроль	Відображення,реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату кислоти

Продовження таблиці 9.1.

	Температура середовища	30°C±2°C	Контроль	Відображення,реєстрація	АРМ оператора
			Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
	Концентрація розчиненого кисню	0,015м ³ /м ³ *хв	Контроль	Відображення,реєстрація	АРМ оператора
			Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
	Інтенсивність перемішування	150 об/хв	Контроль	Відображення,реєстрація	АРМ оператора
			Управління	Пуск/стоп,зміна частоти	Частотний перетворювач
	Надлишковий тиск в апараті	0,5 МПа	Контроль	Відображення,реєстрація	АРМ оператора

ОПИС ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ СХЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ

Так у відповідності з завданням, сформованим у таблиці 2.1 опишемо схему автоматизації.

У *першому контурі* автоматичного контролю, в збірнику для стерилізації піногасника необхідно контролювати рівень рідини, який має становити 80% . Піногасник та вода, який поступає в збірник контролюється за допомогою датчика рівня LE 1a.

У *другому контурі* автоматичного контролю необхідно контролювати температуру у збірнику яка має регламентоване значення 131°C. Спостереження за зміною температури передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням цих змін у його архіві. Температура регулюється подачею води клапаном 2 д та пари клапаном 2в, приводиться в дію за допомогою перетворювача 2б, 2г. Сигнал від датчика подається на контролер.

У *третьому контурі*, автоматичного контролю, насос, необхідно контролювати ввімкнення та вимкнення апарату. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням цих змін у його архіві. Для управління передбачається зміна за допомогою кнопки Пуск/Стоп. Даною схемою передбачено: управління з АРМа оператора включенням - відключенням насосів; ручне управління з щита перетворювачів включенням - відключенням насосів; аварійне відключення насосів кнопкою, розташованою «по місцю» біля насоса.

Для забезпечення безаварійної роботи насосів необхідно використати елементи управління (кнопки «Пуск» та «Стоп») в «ручному режимі» з щита управління SB2, та безпосередньо біля насосів («по місцю») SB1. Для вибору місця з якого саме буде здійснюватись управління використовується тумблер SA1 (перемикач). Подача напруги на двигуни насосів здійснюється за допомогою магнітних пускачів KM1. Лінія зв'язку позначена цифрою 2.

У *четвертому контурі*, у виробничому ферментері необхідно контролювати рівень рідини. Рівень рідини становить 80%. Суміш, яка поступає контролюється рівнем рідини за допомогою датчика рівня LE 3а.

У *п'ятому контурі*, автоматичного контролю, регулюється рівень рН, який має становити 6,0. Даний рівень регулюється за допомогою датчика 4а, за рахунок подачі піногасника регулюючим клапаном 4в за допомогою перетворювача 4б.

У *шостому контурі*, автоматичного контролю, контролюється температура у виробничому ферментері, яка становить 30 °С. Спостереження за зміною температури передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням цих змін у його архіві. Температура регулюється подачею води клапаном 5д та пари клапаном 5в, приводиться в дію за допомогою перетворювача 5б, 5г. Сигнал від датчика подається на контролер.

У *сьомому контурі*, автоматичного контролю, контролюється значення тиску у виробничому ферментері, який становить 0.5 МПа . Тиск контролюється за допомогою датчика тиску РТ 6а

У *восьмому контурі*, автоматичного контролю і управління, контролюється і регулюється частота обертання, яка має регламентоване значення 150 об/хв.

Спостереження за зміною частоти обертання передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням цих змін у його архіві. Для управління частотою обертання ротора передбачається її зміна за допомогою частотного перетворювача 7а. Для забезпечення безаварійної роботи необхідно використати елементи управління (кнопки «Пуск» та «Стоп») в «ручному режимі» а безпосередньо біля насосів («по місцю») SB3.

СПЕЦИФІКАЦІЯ НА ПРИЛАДИ ТА ЗАСОБИ АВТОМАТИЗАЦІЇ

Таблиця 9.2.

№	№ позиції	Найменування і технічна характеристика засобу	Тип, модель	Виробник
1	2	3	4	5
1	1a	Ємнісний датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 265-4000мм, максимальна допустима температура +1250С, максимальний допустимий тиск 10бар, під'єднання G5/4, аналоговий вхід, точність 2мм	NMC	Kobold.
2	2a	Цифровий термометр з термопарою К-типу і датчиком температури повітря, клас точності – 1%, діапазон вимірювань: -50...750 °С . аналоговий вхід	HYELEC MS6501	Нyelec (Китай)
3	2б	Електропневмоперетворювач, вхідний сигнал - електричний 4...20 мА, вихідний сигнал - пневматичний 20 ... 100 кПа, основна похибка 0,5	PC-28G/A	APLISENS (Польща)
4	2в	Клапан регулюючий пневматичний, управляючий сигнал 20-100 кПа, робоча температура 250°С .	PV6211	Эви инжиниринг (Україна)
5	2д	Пневматичний сідельний клапан серії J4 для нейтрального та агресивного середовища, управляючий сигнал від 0 до 16 бар, розмір G3/8...G2	J4SPG180 5	KRAFTt-AIR
6	KM1	Магнітний пускач, робочий струм 400А, потужність двигуна 200кВт, управляючий сигнал 220В	3RT1075-6AP36	SIEMENS
7	SA1	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний-ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією	3SB3210-2DA11	SIEMENS

Продовження таблиці 9.2.

8	SB1 – SB3 ,	Двоклавішна кнопочка станція «Пуск»-«Стоп» 1НО+1НЗ,	8LP2T B7113	Lovato
9	3а	Ємнісний датчик рівня, матеріал: аустенітна сталь SUS 304 ; діапазон вимірювань 265-4000мм, максимальна допустима температура 800 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 10бар, під'єднання G5/4, аналоговий вхід.	SA128	Simple Tech
10	4а	pH електроди, матеріал скло, пластик, діапазон вимірювань pH 1...12, максимальна температура до 80 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 6 бар	APS	Kobold
11	4б	Перетворювач вимірювання pH і окисно-відновного потенціалу, аналоговий вихід	APM-Z	Kobold
12	5а	Термоперетворювач опору-датчик температури, вихідний сигнал 4...20 мА, діапазон вимірювань: -196...600 ⁰ С . Матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, аналоговий вхід	BSZ	WIKА (Росія)
13	5б	Електропневмоперетворювач, вхідний сигнал - електричний 4...20 мА, вихідний сигнал - пневматичний 20 ... 100 кПа, основна похибка 0,5	PC-28G/A	APLISENS (Польща)
14	5в	Клапан регулюючий пневматичний, управляючий сигнал 20-100 кПа, допустима максимальна температура 550 ⁰ С .	GV2	Doruk Endustri (Туреччина)

РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

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

- 1. Санітарна підготовка виробництва.** Даний етап включає щоденне і генеральне прибирання приміщення із застосуванням миючих засобів «Естер Дез» і «Міродез» Після обробки відпрацьований мийний розчин надходить до каналізації. Миття резервуарів обладнання здійснюють автоматично з допомогою СІР-мийки із застосуванням засобу «Естер Дез». *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії рідких відходів.*
- 2. Санітарна підготовка працівників.** Даний етап включає щоденне застосування деззасобів «Alsoft V» та «Біоцид плюс». Обидва засоби мають широкий спектр дії, гарний дезінфікуючий ефект, є безпечними для людини і відносно дешевими. *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії твердих відходів(упаковки від даних засобів) та рідких відходів (дезінфікуючі засоби).*
- 3. Підготовка аераційного повітря.** На даному етапі у фільтрі грубого очищення затримується пил та механічні частки . *Передбачаємо, що даний етап є місцем невеликих об'ємів емісії твердих відходів.*
- 4. Підготовка піногасника.** Етап передбачає стерилізацію піногасника – олеїнової кислоти. Піногасник подається для регуляції рівня піни під час отримання посівного матеріалу у інокуляторах та виробничого біосинтезу в ферментері. *Відходи не враховуємо у загальний об'єм рідких відходів.*

Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ		
Розроб.		Вавілова А.І.			РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ		
Керівник		Тетеріна С.М.			Літ.	Арк.	Акрушіє
Консультант						134 133	157
Зав.каф.		Пирог Т.П.			Кафедра БТМ		

- 5. Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу.** На даному етапі є можливість виявлення невідповідності сировини заявленим нормам. *Даний етап є місцем емісії твердих відходів(пакувальний матеріал від сировини для приготування поживного середовища)*
- 6. Підготовка посівного матеріалу.** Даний етап передбачає отримання посівного матеріалу в інокуляторах, відходи від посівного матеріалу не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів. Продуцент *Aspergillus niger* EB-12 – аероб, тому під час культивування є необхідність забезпечення достатнього рівня аерації поживного середовища. Відпрацьоване повітря на виході з інокулятора буде містити аерозоль зі спорами. *Даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.*
- 7. Виробничий біосинтез.** Даний етап передбачає отримання культуральної рідини, у якій накопичується цільовий продукт – лимонна кислота. Оскільки культуральна рідина далі надходить до збірника для виділення цільового продукту, рідкі відходи на даному етапі не враховуємо. *Даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів(відпрацьоване повітря)*
- 8. Осадження та фільтрація.** На даному етапі в процесі виділення з культуральної рідини лимонну кислоту осаджують у вигляді малорозчинного цитрату кальцію. Культуральну рідину обробляють вапняним молоком до $pH > 6$ при температурі близько $90^{\circ}C$. Відбувається нейтралізація лимонної, глюконової і щавлевої кислот, в результаті утворюється осад цитрату і оксалату кальцію. Відділення осаду здійснюють на вакуум-фільтрах. Отриманий осад промивають на фільтрі водою з температурою не нижче $90^{\circ}C$. *Даний етап є місцем емісії твердих та рідких відходів.*

9. Очищення і випарювання розчину лимонної кислоти. Осад відокремлюють на вакуум-фільтрах, промивають його водою з температурою приблизно. Промивну воду змішують з фільтратом. Отриманий розчин лимонної кислоти випарюють при надлишковому тиску. Після випарювання розчин лимонної кислоти освітлюють активованим вугіллям. Активоване вугілля відокремлюють фільтруванням. Освітлений розчин лимонної кислоти надходить у другий випарник. Концентрований розчин фільтрують і подають в кристалізатор. *Передбачаємо, що на даному етапі утворюються тверді відходи (домішки), що ідуть на вторинне випарювання та газоповітряні відходи, а також рідкі відходи.*

10. Кристалізація лимонної кислоти. Охолодження гарячого розчину проводять в кристалізаторі при безперервному перемішуванні. Пересичення, необхідне для утворення центрів кристалізації, досягається при зниженні температури розчину. При температурі близько 37°C вносять затравку кристалів лимонної кислоти в кількості 0,05% від маси розчину. Утворення і ріст кристалів відбуваються при зниженні температури до 8°C. При цій температурі утфель, який є сумішшю кристалів і маточного розчину, витримують протягом 30 хв. *Даний етап є місцем емісії твердих відходів.*

11. Відділення кристалів лимонної кислоти. Кристали відокремлюють від маточного розчину на центрифугах. Отримані кристали пробілюють – обприскують водою з температурою не вище 35°C для видалення плівки маточного розчину на їх поверхні. Після центрифугування вологість кристалів лимонної кислоти складає 2-3%. *Даний етап є місцем емісії твердих та рідких відходів.*

12. Висушування кристалів лимонної кислоти. Кристали лимонної кислоти сушать в умовах, які забезпечують видалення поверхневої вологи і збереження кристалізаційної води, для чого використовують

барабанні або стрічкові пневматичні сушарки, в яких кристали висушують повітрям при температурі 35°C. *Процес супроводжується виділенням відпрацьованого повітря. Даний етап є місцем емісії газоповітряних відходів.*

10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

Екологізація виробництва – це процес поступового і послідовного впровадження систем технологічних, управлінських та інших рішень, які дозволяють підвищувати ефективність використання природних ресурсів і умов поряд з покращенням або хоча б збереженням якості природного середовища. В технологічному плані екологізація повинна спиратися на екологізацію технологій виробництва і природокористування [87].

Харчова промисловість перероблюючи велику кількість сільськогосподарської сировини, відноситься до найбільш природоємких народногосподарського комплексу. В окремих галузях харчової промисловості виникає безліч проблем з утилізацією відходів. Екологізація харчової промисловості актуальна тим, що її підприємства виготовляють продукцію харчування, а від їх екологічної чистоти залежить здоров'я населення. Для харчової промисловості велике значення має екологізація технологій. Це передбачає систему заходів щодо запобігання негативному впливу виробничих процесів на природне середовище. Екологізації технологій досягають завдяки впровадженню маловідходних технологій чи технологічних зв'язків, що забезпечують мінімум шкідливих викидів [88].

Екологізації виробництва досягається завдяки раціональному переробленню сировини і впровадженню безвідходних і маловідходних технологій, які характеризуються мінімумом розсіюваних та неутилізовуваних відходів, що не забруднюють навколишнє природне середовище. З цією метою впроваджуються технології комплексного перероблення сировини, оптимізуються технологічні параметри технологій та здійснюється їх автоматизація, розробляються ефективні системи

очищення газо-димових викидів в атмосферне повітря, стічних вод з використанням останніх у циклах замкненого водообороту, утилізуються відходи виробництва. Усе це в кінцевому підсумку сприяє виготовленню високоякісної екологічно безпечної харчової продукції за мінімальних витрат природних ресурсів [89].

Біологічні аспекти екологізації виробництва відповідають її сутності, оскільки передбачають включення у виробничий процес живих організмів. Це стосується, передусім біотехнології. В процесах біосинтезу лимонної кислоти використовують органічну сировину або відходи (у нашому випадку м'яса та пір'я). В цьому плані біосинтез є одним з шляхів екологізації виробництва. Технологічні аспекти є також важливими для екологізації виробництва. Будь-який рівень виробництва визначається рівнем розвитку техніки, а його вдосконалення – новою технікою, яка розробляється і використовується у виробництві [87].

Організація ефективного техногенного ресурсного циклу на виробництві передбачає вирішення таких завдань:

- досягнення найбільшого виходу цільового продукту за мінімальних витрат сировини, енергії та допоміжних матеріалів
- забезпечення мінімальних викидів забруднень в атмосферне повітря і скидів зі стічними водами;
- мінімальне утворення неутилізовуваних відходів;
- виготовлення високоякісної екологічно безпечної харчової продукції.

Усе це разом узятє й вирішується в процесі екологічної модернізації виробництва [90,91].

10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

У якості рідких відходів під час виробництва лимонної кислоти виступають залишки миючих та дезінфікуючих засобів та глюконова кислота, що утворюється поряд з лимонною під час біосинтезу.

На даний час, абсолютно виключена є можливість зливу у водойми промислових стічних вод, без їх попереднього очищення. Одним із методів очищення є використання активного мулу, для глибокої утилізації як органічних, так і неорганічних забруднень, що залишилися у воді після здійснення всіх інших можливих варіантів її очищення. Перевагою використання даного варіанту очистки є те, що застосування активного мулу для видалення домішок з води засновано на унікальній здатності мікроорганізмів утилізувати не тільки ті субстрати, що для них є оптимальними й у такий спосіб звичними, але і синтетичних, створених людиною штучно [92].

Аеротенки є найпоширенішими спорудами біологічного очищення. Також аеротенки – найбільші й енергозатратні ємнісні споруди очищення стічних вод. На стадії біологічного очищення видаляється не тільки основна маса органічних забруднень, але й забезпечується очищення від сполук азоту й основної частини сполук фосфору. Аеротенк – резервуар, у якому повільно рухається суміш активного мулу й стічних вод. Для забезпечення нормального перебігу процесу біологічного окислення у аеротенк повинен безперервно надходити кисень. Слід зазначити, що в процесі окислювання органічних речовин розмножуються аеробні мікроорганізми, і біомаса активного мулу збільшується, тому частину активного мулу повертають в аеротенк [93].

Стічні води надходять в аеротенки, як правило, після споруд механічного очищення. З аеротенків суміш стічних вод з активним мулом надходить на вторинні відстійники для вилучення з води активного мулу. Якісний активний мул добре відстоюється у вторинних відстійниках при тривалості відстоювання до 1,5 год, частина його знову повертається в аеротенк (рециркуляція активного мулу), а надлишок (надлишковий мул) направляється на мулоуцільнювачі для зменшення його вологості. Аеротенки дозволяють отримувати високий ступінь очищення стічних вод

з доведенням вмісту органічних речовин в очищених стічних водах за БПК_{повн} до 15 мг/л [93]. В цілому даний процес можна ілюструвати наступною схемою (Рис. 10.1):



Рис. 10.1. Традиційне біологічне очищення води в аеротенку

Глюконова кислота не утилізується, оскільки вона являється цінним продуктом. Глюконову кислоту використовують в якості харчової добавки. Вона відповідає за регуляцію кислотності і розпушення. Крім того, вона є підкислювачі, комплексоутворювачем, підсилює дію антиоксидантів. В якості підкислювача використання цієї речовини нераціонально. Справа в тому, що за смаковими властивостями глюконова кислота слабкіше лимонної в 5 разів, і для надання продуктам кислого смаку її застосовують у виняткових випадках. Крім харчової промисловості, глюконову кислоту використовують в деяких інших галузях. З її допомогою синтезують миючі засоби, а у фармацевтичній промисловості вона служить наповнювачем таблеток [94].

Отже, доцільним є впровадження виробництва глюконової кислоти для реалізації її оптової торгівлі на фармацевтичні та харчові підприємства.

10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Тверді відходи етапу санітарної підготовки виробництва і підготовки поживних середовищ представлені пакувальною тарою для мийних засобів і компонентів поживного середовища. Тара для мийних засобів виготовлена із поліетилену високої щільності, який піддається вторинній переробці (IV

клас небезпеки). Переробка пластику складається з декількох етапів: збір; сортування, пресування; власне переробка (різка, промивання, сушіння, виробництво регранулята); виробництво нової продукції.

При виробництві лимонної кислоти мікробіологічним методом за допомогою *Aspergillus niger* EB-12 утворюються такі тверді відходи: фільтрат цитрату кальцію, гіпсовий шлам та міцелій гриба [95].

Концентрований фільтрат цитрату кальцію – це темна та густа рідина з кисло-солоним смаком і запахом паленого цукру. Під час процесу випаровуванні в умовах розрідження фільтрат мало змінюється, при тиску вищому за атмосферний, вміст амінокислот зменшується на 40%. Середній хімічний склад сухих речовин в фільтраті цитрату кальцію наведено в таблиці 10.1.

Таблиця 10.1.

Сухі речовини	% _{мас.}
Сирий протеїн	23,0-25,0
Білок	1,40-1,90
Вільні амінокислоти	3,0-6,0
Бетаїн	7,0-14,0
Безазоті речовини	48,0-50,0
Інвертний цукор	3,0-6,0
Лимонна кислота	3,0-6,0
Леткі кислоти	1,20-1,40
Мінеральні речовини(зола)	25,0-30,0

Фільтрат після концентрування використовують як добавки до кормів тварин з метою збільшення протеїну до 25%, який містить всі незамінні амінокислоти. Концентрований фільтрат згодовують молодняку великої рогатої худоби у віці не молодше 9–10 місяців і дорослим тваринам, зокрема, коровам. Випарений фільтрат можна змішувати з частково підсушеним міцелієм гриба *Aspergillus niger* і отримувати суху комбіновану кормову добавку або змішувати їх безпосередньо перед згодовуванням тваринам. Добова норма фільтрату складає 0,6–1,3 кг на одну тварину [95].

Гіпсовий шлам, який утворюється у вигляді твердого відходу може використовуватися як меліорант, солончаковий ґрунт, для вапнування кислих ґрунтів та у виробництві будівельних матеріалів [95].

Відомо, що на кожну вироблену тонну лимонної кислоти у відході йде 250±10 кг сирого міцелію вологістю 75-85%. Встановлено, що до складу клітинної стінки гриба *Aspergillus niger* входять цінні полісахариди – хітин і глюкани тварину [96].

Також, на даний час, розглядається можливість переведення хітину, добутого з біомаси гриба *Aspergillus niger*, в надзвичайно цінний біополімер – хітозан [97]. Хітозан – це природний амінополісахарид, лінійна структура якого складається з D-глюкозамінних мономерів, з'єднаних β-1,4-зв'язками. Хітозан знайшов широке застосування в різних галузях промисловості, в тому числі в якості сировини для виготовлення плівок, мембран та волокон [97].

Хімічний склад міцелію гриба *Aspergillus niger* наведено у таблиці 10.2.

Таблиця 10.2.

Компоненти	Вміст
Органічні речовини, %	75 – 80
Мінеральні речовини (зола), %	20 – 25
Моносахариди та сахароза, %	0,38 – 0,42
Полісахариди, %	13 – 20
Сирий протеїн, %	25 – 32
Хітин, %	10 – 16
Стероли, %	0,20 – 0,30

Міцелій використовується, насамперед, як добавка до кормів тварин. Міцелій цінний головним чином вмістом сирого протеїну, в якому присутні в значних кількостях всі незамінні для тваринного організму амінокислоти.

Перетравлюваність білка приблизно 50%. Разом з повноцінним білком міцелій містить вуглеводи, жир та його супутники, мінеральні речовини, мікроелементи, вітаміни. Сирий (вологістю 75%) міцелій, швидко розкладається, тому не зберігається і використовується господарствами головним чином в зимовий і весняний періоди року. Додаванням міцелію до кормів можна відшкодувати в раціонах тварин та птиці до 30% протеїну. Міцелій в складі кормів підвищує апетит у тварин, збільшує прирости молодняку великої рогатої худоби на 25-28%, свиней на 8-9%, курчат в 2,1 – 2,3 рази при зниженні приблизно на 5% витрати кормів. М'ясо не відрізняється за хімічним складом і жирністю, підвищується вміст жиру в молоці. У курей-несучок зростає на 5% несучість, зміцнюється шкаралупа яєць [98].

Міцелій містить біотин у зв'язаному вигляді. Для використання в якості джерела ростових речовин при виробництві хлібопекарських дріжджів міцелій піддають кислотному гідролізу 15%-ною сульфатною кислотою при надлишковому тиску 0,15 МПа протягом 1 хвилини. Додавання 10% гідролізату (у перерахунку на сухі речовини міцелію) до маси меляси на стадії приготування посіву дріжджів підвищує їх вихід до 12%. Гідролізатом міцелію може замінити N_2 в середовищах для культивування ентомофторових грибів у виробництві біопрепаратів та в інших виробництвах, заснованих на життєдіяльності мікроорганізмів, у тому числі і в самому виробництві лимонної кислоти. Використання міцелію як добрива сприяє росту рослин. Сухий міцелій рекомендовано застосовувати у виробництві різноманітних високоякісних будівельних і дорожніх матеріалів. При виробництві цегли і керамзиту він замінює дорогі вигоряючі добавки органічних речовин, збільшує міцність цегли на 7 – 10% і знижує його об'ємну масу. Міцелій разом з гіпсовим шламом можна використовувати для отримання пористих будівельних плит [98].

Також, в якості твердих відходів у виробництві лимонної кислоти є кристали. Оскільки під час проведення процесу кристалізації можуть утворюватися кристали, розмір яких не відповідає стандарту. Дані кристали розчиняють і подають на випарювання. До того ж, частина з них використовується, безпосередньо, як затравка для наступної кристалізації.

10.2.3. Система знешкодження та утилізації газоповітряних викидів

Атмосферне повітря забруднюється різними газами, дрібними часточками і рідкими речовинами, які негативно впливають на живі істоти, погіршуючи умови їх існування. Джерела його забруднення можуть бути природними і штучними [92].

Газоподібних відходів в процесах біологічної технології є дуже багато. Енергетичним субстратом для біооб'єктів є вуглеводи. У аеробних і анаеробних умовах з них утворюється діоксид вуглецю. Діоксид вуглецю, що виділяється, уловлюється і утилізується в харчовій промисловості в якості холодагенту. Відпрацьоване повітря біотехнологічних процесів не повинне поступати в атмосферу без очищення і знешкодження [99].

Відпрацьоване повітря є високодисперсним аерозолем, в якому дисперсною фазою виявляються крапельки рідини і мікроорганізми. Вони легко переносяться повітряними потоками і на великі відстані. Відпрацьоване повітря має бути термічно оброблене і тільки після цього піддається фільтраційному очищенню [99].

Для ефективної очистки газів виробництва використовуються промислові скрубери. Скрубер використовується не лише для очищення газів з твердими забрудниками, він успішно працює і під час уловлювання газоподібних забрудників. Апарат мокрого очищення набагато ефективніший, ніж такий же аналог з сухим очищенням. Змочування і подальше видалення твердих часток здійснюється під час зіткнення води з твердими частками і стікання водяної плівки по стінках агрегату. Попереднє очищення забруднених газів виконується в порожнистих або з насадкою

скруберах. До переваг пристрою відносяться наступні експлуатаційні характеристики [100].

1) Висока міра очищення повітря. Скрубери Вентурі можуть уловлювати тверді частки $\varnothing \geq 0,1$ мкм. Такі показники повністю відповідають існуючим нормативним вимогам по очищенню промислових газових викидів в атмосферу;

2) Відносно низька вартість. За рахунок цього зменшується собівартість продукції, збільшується прибутковість підприємств;

3) Універсальність застосування. Скрубери Вентурі можуть не лише очищати повітря, але і охолоджувати або зволожувати [100].

Принцип дії: У верхній конус подаються забруднені гази і вода, в середній частині потік значно прискорюється, вода розбивається на найдрібніші краплі і обволікає тверді частки. У нижній частині (дифузори) швидкість руху зменшується, частки пилу склеюються між собою і опускаються в спеціальний піддон. Чисте повітря скрубери Вентурі викидають в атмосферу [101].



Рис. 10.1. Конструкція скрубера Вентурі [101].

10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Для зменшення обсягів газоподібних відходів при процесі сушіння передбачають використання сушарок з економною витратою сушильних агентів. Відпрацьовані теплоносії та конденсат подаються на регенерацію де за рахунок рекуперації тепла в теплообміннику відновлюються їх необхідні робочі температури.

Для зменшення об'ємів рідких відходів потрібно зменшити кількість відпрацьованого дезінфікуючого розчину «Естер Дез». Для цього використовується станція автоматизованої мийки обладнання (CIP-мийка). Використання даної станції має ряд переваг:

- можливість багаторазового використання миючих розчинів;
- можливість збору ополіскуючої води;
- підтримання заданої концентрації, температури миючих розчинів, часу обробки в автоматичному режимі;
- вбудована функція наведення миючих розчинів;
- можливість автоматичного і ручного режиму роботи;
- індивідуальні програми мийки для різних об'єктів;
- функція зворотнього зв'язку з об'єктами мийки;
- можливість модернізації – додавання додаткових контурів мийки і опцій;
- можливість нейтралізації миючих розчинів;
- економна витрата пари за рахунок системи рекуперації тепла;
- мінімальний вплив людського фактору;
- економна витрата миючих засобів, за рахунок контролю провідності при витісненні миючих розчинів і води з контурів мийки;
- економічність (низька витрата води, електроенергії, пари при високій якості мийки);

- надійність і простота у використанні;
- повна автоматизація і комп'ютерне керування параметрами [102].



Рис. 10.2. Станція СІР-мийки [102].

Як було сказано раніше, в якості основних твердих відходів виробництва лимонної кислоти є: фільтрат цитрату кальцію, гіпсовий шлам, міцелій гриба та незначна частина кристалів, які не відповідають стандартам. Дані відходи економічно вигідно утилізуються для виробництва, тому немає необхідності в заходах для зменшення їх об'ємів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Анацький А.С., Шквиренко Л.А. Дослідження процесу виділення кислот з відходів виробництва плодово-ягідних напоїв. Дніпров. держ. інст., м. Кам'янське, ст.101
2. Кислота лимонна моногідрат. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3504/kislota-limonna-monogidrat>
3. Декілька фактів про лимонну кислоту: властивості, застосування. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.0542.ua/list/5361>
4. Murat O., Esabi B.K. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* from Agro-Industrial ByProducts. Waste and Biomass Valorization. 2018. doi: 10.1007/12649-018-0240
5. Що таке лимонна кислота? [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.healthline.com/nutrition/citric-acid>
6. E330 Лимонная кислота. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://calorizator.ru/addon/e3xx/e330>
7. Мельник В. М., Ружинська Л.І., Сорокін Е.Г. Вплив ультразвуку на процес кристалізації лимонної кислоти. Міжнародний науковий журнал "Інтернаука". 2018, № 21(61), 3 т.: 35-38. doi.org/10.25313/2520-2057-2018-21-4485
8. ГОСТ 908 – 2004. Кислота лимонна моногідрат харчова. Стандартінформ, 2008. с. 1-15.
9. Бондар І.В., Гуляєв В.М. Промислова мікробіологія харчова і агробіотехнологія. Навч. посіб. для студентів. Дніпродзержинськ, видавництво ДДТУ, 2004. 280 с.
10. Пат. RU. Способ получения лимонной кислоты/ Выборнова Т.В., Львова Е.Б. Опубл. 22.04.2017. Бюл. №11
11. Addo M.G., Kusi A., Andoh L.A., Obiri-Danso K. Citric Acid Production by *Aspergillus Niger* on a Corn Cob Solid Substrate using One-factor-at-a-time

- Optimisation Method. International Advanced Research Journal in Science. 2016, 5 (4): 95-98. doi: 10.17148/IARJSET.2016.3120
12. Guc S. and Erkmen O., Citric Acid Production from Nontreated Beet Molasses by a Novel *Aspergillus niger* Strain. J Food Microbiol Saf Hyg. 2017. doi: 10.4172/2476-2059.1000122
 13. Переведенцева Л.Г. Грибы и грибоподобные организмы: учебное пособие. Перм. гос. ун-т. – Пермь, 2009 – 28-29 с.
 14. Пат. RU. Штамм гриба *Aspergillus niger* - продуцент лимонной кислоты/ Щербакова Е.Я., Никифорова Т.А., Галкин А.В., Жданова В.Н., Мушникова Л.Н., Опубл. 27.09.2013.
 15. Общая характеристика некоторых возбудителей микозов. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://nsau.edu.ru/images/>
 16. Муратова Е.И., Зюзина О.В., Шуняева О.Б. Биотехнология органических кислот и белковых препаратов: учебное пособие. Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2007 - 8 с.
 17. *Aspergillus niger*. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.mycobank.org>
 18. Анацький А.С., Шквиренко Л.А. Дослідження процесу виділення кислот з відходів виробництва плодово-ягідних напоїв. ДДІ, м. Кам'янське, ст.101
 19. Лимонна кислота застосування. [Електронний ресурс]//Режим доступу:<https://novohim.com.ua/ua/catalog/promislova-ximiya-j-sirovina/limonna-kislota/>
 20. Аналіз управлінської діяльності [Електронний ресурс]//Режим доступу: <http://www.ukrainereferat.org/uaref-2293-1.html>
 21. Аграрна супер-країна [Електронний ресурс]//Режим доступу:<https://www.epravda.com.ua/columns/2017/07/31/627430/>

22. Властивості лимонної кислоти як важливого продукту мікробного синтезу [Електронний ресурс]// Режим доступу: http://www.rusnauka.com/35_PWMN_2008/Chimia/38717.doc.htm
23. Крискова Л. Ринок кондитерських виробництв в Україні. – Т.: ТНТУ, 2019. – 143.
24. Кондитерська фабрика Рошен [Електронний ресурс]// Режим доступу: <https://www.roshen.com/ua/ua/pro-roshen>
25. Крижопільський цукровий завод виробив 12,5% цукру [Електронний ресурс]// Режим доступу: <http://ukrsugar.com/uk/post/krizopilskij-cukrovij-zavod-virobiv-cukru-125-vid-zagalnoderzavnogo-virobnictva>
26. Крижопільський цукровий завод [Електронний ресурс]// Режим доступу: <http://www.upi-agro.com.ua/ua/Home/MapDetails/2>
27. Murat O., Esabi B.K. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* from Agro-Industrial ByProducts. Waste and Biomass Valorization. 2018. doi: 10.1007/12649-018-0240
28. Васильченко О.А., П'янкова О.О. Біотехнологічні аспекти отримання лимонної кислоти. НАУ, м. Київ, 2012, 106-108 с
29. Вінницький цукровий завод [Електронний ресурс]// Режим доступу: <https://latifundist.com/kompanii/1416-vinnitskaya-ptitsefabrika>
30. Show P.L., Oladele K.O., Siew O.Y., Zakry F.A., Chi-Wei J.L., Ling T.C. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. Fron in Life Scien. 2015, doi: 10.1080/21553769.2015.1033653
31. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія : підруч./ Т.П. Пирог; НУХТ. – 2-ге вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010 – 221с.
32. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л., Бородай В.В., Коломієць Ю.В. Загальна (промислова) біотехнологія: навч. посіб. Київ, 2014. 179 с.
33. Штам *Aspergillus niger* продуцент лимонної кислоти [Електронний ресурс]// Режим доступу: <https://findpatent.ru/patent/219/2192460.html>

34. Васильченко О.А., П'янкова О.О. Біотехнологічні аспекти отримання лимонної кислоти. НАУ, м. Київ, 2012, 106-108 с.
35. Культивирование почвенных микроорганизмов родов *Aspergillus* и *Penicillium* – продуцентов антибиотиков. [Електронний ресурс] Режим доступу: http://www.rusnauka.com/3_SND_2010/Biologia/58221.doc.htm
36. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с.
37. Данилов П.І., Самойленко С.І. Апарати біотехнологічної промисловості: Підручник – Харків:НТУ «ХП», 2008. – 271 с.
38. Мотроненко В.В. Аналіз впливу перемішування на культивування міцеліальних грибів. КПІ, м. Київ 2015.
39. Фільтр грубої очистки [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://autom.com.ua/ua/filtr-gruboyi-ochistki-stisnenogo-povitrya-f-0010-df-italiya>
40. Магістральні фільтри [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/stysnene-povitria/magistralni-filtri-stisnenogo-povitrya.html>
41. Індивідуальні фільтри [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ahequip.net/wp-content/uploads/2015/07/ultrafilter-sterile-filter-PSRF.pdf> 26 розділ 5
42. Грегірчак Н.М. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР конспект лекцій - К.: НУХТ, 2020. – 177 с.
43. Класифікація миючих засобів [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://vitus-lviv.com.ua/novynu/klasyfikatsiya-myyuchyh-zasobiv>
44. Пугачевський Г.Ф. Товарознавство непродовольчих товарів. - К.: КНТУ. - 2010 - 324 с.
45. Неверова А.Н. Товароведение и организация торговли непродовольственными товарами : Учеб. Для нач. проф. образование -М.: ИРПО. - 2008. - 453с

46. МОЗ України. Державний реєстр дезінфекційних засобів [Електронний ресурс] // Режим доступу: [https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/Відкриті%20дані/2020_реєстр%20деззасобів%201-1006%20\(1\).pdf](https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/Відкриті%20дані/2020_реєстр%20деззасобів%201-1006%20(1).pdf)
47. Тонік Біоцид Плюс [Електронний ресурс]//Режим доступу: <https://datonal.org/?m0prm=3&m1prm=4&showItem=23>
48. Міродез Універ. Інструкція із застосування, склад [Електронний ресурс]//Режим доступу: <https://uk.stuklopechat.com/zdorove/113689-mirodez-univer-instrukciya-po-primeneniyu-sostav.html>
49. Засіб дезінфікуючий «Естер Дез» [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://egh-ingredients.com/news/zasib-dezinfikuyuchiy-ester-de/>
50. Каустична сода [Електронний ресурс] //Режим доступу: http://www.plasma.com.ua/ua/chemistry/chemistry/natrium_hidroxide.html
51. Бекер М.Е. Введение в биотехнологию: Пер. с латыш. - Рига: Пищевая промышленность, 1978. - 230 с.
52. Зиёдуллаев А. Э., Алимкулов С. О., Рустамов А. Ш., Маматмуродова Ф. Б. Способы выделения лимонной кислоты и очистки ее растворов: Научные исследование Я № 2 (3). 2016 – 20 с.
53. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання – К: НУХТ, 2013. – 143 с.
54. Ручай Н.С, Гребенчикова И.А., Технологія мікробного синтезу а : електронний курс лекцій для студентів спеціальности «Биотехнология». – Минск : БГТУ, 2014. – 167 с.
55. Фільтр-прес автоматизований камерний модифікований (ФПАКМ) кислоту [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prod.bobrodobro.ru/33969>

- 56.Опис і принцип роботи камерного фільтр-преса [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://filter.press/filter-presses/opisanie_kamernogo_filterpressa/
- 57.Камерно мембранний фільтр-прес [Електронний ресурс] // Режим доступу:https://ua.ekoton.com/product/chamber_membrane_filter_press/
- 58.Шмид Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия, 2-е изд. (эл.) — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015, 327 с.
- 59.Пат UA. Технологічна схема одержання вапняного молока/Пономаренко В.В.,Опубл.25.10.2012.
- 60.Класифікація фільтрів [Електронний ресурс]// Режим доступу: <https://www.belstu.by/Portals/0/userfiles/72/LK/LK-1-13-2.pdf>
61. Мотроненко В.В. Вибір конструкції випарного апарату для концентрування розчину лимонної кислоти. КПІ, м. Київ 2016.
62. Чернобыльский И. И. Машины и аппараты химической промышленности // Учебное пособие / Москва-Киев «Машгиз», 1962 – 524 с
- 63.Олексієнко В.О., Буденко С.Ф., Паляничка Н.О. Розрахунки випарного апарата з центральною циркуляційною трубою. Методичні вказівки. Таврійський державний агротехнологічний університет, 2016 - 31 с.
- 64.Вакуум випарний апарат [Електронний ресурс]//Режим доступу: <https://molkom22.ru/tehnologicheskoe-oborudovanie/vakuum-vyparnye-ustanovky/vakuum-vyparnoj-apparat/>
65. Вакуум – фільтр [Електронний ресурс]// Режим доступу: <http://hydrotrend.ru/vakuum-filters/drum-vacuum-filters/drum-vacuum-filters-bon/>
- 66.Кристалізація і осадження [Електронний ресурс]// Режим доступу: https://www.mt.com/ru/ru/home/applications/L1_AutoChem_Applications/L2_Crystallization.html

67. Охолоджувально-кристалізаційна установка [Електронний ресурс]
//Режим доступу: <https://milk-system.com/ru/produksiya/okhladitelno-kristallizatsionnayaustanovka>
68. Центрифугування [Електронний ресурс]// Режим доступу: <file:///D:/LK-1-14-2.pdf>
69. Осаджувальна шнекова центрифуга [Електронний ресурс]// Режим доступу: <https://www.npo-center.com/products/15/117/>
70. Чернобыльский И. И. Машины и аппараты химической промышленности // Учебное пособие / Москва-Киев «Машгиз», 1962 – 524 с
71. Барабанна сушарка безперервної дії [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://ukrdoc.com.ua/text/5424/index-1.html>
72. Барабанна сушарка [Електронний ресурс]// Режим доступу : <http://malashonkov.ru/medpribor/sushilka.php>
73. Очистка повітря від частинок пилу [Електронний ресурс]// Режим доступу : https://7-vz.com/ua/category/ochistka_vozdukha_ot_pili/
74. Теплообмінник водяний [Електронний ресурс]// Режим доступу : <https://sev-vent.ru/teploobmenniki/tew-02-80-50>
75. Вугільний фільтр для очистки повітря [Електронний ресурс]// Режим доступу : <https://teko-ua.com/ugolnyij-filtryi.html>
76. Міродез Універ застосування [Електронний ресурс]// Режим доступу:<https://amoreshop.com.ua/mrodez-unver-dezrozchin-dlya-nstrumentv-poverhon-koncentrat-1000-ml/>
77. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: консп. лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2019. 60 с.
78. *Aspergillus niger* морфологія [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://uk.warbletoncouncil.org/aspergillus-niger-13405>

79. Шульга Н.М., Бовкун А.О., Млечко Л.А. Мікроскопіювання у санітарно-мікробіологічному контролі виробництва молочних продуктів: навч. посібник. К.: НУХТ, 2008. с. 17
80. Wanxia X., Liang L., Zhu M. Determination of Sugars in Molasses by HPLC Following Solid-Phase Extraction, International Journal of Food Properties, 2015, 18(3): 547-557. doi:10.1080/10942912.2013.837064
81. Буценко Л.М., Красінько В.О. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: лабор. Практикум - К.:НУХТ, 2011. 75 с
82. ГОСТ 31726-2012 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://docs.cntd.ru/document/1200098822>
83. Аналізатор вологості Елвір [Електронний ресурс]// Режим доступу: <https://gpsgeometer.ru/products/analizator-vlazhnosti-elviz-2s>
84. Аналізатор вологості [Електронний ресурс]// Режим доступу: <https://metrinco.com/uk/analizatory-volohosti/laboratornyi-analizator-volohosti-metrinco-m105ma>
85. Ельперін І.В. Автоматизація виробничих процесів: підручник / Вид. 2-ге виправлене – К.: Вид. Ліра-К, 2015. – 378 с.
86. Ельперін, І.В., Швед С.М. Автоматизація систем управління технологічними процесами: Конспект лекцій – К.:НУХТ, 2007. – 71 с.
87. Шляхи екологізації [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://oldconf.neasmo.org.ua/node/2903>
88. Тихомирова Г. Екологічна безпека галузі //Харчова і переробна промисловість. - 2006. - № 2. - С. 4-5.
89. Дейнеко Л.В., Купчак П.М. Екологізація виробництва як стратегічний пріоритет розвитку харчової промисловості. – Сімферополь: "СОНАТ", 2009. – 196 с.
90. Тихомирова Г. Екологічна безпека галузі //Харчова і переробна промисловість. - 2006. - № 2. - С. 4-5.

91. Запольський А. Екологізація харчових виробництв: Підручник для студентів вищих навчальних закладів. - К.: Вища школа, 2005. – 428 с.
92. Красінько В.О. Основи екобіотехнології: Конспект лекцій для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2011. – 144 с.
93. Айрапетян Т. С. Конспект лекцій з дисциплін «Очистка побутових стічних вод» ; Харк. нац. ун–т міськ. госп–ва ім. О. М. Бекетова. – Х.: ХНУМГ, 2014. – 121 с
94. Глюконова кислота [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://noilluk.netlify.app/xarchovi-dobavki5/glyukonova-kislota-v4801>
95. Хоменко О.М. Екологічно безпечне поводження з міцеліальними відходами біотехнологічного виробництва лимонної кислоти: - Ч: 2017. – 209 с
96. Muzzarelli R.A.A. Chitin. – Oxford: Pergamon Press, 1977. – 309 p.
97. Foster A.V., Webber M. Chitin // Adv. Carbohydr. Chem. - 1960. - 15. - P. 371-390.
98. Характеристика та використання міцеліальних відходів гриба *Aspergillus niger* [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://www.rusnauka.com/1_NIO_2013/Biologia/3_124988.doc.htm
99. Обезвреживание и утилизация отходов биотехнологических производств [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://mikrobiki.ru/>
100. Кобзар І.Г., Козлова В.В., Процеси і апарати захисту наколишнього середовища: Конспект лекцій: Част.1 - Ульяновськ: УлГТУ, 2007. – 68 с.
101. Скруббер Вентури: принцип работы, характеристики, преимущества и недостатки [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://gas-cleaning.ru/article/skrubber-venturi-princip-raboty-harakteristiki-preimushchestva-i-nedostatki>

102. Станція СІР-мийки [Електронний ресурс] // Режим доступу:
<https://www.kmbp.com.ua/produksiya/rishennia-dlia-molochnoi-promyslovosti/stantsiji-cip-mijki/stantsiia-cip-myiky-obladnannia-kmz-stsm>

ДОДАТКИ

Додаток 1

Схема з бази KEGG трансформація ростового субстрату

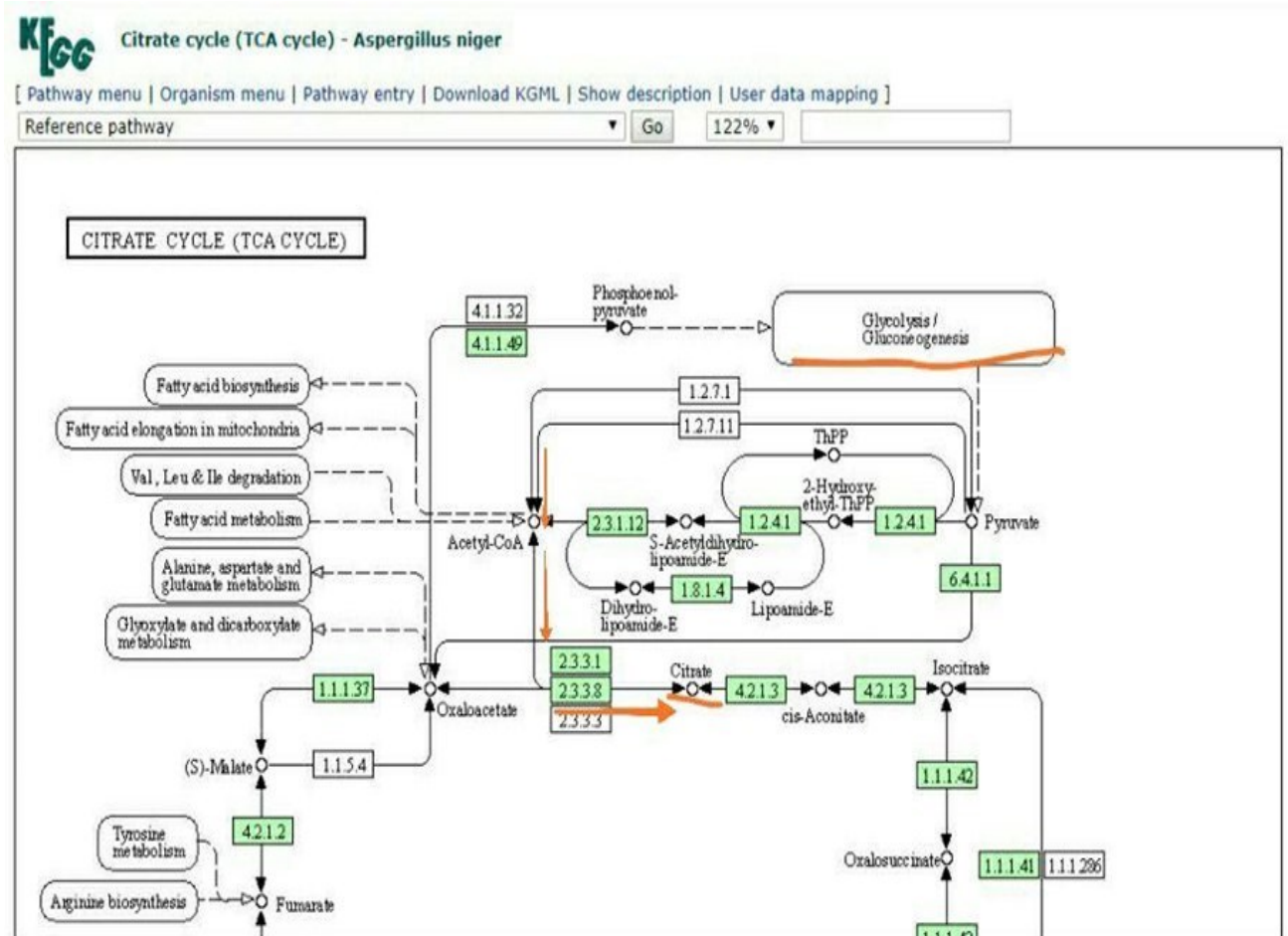
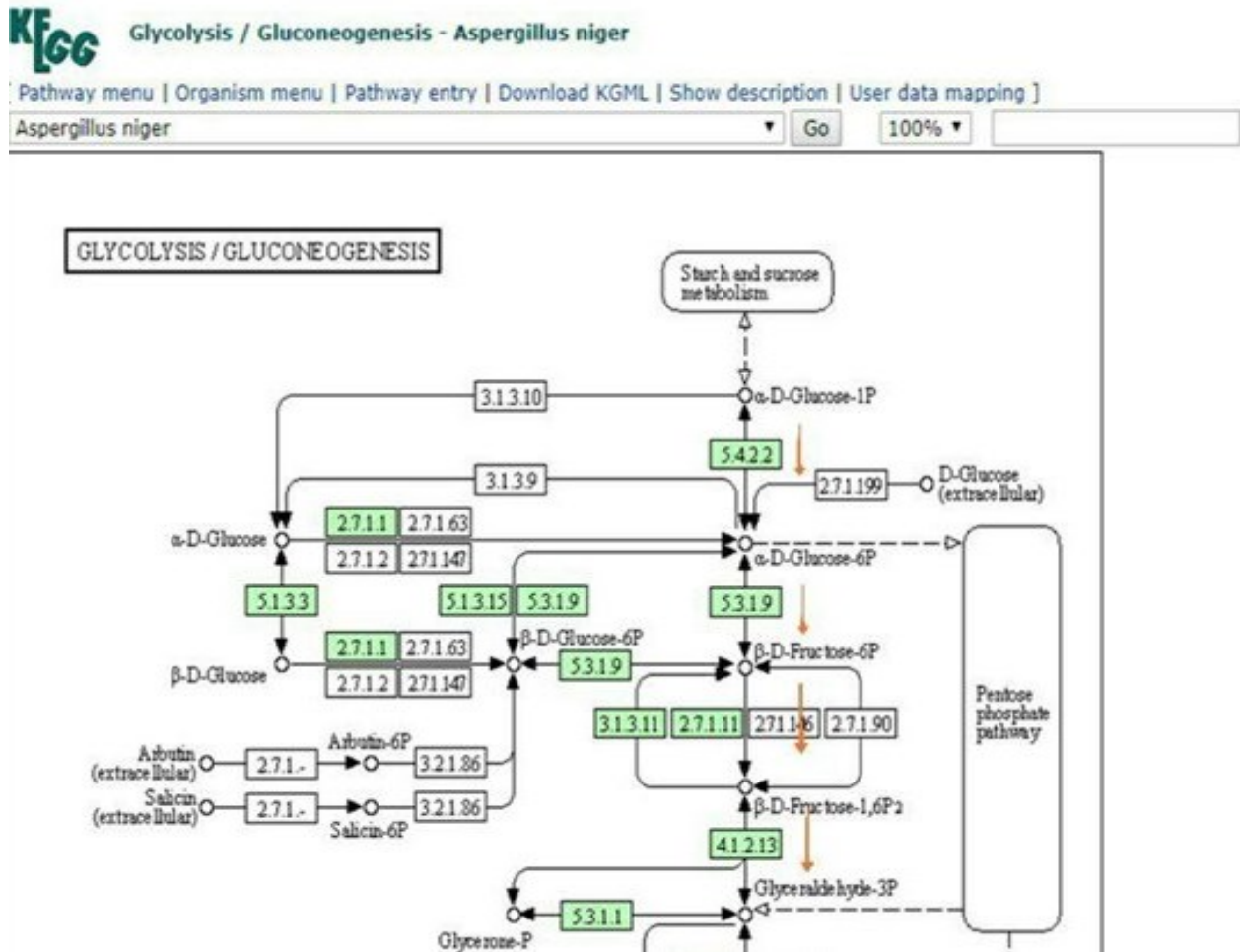


Схема з бази KEGG шлях катаболізму ростового субстрату у біологічного агента



Основні статті та першоджерела

Waste and Biomass Valorization
<https://doi.org/10.1007/s12649-018-0240-y>

ORIGINAL PAPER



Citric Acid Production by *Aspergillus niger* from Agro-Industrial By-Products: Molasses and Chicken Feather Peptone

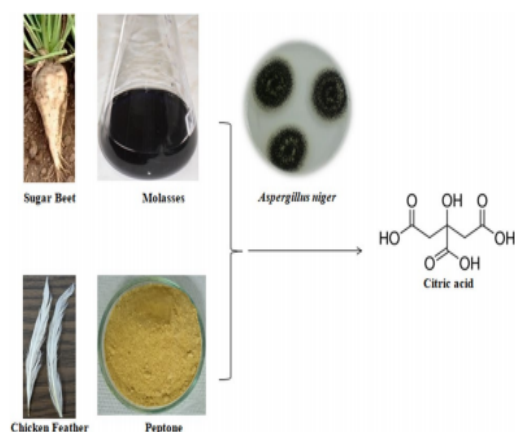
Murat Ozdal¹ · Esabi Basaran Kurbanoglu¹

Received: 22 October 2017 / Accepted: 12 February 2018
 © Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018

Abstract

Citric acid is a commercially important organic acid with a wide range of applications. To reduce the cost of producing citric acid, sugar beet molasses and chicken feather peptone (CFP) were used as the sole carbon and nitrogen sources, respectively for submerged citric acid biosynthesis using *Aspergillus niger*. To improve the citric acid production, the parental isolate of *A. niger* MO-25 was improved by mutation using ethidium bromide. Citric acid production using molasses was significantly affected by CFP concentrations (1–6 g/L). The maximum citric acid concentration was determined at 4 g/L CFP and 168 h. When CFP compared to commercial peptones (casein and bacto), the highest citric acid production was obtained with CFP. Furthermore, the addition of KH_2PO_4 (0.15 g/L) enhanced citric acid production (68.8 g/L). These results suggested that sugar beet molasses supplemented with CFP as organic nitrogen and mineral salt sources could be utilized for the economical and efficient production of citric acid. This is the first study to investigate the influence of CFP for citric acid production.

Graphical Abstract



than fungal fermentation [2]. *Aspergillus niger* and *Yarrowia lipolytica* are well known producers of citric acid from agro-industrial wastes. However, *Y. lipolytica* produces significant amount of unwanted by-product, isocitric acid. *A. niger* is the most commonly used fungus to produce citric acid because of its relatively high yield, ease of harvesting and ability of using a variety of raw materials [3, 4].

Citric acid production by *A. niger* is strongly influenced by the composition of the medium (the type and concentration of the carbon, nitrogen, phosphate and trace elements), the pH of the fermentation medium, oxygen, the morphology of the citric acid producing microorganism, and the fermentation method [3, 5–8].

The improvement of microbial strains for the over-production of microbial products has attracted attention in the fermentation process. For this purpose, mutagenic agents (*N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, ethyl-methane sulphate, ethidium bromide and ultraviolet radiation) have been applied to *A. niger* strains to improve citric acid production [9–11]. Chemical mutagenic agents such as ethidium bromide [12], *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine [13] and NTG [14] were found to be better mutagenic than UV for citric acid production.

Different hydrolytic enzymes are generally produced by *A. niger* [11, 15]. For this reason, various agro-industrial by-products or wastes (molasses, apple pomace, pineapple waste, cassava baggasse, banana peel and kiwi fruit peel) have demonstrated high potentials for the commercial production of citric acid [16–18]. The production of citric acid using cheap and renewable carbon and nitrogen sources from agro-industrial by products provides considerable advantage combined in the benefit of waste management as well as decrease in the cost of citric acid production [16]. Molasses is a by-product obtained from the sugar industry, and it is commonly used as carbon source for the production of biotechnological products (e.g. enzymes, organic acids, pigments, polysaccharides). It also contains valuable compounds for the fermentation process like amino acids, minerals and organic compounds [19]. Poultry-processing plants generate million tons of chicken feathers annually worldwide as a bioorganic waste product. Since feathers are discarded as waste and degraded very slowly in nature, they may become an environment problem [20, 21]. Feathers, which constitute up to 10% of total chicken weight, are composed of over 90% protein composed of keratin [21–23]. Keratin is a source of valuable amino acids and keratin wastes can be hydrolyzed with acid or enzymatic hydrolysis for the use of microorganisms [21, 24]. This paper aims to contribute to the use of agro-industrial wastes (molasses and chicken feather) as substrates for the production of citric acid.

Materials and Methods

Preparation of Chicken Feather Peptone

The chemicals used in this study were analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and Difco (Detroit, MI, USA). Chicken feathers were supplied by a chicken processing plant at Devrek, Zonguldak, Turkey. Chicken feathers were washed with deionized water and dried in oven at 60 °C. Dried feathers were cut into smaller pieces and then these smaller pieces were powdered with a blender. This material was hydrolysed by modifying the method of Kurbanoglu and Kurbanoglu [25], and the production process of CFP is shown in Fig. 1.

Isolation and Identification of *A. niger*

The wild-type strain of *A. niger* MO-25 was isolated from soil sample by the serial dilution method. Culture growing on PDA and Malt Extract Agar was identified according to microscopic observations such as morphological characters of mycelium and conidia [26]. Furthermore, genomic DNA was extracted from the isolate and the sequencing of the Internal Transcribed Spacers (ITS) regions, specifically the ITS1 and ITS2 non-coding regions flanking the 5.8S rDNA was used to determine the specie [27]. The ITS rRNA gene was sequenced and searched in GenBank. This strain was maintained on PDA slants at 4 °C.

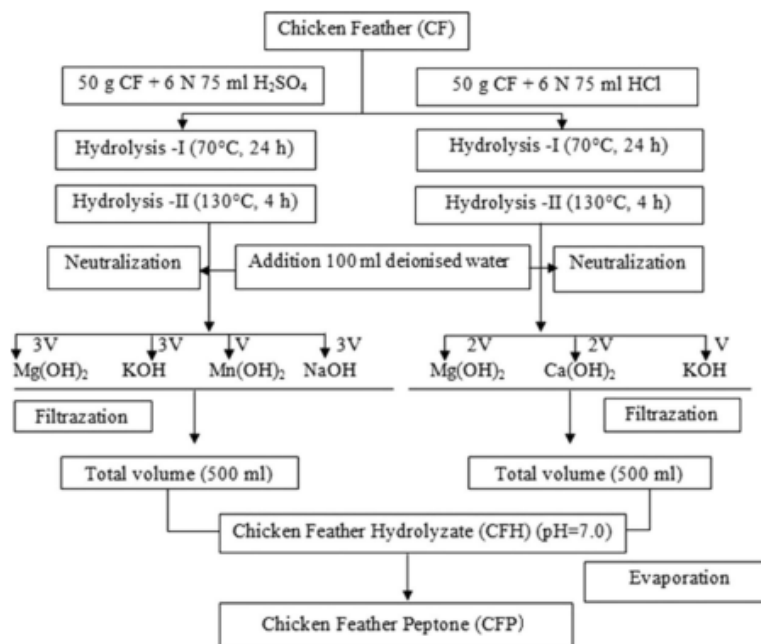
Preparation of Conidial Inoculum

To prepare conidial suspensions, *A. niger* isolates were grown on PDA slants at 30 °C for 7 days. A spore suspension was prepared by adding 10 mL sterile distilled water containing 0.1% Tween-80. The spore suspensions were adjusted to 5×10^6 – 1×10^7 spores/mL using hemocytometer.

Mutagenesis Using Ethidium Bromide

The wild-type strain of *A. niger* MO-25 was used for strain improvement by mutation. Ethidium bromide (EB) was selected as the chemical mutagen. The diluted spore suspension (1×10^7 spores/mL) were treated with EB at 0.5 mg/mL and finally incubated at 28 °C. At the end of 30, 60, 90, 120 and 150 min. of incubation, the treated suspensions were washed three times with sterile saline water [12]. After the treatment of spores, 100 fold serials dilution of spores were arranged to give more or less 30–40 colonies per plate. In dark conditions, the treated suspensions (0.1 mL) were poured to the separate PDA

Fig. 1 A production scheme for CFP



plates containing 2% triton X-100 as colony restrictor. The untreated spore suspension was also plated as a control.

Screening of Cultures of *A. niger*

The *A. niger* mutants were screened qualitatively in petri plates containing Foster medium (5 g/L glucose, 1 g/L peptone, 1 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L MgSO_4 , 15 g/L agar, pH 5) with bromocresol green (0.5 g/L) as an indicator [10]. *A. niger* mutant strains producing citric acid were selected on the basis of the Acid Unitage (AU) value. The amount of citric acid was related to the zone of color change. After incubation at 30 °C for 5 days, AU value was measured by the following formula: $\text{AU} = \text{DA}/\text{DC}$ (DA: Diameter of acid zone, DC: Diameter of the colony). The mutant strains with high AU value were selected and transferred to PDA slants. Selected *A. niger* mutants were used for further screening by submerged fermentation.

Pretreatment of Molasses

Sugar beet molasses obtained from Erzurum Sugar Mill (Turkey). For potassium ferrocyanide ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) treatment, the pH of the molasses solution containing 200 g/L of total sugars was adjusted to pH 5.5 with 1 N H_2SO_4 and the solution heated at 90 °C for 15 min. The hot liquid was treated with 0.1 g/L $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ to encourage the

precipitation of heavy metals, allowed to stand for 24 h at room temperature and then centrifuged at 3000 rpm for 10 min.

Fermentation Medium

The screening experiments were performed in molasses-peptone medium containing treatment 150 g/L molasses sugar and 2 g/L CFP. To study effect of CFP on the citric acid production, chicken feather peptone medium (CFPM) contained the following: treatment 150 g/L molasses sugar and 1–6 g/L CFP. The pH of the media were adjusted to 6.0 with 1N H_3PO_4 and 1N NaOH before autoclaving at 121 °C for 15 min. The 200 ppm $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ solution was added before inoculation while the medium still hot. After cooling at room temperature, 1 mL of spore suspension was inoculated to 50 mL of medium in 250 mL flasks and incubated at 30 °C on a rotary shaking incubator at 200 rpm. Later, CFP was compared with two commercial peptones (bacto peptone [BP], casein peptone [CP]) at the optimal CFP concentration.

The influence of KH_2PO_4 and MgSO_4 on the citric acid production was also investigated. KH_2PO_4 was further optimized in the range of 0.05–0.25 g/L for improved citric acid production. The effect of MgSO_4 on the production citric acid was studied in the concentration range of 0–0.2 g/L.

Analytical Methods

Total sugar, dry matter and ash contents of the CFP were estimated by AOAC methods [28]. Total nitrogen and fat contents were determined by the Kjeldal method and Soxhlet extraction method, respectively. Amino acids in the CFP were analyzed as their pre-column derivatives by HPLC [29]. Citric acid was measured using pyridine-acetic anhydride method of Marrier and Boulet [30]. Briefly, pyridine and acetic anhydride were added to the diluted fermented broth with 1:1.3:5.7 ratios and after stirring, immediately placed in a water bath at 32 °C for 30 min. Citric acid concentrations were determined by spectrophotometer at 420 nm and by comparison with a standard curve. Reducing sugar was analyzed by the DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) method [31]. Biomass concentration was estimated by means of dry weight measurement. The yield of citric acid was calculated as following formula:

$$\text{Citric acid yield (\%)} = 100 \times [\text{citric acid (g/L)}/\text{consumed sugar(g/L)}]$$

Statistical Analysis

The media were compared against each other. The experiments were replicated three times in a randomized block design. All data were analyzed using the general linear models procedure of SPSS. Differences among means were tested for significance ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.

Results and Discussion

Production and Chemical Analysis of CFP

As shown in Fig. 1, 100 g chicken feathers were hydrolysed with acids (HCl and H₂SO₄), and then neutralized with NaOH, KOH, Mg(OH)₂ and Ca(OH)₂. The main chemical composition of CFP was shown in Table 1. CFP was found to be rich in both macro- and micronutrients. It was detected that CFP had high protein (56 g/100 g), ash (41.5 g/100 g) and low fat (0.2 g/100 g) contents. CFP contained all of amino acids, except methionine and tryptophan, at varying concentrations and was especially rich in alanine (3.758 g/100 g), leucine (5.019 g/100 g), glutamate (6.107 g/100 g), glycine (5.453 g/100 g), serine (4.250 g/100 g) and proline (8.106 g/100 g). Similar to this study, it has been reported that although animal feeds from chicken feathers are rich in glutamic acid, alanine, serine and leucine [32, 33]. The produced CFP has high nitrogen content (9 g/100 g), therefore it can be used as nitrogen source. As seen in Table 1, CFP was rich in especially N, Ca, K, Mg, S and Na because of the hydrolysis process. The chemical composition of peptone depends on hydrolysis and

Table 1 The main chemical composition of CFP

Components	g/100 g	Amino acids	g/100 g
Nitrogen	9.0	Aspartate	3.07
Total protein	56	Glutamic acid	6.107
Total sugar	–	Asparagine	0.077
Fat	0.2	Serine	4.250
Ash	41.5	Histidine	0.302
Cu	0.2	Sarcosine	0.132
Zn	0.2	Proline	8.106
Fe	0.2	Hidoksil-L-proline	1.244
MgSO ₄	1.8	Glycine	5.453
K ₂ SO ₄	6.2	Threonine	0.010
Na ₂ SO ₄	6.45	Sitruilin	0.216
MgCl ₂	3.6	Arginine	1.174
CaCl ₂	9.1	Alanine	3.758
MnCl ₂	1.0	Tyrosine	0.846
KCl	4.6	Cysteine	0.817
		Valine	3.547
		Methionine	< 0.001
		Tryptophan	< 0.001
		Phenylalanine	2.756
		Isoleucine	2.513
		Ornithine	1.170
		Leucine	5.019
		Lysine	0.978

neutralization processes. The similar results were reported in the previous studies [34, 35]. These characteristics indicate that CFP important substrate for the production of many microbial products.

Citric Acid Production of the Wild-Type Strain and the Mutants

Aspergillus niger is very common species and it can be isolated from a wide variety of sources [26, 36]. In this study, *A. niger* MO-25 was isolated from soil. It was observed that the hyphae of *A. niger* were septate. The conidial heads were globose with an average diameter of 550 µm. Phialids borne on the metullae were fairly uniform. ITS rRNA gene sequence was applied to identify the strain MO-25, and it was identified as *A. niger*. The sequence of *A. niger* MO-25 was deposited in GenBank with the accession number KF939141.

Strain improvement is one of the promising approaches for increased production of industrially important metabolites by microorganisms. Many researchers reported that random mutation (radiation or chemical mutagens) and selection strategies (indicator dyes and 2-deoxy, D-glucose as selective marker) can be used for obtaining citric acid over producing isolates of *A. niger* [10, 37]. Strain improvement

of *A. niger* MO-25 was carried out by chemical mutagenesis (ethidium bromide, EB) to increase citric acid production. EB is a nucleic acid intercalating agent and frameshift mutagen. For this purpose, many researchers have been used this mutagen [38, 39]. The culture of *A. niger* MO-25 was treated with EB for different time intervals. With gradual increase in treatment time the number of survivors was decreased. Exposure of parent strain with EB for 150 min. gave 5.88% survivals rate.

Firstly, citric acid producer mutants were selected on bromocresol green indicator plates based on Acid Unitage (AU) value (Diameter of acid zone/Diameter of the colony) of a single colony. The halo formation resulted from the acid production in Foster medium, which was verified through the observation of a yellow halo formation (initially green), because of fall of pH (Table 2). Among the fifty-five mutants, EB-12 presented a DH/DC relation (1.82) higher than that presented by the wild (1.42) and the other mutants (1.30–1.79). Secondly, the mutants were screened for their ability to produce citric acid in molasses-peptone medium for 168 h (Table 2). In this medium, mutant EB-12 produced a maximum of 46.3 g/L of citric acid while its parent strain (MO-25) produced only 31.08 g/L of citric acid. As shown in Table 2, the mutant strain EB-12 gave 1.48-folds higher production of citric acid compared with the parent strain. For this reason, EB-12 mutant strain was used throughout the study.

The Effects of CFP on Citric Acid Production

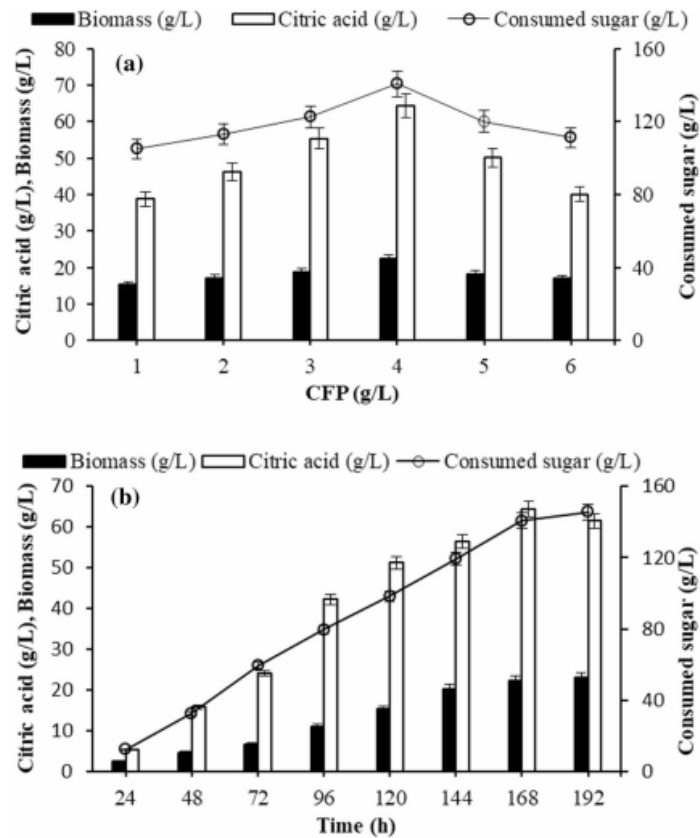
Figure 2a depicts the effect of different CFP concentrations (1–6 g/L) on citric acid fermentation by the mutant *A. niger* EB-12, using $K_4Fe(CN)_6$ treated molasses (15.0%,

w/v sugar) as a carbon source. It was found that addition of CFP into the molasses peptone medium had a promoting effect on the excretion of citric acid from mycelial cells. The maximum citric acid production (64.40 g/L) was obtained with CFP at a concentration of 4 g/L for 168 h. The biomass and sugar consumption were 22.41 and 140 g/L, respectively. The highest fermentation yield (45.7%) was obtained with CFP at the concentration of 4 g/L and the lowest fermentation yield (36.03%) was obtained with CFP at the concentration of 6 g/L. As seen in Fig. 4, with regard to citric acid yield, significant differences were obtained between media ($P < 0.05$). Citric acid production promoting effect of CFP may be related to the chemical composition of CFP. As seen in Table 1, CFP was observed to be rich in both amino acids and various salts. These nutrients have a positive effect on growth and citric acid production. Some amino acids (arginine, glutamate, glycine, aspartate, lysine and valine) enhance the production of citric acid [40–42]. Firstly, this increase can be explained with amino acids cause physiological acidity in the medium which is favourable for citric acid fermentation. Secondly, the citric acid cycle takes place in the mitochondria of the cell. Amino acids can enter at different steps (varies greatly from one amino acid to the other) in the citric acid cycle and they provides precursors for citric acid production [43]. For example, the aspartic acid and glutamic acid are degraded to oxaloacetate and α -ketoglutarate, respectively. It was reported that the presence of glutamic acid, aspartic acid and lysine stimulated citric acid production to the extent of 80, 77 and 62%, respectively [42]. Also, Ali et al. [41] found that glycine and arginine were suitable for citric acid production by co-culture consortia of *Aspergillus ornatus* and *Alternaria alternata*. CFP contains these amino acids at various concentrations. The positive effect of CFP on the citric acid production can be explained by the change in mycelial morphology (pellet shape and size) and increasing use of sugar. The positive effect of Mg^{2+} and Ca^{2+} in CFP might also be related to the increase of mycelial branching level which improves the performance of the citric acid production process [37, 44, 45]. Researchers have also reported such beneficial effects of Mg^{2+} , Ca^{2+} and Cu^{2+} in counteracting the Fe^{2+} effect [46]. Moreover, Pera and Callieri [45] reported that addition of $CaCl_2$ into fermentation medium increased the uptake of sugar. At lower CFP concentrations, less citric acid formed might be due to the lower supply of available nitrogen for fungal growth. Further increase in the concentration of CFP (beyond 4 g/L) decreased production of citric acid. This inhibitory effect may be due to high salt concentration, some toxic materials in CFP and, change of the C/N rate of culture medium [35, 47]. Since molasses are rich both macro- and micronutrients, molasses medium rarely need

Table 2 Screening of selected mutants of *A. niger* on indicator medium and in molasses peptone medium

Strain no.	Plate screening	Submerged fermentation
	Acid unitage (AU)	Citric acid (g/L)
MO-25	1.44	31.08
EB-4	1.66	37.50
EB-5	1.74	39.40
EB-8	1.56	34.60
EB-9	1.77	41.56
EB-12	1.82	46.30
EB-13	1.67	37.65
EB-14	1.79	42.46
EB-26	1.79	41.14
EB-29	1.71	38.40
EB-30	1.75	39.50
EB-38	1.65	36.80
EB-39	1.62	36.10

Fig. 2 **a** Effect of different concentrations of CFP on citric acid fermentation, **b** time course of citric acid production by *A. niger* EB-12 with molasses sugar (15%) and CFP (4 g/L) as the substrates



to be supplemented with a nitrogen source [19, 48]. This indicated that the nutrients in the CFP (4 g/L) were suitable for microbial growth and citric acid production.

The effect of fermentation time on citric acid production is presented in Fig. 2b. Citric acid production started after 24 h of fermentation. Citric acid production starts typically in the exponential growth phase and reaches maximum at late exponential or stationary phase [9]. This finding indicates that citric acid is a primary metabolite. The maximum of 64.40 g/L citric acid production was achieved at 168 h in CFPM. Similar, the maximum citric acid production in *A. niger* has been reported to occur on the 7th day of fermentation by the researchers [49, 50]. After this optimum fermentation time did not show any increase in citric acid production. It might be due to the reduced available nitrogen and carbon sources in the fermentation medium, age of fungi and inhibitors produced by fungi itself [18, 50].

Effect of Different Organic Nitrogen Sources on the Citric Acid Production

The effect of different peptones such as CFP, casein peptone (CP) and bacto peptone (BP) at the concentration of 4 g/L were investigated on citric acid fermentation by the mutant *A. niger* EB-12 (Fig. 3). It was found that the CFP gave significantly high citric acid production in comparison with the other peptones ($P < 0.05$). These commercial peptones have low ash content [34] and they are fairly expensive organic nitrogen sources compared with CFP. However, rich amino acid and salt content of CFP stimulated cell growth and citric acid biosynthesis in *A. niger* EB-12. This indicates that the macro- and micronutrients in the CFP suitable for microbial growth and citric acid production. The citric acid yields with CFP, CP and BP as nitrogen sources were 45.7, 30.1 and 34.6%, respectively. To reduce the production costs and enhance yield of citric acid, the low cost nitrogen sources

Table 3 Citric acid production in different fermentation media containing sugar beet molasses

Citric acid (g/L)	Fermentation medium (g/L)	pH	Treatment	Cultivation conditions	References
113.50–74*	Sugar beet molasses (total sugar) 160, NaNO ₃ 4, H ₂ PO ₄ 1, MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.23, FeCl ₃ 0.02, ZnSO ₄ ·0.0012, MnCl ₂ ·H ₂ O 0.0012	4	CaPO ₄	F	[9]
87.81*	Sugar beet molasses (total sugar) 140, corn steep liquor 7.25, KH ₂ PO ₄ 0.5, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.15, FeCl ₃ 0.01, ZnSO ₄ 0.0006, MnCl ₂ ·H ₂ O 0.0006	4	CaPO ₄	B	[51]
44.62–34*	Sugar beet molasses (total sugar) 150, NaNO ₃ 4, KH ₂ PO ₄ 1, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.23, FeCl ₃ 0.02, ZnSO ₄ 0.0012, MnCl ₂ ·H ₂ O 0.0012, 1% ethanol	4	H ₂ SO ₄	F	[53]
105–84*	Sugar beet molasses (total sugar) 150	5.8	K ₄ Fe(CN) ₆	B	[48]
52.3—	Sugar beet molasses (total sugar) 140, (NH ₄) ₂ ·SO ₄ 2, KH ₂ PO ₄ 2, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5, NH ₄ Fe(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O 0.9, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.5, CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.25	5	K ₄ Fe(CN) ₆	F	[50]
68.80–48*	Sugar beet molasses (total sugar) 150, CFP 4, KH ₂ PO ₄ 0.15	6	K ₄ Fe(CN) ₆	F	This study

*Yield

B bioreactor, F flask

such as ram horn hydrolyzate [24], corn steep liquor [51], and gelatin net hydrolysate [49] have been used as alternative nitrogen sources. These researchers reported that the ram horn hydrolyzate, gelatin net hydrolyzate and corn steep liquor increased citric acid yield 1.5, 2.5 and 14 times than the basal mediums, respectively. When CFP was used, it was determined that citric acid production increased 1.5 folds.

Effect of KH₂PO₄ and MgSO₄ on the Citric Acid Production

As shown in Fig. 4a, we investigated the effect of KH₂PO₄ on the production of citric acid. A range of KH₂PO₄ concentrations (0.1–0.25 g/L) were tested in order to identify the optimum KH₂PO₄ concentration for producing citric acid. As shown in Fig. 4a, the highest production rate of citric acid (68.8 g/L) was obtained by the addition of 0.15 g/L of KH₂PO₄ to the production medium. Low levels of phosphate have a positive effect on citric acid production [5, 52]. Berovic et al. [48] reported that production of citric acid (using sugar beet molasses) was achieved at only 50 mg/L H₃PO₄.

There was no need addition of MgSO₄ as it was generated during the neutralization of the CFP (Fig. 4b). Further increase in the concentration of MgSO₄, gradually reduced citric acid synthesis, becoming low (45.78 g/L) at 0.2 g/L MgSO₄. As mentioned Table 1, CFP contains some of the magnesium salts such as MgSO₄ and MgCl₂, and consequently offers a rich source for culture media. The high concentration of Mg²⁺ inhibit citrate synthase which results in a decrease in the production of citric acid [37].

A wide range of citric acid production yield by *A. niger* using sugar beet molasses as carbon source has been reported. The citric acid production achieved in the present study with *A. niger* mutant EB-12 (68.8 g/L) using sugar beet molasses and CFP at optimal concentrations was much

greater than the yields obtained in several previous studies (Table 3).

Conclusion

Agro-industrial wastes are increasing continuously due to the ever-increasing world population. The effective use of these residues for the production of bio-products by micro-organisms has many advantages, such as value addition and waste management. The present study demonstrated the potential of molasses supplemented with CFP as alternative cheap substrate for citric acid production. The production of citric acid using different agro-industrial by-products with this strain is on-going in our lab. Bioreactor studies can be done to increase fermentation yield.

Acknowledgements Authors thank the Ataturk University Scientific Research Project Fund for the financial support.

References

- Socol, C.R., Vandenberghe, L.P., Rodrigues, C., Pandey, A.: New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol. Biotechnol.* **44**(2), 141–149 (2006)
- Prado, F.C., Vandenberghe, L.P.S., Woiciechowski, A.L., Rodrigues-León, J.A., Socol, C.R.: Citric acid production by solid-state fermentation on a semi-pilot scale using different percentages of treated cassava bagasse. *Brazilian J. Chem. Eng.* **22**(4), 547–555 (2005)
- Dhillon, G.S., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D.: Recent advances in citric acid bio-production and recovery. *Food Bioprocess Technol.* **4**(4), 505–529 (2011)
- Show, P.L., Oladele, K.O., Siew, Q.Y., Aziz Zakry, F.A., Lan, J.C.W., Ling, T.C.: Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Front. Life Sci.* **8**(3), 271–283 (2015)



Citric Acid Production from Nontreated Beet Molasses by a Novel *Aspergillus niger* Strain: Effects of pH, Sugar and Ingredients

Seda Guç and Osman Erkmen*

Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, University of Gaziantep, 27310 Gaziantep, Turkey

*Corresponding author: Osman Erkmen, Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, University of Gaziantep, 27310 Gaziantep, Turkey, Tel: +90 3423172360; E-mail: erkmen@gantep.edu.tr

Received date: April 03, 2017; Accepted date: April 24, 2017; Published date: April 28, 2017

Copyright: © 2017 Guç S. This is an open-access article distributed under the terms of the creative commons attribution license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Effects of factors on the citric acid production from non-treated beet molasses were studied in *Aspergillus niger* OE55. Maximum amount of citric acid (19.13 and 34.62 g/L) was achieved when the initial pH of fermentation medium was 6.0 from 200 g/L and 150 sugar respectively. Citric acid production and biomass formation continuously increased during fermentation period in the media initially containing 200 g/L sugar. Remaining sugar (from 3.20 to 6.03 g/L) was higher at the end of fermentation in the media initially containing 160 g/L sugar than 200 g/L sugar. Yield of citric acid after 4 days of fermentation were ranged from 0.16 to 0.28 g/g from 160 g/L sugar. The high phosphorus and nitrogen levels stimulated biomass formation and reduced citric acid production. The optimum incubation for maximal citric acid production varies both with the sugar concentration in non-treated molasses and fermentation conditions for the novel *A. niger* strain. pH of fermentation media cannot have reduced below 4.72 and 3.35 in the media containing 200 and 160 g/L sugar, respectively, during fermentation, therefore citric acid production was not increased over 19.96 and 34.58 g/L respectively. This would be due to the formation of nitrogenous and polysaccharide compounds from molasses. Strain development in the citric acid production from wild strains depends mainly on the fermentation conditions.

Keywords: *Aspergillus niger*; Citric acid; Trace elements; Beet molasses

Introduction

Citric acid is widely used in the food, beverages, chemical, pharmaceutical, cosmetic and other industries [1]. It is mainly produced from submerged fermentation processes. Different *Aspergillus niger* strains have been used in the production of citric acid. The fermentation conditions optimization for mutated strain is primary importance in the development of any fermentation process owing to their impact on the economy [2,3]. Most of *A. niger* mutant strains, however, are not able to can produce commercially acceptable citric acid yields. *A. niger* can utilize cheap raw materials and produce higher amount of citric acid, thereby making the process more economical. The fermentation process involves the use of sugar (such as glucose and sucrose) supplemented with limited concentration of phosphate, nitrogen and trace elements. In all fermentation process, the use of carefully selected mutant strains is essential. For the strain to be viably used as industrial strain, it is screened for industrial citric acid production ability. Mutated strains have been found to produce more citric acid than the parent [4,5].

Citric acid production is strongly influenced by the composition of medium, especially concentration of carbon, phosphate, nitrogen and trace-metal ions. The presence of trace metals in toxic concentrations can be a significant problem during the fermentation of substrates into products. Concentrations of trace metals in molasses may be controlled by the treatment with ferrocyanide ion and treated molasses has been extensively used for citric acid production by *A. niger* [1,6].

citric acid requires treatment of beet molasses to remove ions (iron, zinc, copper, manganese and molybdenum) by means of precipitation, clarification and filtration, with or without active carbon. This treatment increases the cost of citric acid. Therefore, there is a requirement to *A. niger* strain able to produce citric acid from non-treated beet molasses. The citric acid concentration produced by wild strains is too low for economical processes, strain improvement was carried out to develop mutants of parent strain for increased production of the products [7,8]. However, strain development from wild strains to mutants depends mainly on the process of mutagenesis (physical and chemical agents). Developments of mutant strains which can synthesize higher concentration of citric acid within a short fermentation time and capable of growing at lower pH are preferred. The yield of citric acid was further enhanced by optimizing the fermentation parameters like temperature, pH, incubation time, substrate concentration, nitrogen source and several other ingredients to accumulate citric acid including strains of *A. niger* [7,9,10].

Turkey being an agricultural country is producing beet molasses more than 7.1×10^5 tons annually in 2014 and it is cheap raw material for citric acid production. Citric acid is one of the most useful organic acids in different industries and its worldwide demand is increasing day by day. So, the development of this technology would be highly beneficial. The present work, therefore, is concerned to improve a novel *A. niger* mutant strain for production of citric acid by submerged fermentation process using non-treated beet molasses. For this aim, optimization of fermentation parameters was studied: sucrose concentration, initial pH, phosphate, ammonium and trace elements.

Materials and Methods

Microorganism and beet molasses

The mold used in this study is a UV-mutant of a novel *A. niger* strain isolated from a beet mud sample (Erkmen, 2017) and is deposited in the Department of Food Engineering (microbial culture collection), University of Gaziantep (27310 Gaziantep, Turkey) with the strain code OE55. Beet molasses used in this research was obtained from Kayseri Sugar Ltd. (Kayseri, Turkey).

Batch fermentation

Flow sheet of citric acid fermentation process by *Aspergillus niger* is given in Figure 1. Spores suspension of *A. niger* OE55 was prepared by washing 3 days old culture potato dextrose agar (Difco) plate with sterile saline solution (0.9% NaCl) and shaking vigorously for 1 min. Spores were counted by a haemocytometer to adjust the count to approximately 10^6 spores/ml. The inoculum medium consisted of 120 g/l sugar in non-treated beet molasses, 2.5 g/l NH_4NO_3 , 0.16 g/l KH_2PO_4 , 0.25 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 ppm Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1.0 ppm Fe ($\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$), 1.0 ppm Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) and pH 6.0. The inoculum culture for fermentation media was grown in shake flasks for 24 h at 30°C and 220 rpm in a shaker (NUVE ST-402, Istanbul, Turkey).

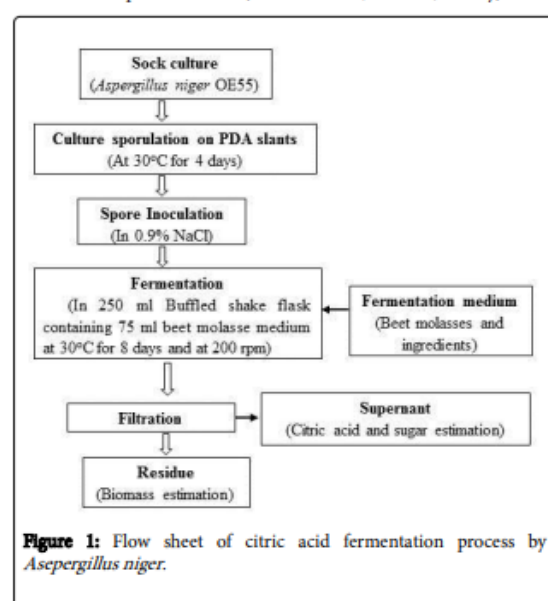


Figure 1: Flow sheet of citric acid fermentation process by *Aspergillus niger*.

The fermentation media were prepared from non-treated beet molasses together with different ingredients as indicated in Table and used in shake flask studies [5,10]. pH of the fermentation media is adjusted to 6.0. The fermentation with P2 media were also made at pH 4.0 and 2.5. Sixty-five mL fermentation medium was dispensed into 250 mL Erlenmeyer flasks and sterilized. Ten mL inoculum culture were used to inoculate the fermentation flasks which were then incubated at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ under shaking conditions at 220 rpm in the shaker for 8 days. About 10 ml of samples (cultures) were removed at

each sampling time (0, 2, 4, 6 and 8 days of fermentation) under aseptic conditions and used in analysis.

Analysis

Ten ml sample was filtered through a pre-weighed Whatman filter paper No. 44. The filtrate was used for further analysis (citric acid, sugar and pH). Filter paper was washed with distilled water and dried in an oven (Model: 1442 A, Memmert, Germany) at 105°C for overnight to calculate the biomass [5,10].

Determination of citric acid and sugar concentrations

The filtrate was used in the analyzes of pH, citric acid and sugar. pH was detected using a pH meter equipped with an electrode. Citric acid and sugar were determined by HPLC instrument equipped with a UV and refractive index detector (RID) respectively. Nucleosil column (EC 4.6 x 250 mm) and Shodex Sugar SH1011 column (8 x 300 mm, Bio-Rad, USA) were used for citric acid and sugar analysis, respectively, [5,9,10]. The eluent used for both citric acid and sugar analysis was 5 mM H_2SO_4 (aq.). HPLC analyses were carried out under the following operation conditions: pump flow, 1.0 ml/min; column temperature, 30°C for citric acid and 60°C for sugar; sample amount, 20 μl ; and integration method, peak area. Concentrations were calculated from standard curve. Sugar concentration was calculated as the sum of sucrose, glucose and fructose concentrations. The yield of product from substrate (YPS) calculated by formula: $\text{YPS} = (\text{g citric acid} / \text{g sugar consumed})$.

Sample analyses were run parallel in duplicate. Each treatment was repeated three times and the results were reported as average of three repetitions.

Statistical analysis

All the statistical analyses were performed using PC Statgraphics v.5 software (Graphics Software Systems, Rockville, MD, USA). The significance was set to $p < 0.05$ for the ANOVA matrix F value among treatments using one-way and multiple-range analysis of variance to compare means on the assays.

Results and Discussion

A. niger is very sensitive to trace metal ions in the beet molasses. Despite treatment with chelating agents (such as sodium or potassium ferro-cyanide), molasses give low yields of citric acid [1,2]. Therefore, beet molasses requires treatment before use in the production of citric acid. There is a requirement to find the mutant *A. niger* strain able to produce citric acid from non-treated beet molasses. In this study, a novel *A. niger* OE55 mutant strain has been tested to able to produce citric acid from non-treated beet molasses under different fermentation media (Table 1). Since, this type of strain necessary to reduce cost of citric acid production.

Three initial pH (6.0, 4.0 and 2.5) for P1 medium with 160 g/L sugar was used to indicate the effect of pH on the citric acid production by *A. niger*. Increasing the initial pH increased citric acid production. When the initial pH was decreased to 4.0 or 2.5 from 6.0, the production of citric acid decreased (data not given). The favorable initial pH is very essential for the successful production of citric acid. The results showed that low pH of non-treated beet-molasses was inhibitory on the production of citric acid by *A. niger*. At low initial pH, the metallic ions present in non-treated molasses may be more toxic on the morphology

of mold and production of citric acid. This finding is an agreement with the observations of Pessoa et al. [11,12] and Haq et al. [12].

Medium Type	Ingredients (g/L) [*]						
	Mg	N	P	Zn	Fe	Mn	Cu
P1	-	-	-	-	-	-	-
P2	0.5	1.0	1.0	10 ⁻⁶		-	10 ⁻⁶
P3	0.5	0.5	1.5	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
P4	0.5	1	1.0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
P5	0.5	1.5	2.0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	-
P6	0.2	1.5	2.0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	-	-
P7	0.2	1.0	1.0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	-
P8	0.5	1.5	1.0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	-	10 ⁻⁵

Table 1: Ingredients added into nontreated beet molasses media containing 200 and 160 g/L sugar. ^{*}Mg=MgSO₄·7H₂O, N=(NH₄)₂SO₄, P=KH₂PO₄, Zn=ZnSO₄·7H₂O, Fe=Fe₂SO₄·24H₂O, Mn=MnSO₄·7H₂O, Cu= CuSO₄·5H₂O.

A higher initial pH during fermentation process can also lead to the accumulation of other organic acids [12]. The initial pH of the medium is important in two stages of the fermentation process. Citric acid fermentation starts from spores and their germination requires pH>5.0. The absorption of ammonia by germinating spores causes release of protons, thus lowering the pH (near 2.5) and improving the production of citric acid [12-14]. But the pH of fermentation media was not reduced below 4.72 and 3.35 in the media containing 200 and 160 g/L sugar, respectively, during fermentation, therefore citric acid production was not increased over 19.96 and 34.58 g/L respectively. This would be due to the formation of nitrogenous and polysaccharide compounds from molasses. In this research, pH of fermentation media containing 160 g/L sugar were increased after 4 days. The nitrogenous compounds in molasses, formation of nitrogenous and polysaccharide

compounds, and hydrolysis of mold cells be caused pH increase. Inactivation of a citrate degrading enzyme (e.g. aconitase or isocitrate dehydrogenases) essential for the accumulation of citric acid [10]. Extending the fermentation beyond 4 days in the case of 160 g/L sugar use would also be resulted in oxidation of citric acid by *A. niger*. Since most of the fermentable sugar utilized by *A. niger* within 4 days of fermentation. It has been reported [15,16] that *A. niger* oxidized the accumulated citric acid upon exhaustion of the fermentable sugar. Lower amounts of citric acid were produced from 200 g/L sugar than 160 g/L sugar. Therefore, CA utilization cannot be occurred and the increase in pH was not observed.

The effect of two sugar concentrations (160 and 200 g/L) on the citric acid production by *A. niger* were carried out at initial pH 6.0 (Table 2). Reduction in citric acid formation was observed when the sugar concentration of molasses increased from 160 g/L sugar to 200 g/L. The maximum amount of citric acid (19.00 g/L) was obtained in the P4 medium containing 200 g/L sugar while citric acid productions were ranged from 21.82 to 34.69 g/L after 4 days of fermentation in the media containing 160 g/L sugar. The citric acid productions were slightly increased in fermentation media containing 200 g/L sugar. Remaining sugar (from 3.09 to 6.13 g/L) was higher after 8 days of fermentation in the molasses initially containing 160 g/L sugar than the molasses initially contains 200 g/L sugar. The biomass formation were ranged from 28.83 to 58.50 and 11.20 to 26.70 g/L with 200 and 160 g/L sugar, respectively, after 8 days of fermentation period. Low amount of citric acid production may be due to the over growth of the mycelium, which resulted in increased viscosity of the medium (Table 1) and higher amount of trace elements in beet molasses (200 g/L sugar) than dilute (160 g/L sugar). Since biomass formations were higher (P>0.05) in the media containing 200 g/L sugar than 160 g/L sugar. Similar results were also observed by Haq et al. [12], they indicated that there was reduction in the production of citric acid with the increase of mycelial formation in the medium. Yield of citric acid after 4 days of fermentation were ranged from 0.16 to 0.28. The higher yield (0.1 g/g) of product was obtained in the P4 medium after 8 days of fermentation with 200 g/L sugar while it was 0.28 g/g in the P2 media after 4 days of fermentation with 160 g/L sugar.

Medium type	Days	Citric acid fermentation by 200 g/L sugar					Citric acid fermentation by 160 g/L sugar				
		CA (g/L)	Yield (g/g)	Remainin sugar (g/L)	pH	Biomass (g/L)	CA (g/L)	Yield (g/g)	Remaining Sugar (g/L)	pH	Biomass (g/L)
P1	2	0.74	0.03	29.31	4.72	10.33	5.02	0.16	31.75	3.88	4.16
	4	1.93		12.96	4.98	18.60	20.20		26.87	4.11	9.48
	6	3.39		5.25	4.66	25.07	17.90		12.23	4.42	10.62
	8	4.95		1.78	4.64	28.83	8.49		3.74	4.94	12.10
P2	2	1.35	0.08	23.59	4.88	19.13	6.59	0.28	85.48	3.35	7.76
	4	3.31		11.60	4.78	30.38	34.69		34.20	3.86	9.90
	6	7.51		7.99	4.76	47.04	22.37		14.67	5.43	12.61
	8	15.36		2.03	4.76	53.75	15.20		5.76	5.81	17.42
P3	2	1.28	0.03	39.08	5.13	14.92	5.80	0.2	78.13	3.89	12.20
	4	2.07		13.06	4.51	29.72	24.20		31.75	4.33	16.92

	6	3.31		8.21	4,48	42.92	23,89		12,61	4,76	17.3
	8	6,72		2.08	4,46	49,20	21,27		3,20	4,94	21.69
P4	2	1.41	0.1	37.85	5,57	17,26	22,75	0.25	56,16	3,87	8,62
	4	1.94		17.71	5,55	28,57	31,58		23,21	3,96	10,12
	6	12,75		8.5	4,89	39,08	23,89		8,18	4,00	11,18
	8	19.56		2.04	4,75	46,76	6,85		4,88	4,20	26,44
P5	2	3.67	0.07	22.02	5,46	18,2	17,33	0.17	28,19	3,81	12,31
	4	7.74		11.77	5,30	32,43	21,82		19,55	3,93	15,18
	6	11		6.2	5,08	53,93	25,20		16,87	4,60	19,98
	8	13.47		1.12	5,02	68,35	20,54		3,09	5,04	20,4
P6	2	2.36	0.07	39.59	5,39	16,52	14,71	0.16	42,10	3,88	10,3
	4	5.46		18.5	5,08	39,27	23,20		26,66	4,11	12,70
	6	9.03		9.21	4,98	54,62	20		6,37	4,42	15,75
	8	13.59		2.05	4,83	58,50	4,49		5,64	4,94	22,45
P7	2	2.34	0.09	28.827	5,86	14,20	23,06	0.27	39,31	3,88	11,61
	4	5.2		12.7	5,47	31,78	33,89		25,65	4,11	19,38
	6	12.78		7.36	5,27	36,40	7,90		9,789	4,42	25,8
	8	17.3		1.25	5,17	49,83	4,75		4,52	4,94	26,7
P8	2	4,11	0.07	32.61	5,63	20,59	7,61	0.23	31,75	3,88	14,78
	4	9		17.32	5,40	33,63	27,89		26,87	4,11	20,37
	6	11.77		10.2	5,40	64,40	20,20		19,55	4,42	23,44
	8	13.13		2.09	5,32	52,47	19,85		6,13	4,94	25,16

Table 2: Citric acid (CA) production, yield, pH and biomass formation from untreated beet molasses.

In batch-wise fermentation of citric acid, the production starts after a lag phase of one day and reached maximum at the onset of stationary phase or late exponential phase [6]. In the case of 160 g/L, maximum citric acid formation reached after 4 days of fermentation. Since, most of sugar has been consumed within 4 days in the fermentation media. Our finding is not more economical as compared to previous research [7-9,13]. This would be due to the use of non-treated molasses in the preparation of fermentation media. Biomass formations in this research from 200 and 160 g/L sugar were higher than the results of these research in literature.

Nitrogen was provided in the beet molasses media as ammonium nitrate ((NH₄)₂SO₄). Citric acid production is directly influenced by the concentration of the nitrogen. Ammonium compound consumption leads to pH decrease, which is essential for the citric fermentation. It is necessary to maintain initially high pH values in the first day of fermentation prior to a certain quantity biomass production [10]. The results showed that initial concentration of nitrogen source required for citric acid fermentation is 1.0 g/L for the non-treated molasses (Tables 1 and 2). High nitrogen concentration (1.5 or 3.3 g/L) increased mold growth (P5, P6 and P7) and sugar consumption but decrease the citric acid produced.

Phosphorous was provided in the beet molasses media as di-potassium phosphate (KH₂PO₄). Tables 1 and 2 show that 1.0 g/L KH₂PO₄ in the fermentation medium was an optimum concentration as phosphorus source in the production of citric acid. A low and high phosphorus caused a drastic reduction of citric acid production. This was reflected in the lower yield of citric acid, which were severely reduced as the phosphate levels increased (P5, P6 and P7) or decreased (P3). Again, the high phosphorus level stimulated biomass formation.

Citric acid production and yields can be significantly (p>0.05) increased with using Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ and Cu²⁺ ions in ppm, above which the process is negatively affected (Tables 1 and 2). For instance, iron, one of the cofactors of aconitase, plays a crucial role, favoring biomass growth at concentrations higher than 2 ppm. Cu reverses the effect of Fe [13,17]. Biomass formation continuously increased during fermentation. The addition of nitrogen, magnesium and phosphate sources further increased the production of citric acid. The mutant strain of *A. niger* OE55 supported maximum production of citric acid (34.69 g/l) from nontreated beet molasses. The ions that should be in limiting concentrations are heavy metals. The results also showed that the necessity to use treated beet molasses medium to produce higher amount of citric acid by tested mutated *A. niger* OE55

strain. The optimum time of incubation for maximal citric acid production varies both with the sugar concentration in non-treated molasses.

Conclusion

The present results indicate that there should be an optimum carbon, nitrogen, phosphate and magnesium concentration in the fermentation medium and any excess amount reduced citric acid formation, while they change the direction of fermentation to biomass over production. The research showed that mutant strain is very sensitive to trace metal ions in the beet molasses. Despite treatment with chelating agents (such as sodium or potassium ferro-cyanide), molasses give low yields of citric acid. Therefore, this strain must be tested using treated beet molasses in the production of citric acid. There is a requirement to find the mutant *A. niger* strain able to produce citric acid from non-treated beet molasses.

Acknowledgement

This work was supported by the Gaziantep University Research Fund.

References

1. Show PL, Oladele KO, Slew QY, Zakry FAA, Lan JCW, et al. (2015) Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. Fron Life Sci 8: 271-283.
2. Lotfy WA, Ghanem KM, El-Helow ER (2007) Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. Bioresour Technol 98: 3470-3477.
3. Soccol CR, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Pandey A (2006) New perspectives for citric acid production and application. Food Technol Biotechnol 44: 141-149.
4. El-Kadi S (2014) Studies on the microbial production of citric acid from cane molasses. LAP LAMBERT Academic Publishing, Deutschland.
5. Erkmen O (2017) The isolation and mutagen improved *Aspergillus niger* for higher production of citric acid. Res J Biotechnol 12: 92-98.
6. Wang J (1998) Improvement of citric acid production by *Aspergillus niger* with addition of phytate to beet molasses. Biores Technol 65: 243-245.
7. Iqbal J, Haq IU, Javed MM, Hameed U, Khan AM, et al. (2015) Isolation of *Aspergillus niger* strains from soil and their screening and optimization for enhanced citric acid production using cane molasses as carbon source. J Appl Environ Biol Sci 5: 128-137.
8. Prasad MPD, Sridevi V, Surendra BNV, Reddy OVS, Harsha N (2013) Studies on fermentative production of citric acid by *Aspergillus niger* isolate using sorghum malt and its optimization. Int J Inn Res Sci Eng Technol 2: 2961-2968.
9. Dhillon GS, Brar SK, Verma M, Tyagi RD (2011) Recent advances in citric acid bio-production and recovery. Food Biopr Technol 4: 505-529.
10. Papagianni M (2007) Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. Biochemical aspects, membrane transport and modeling. Biotechnol Adv 25: 244-263.
11. Pessoa DE, Diasde C, Angela C (1982) Production of citric acid by *Aspergillus niger*. Microbiol Rev 13: 225-229.
12. Haq IU, Ali S, Qadeer MA, Iqbal J (2002) Citric acid fermentation by mutant strain of *Aspergillus niger* GCMC-7 using molasses based medium. Elec J Biotechnol 5: 125-132.
13. Anastasiadis S, Morgunov IG, Kamzolova SV, Finogenova TV (2008) Citric acid production patent review. Recent Pat Biotechnol 2: 107-123.
14. Vandenberghe LPS, Soccol CR, Pandey A, Lebeault JM (1999) Microbial production of citric acid. Braz Arch Biol Technol 42: 263-276.
15. Hang YD, Splittstoesser DE, Woodams EE (1975) Utilization of brewery spent grain liquor by *Aspergillus niger*. Appl Microbiol 30: 879-880.
16. Khosravi-Darani K, Zoghi A (2008) Comparison of pretreatment strategies of sugarcane baggase: Experimental design for citric acid production. Biores Technol 99: 6986-6993.
17. Yigitoglu M (1992) Production of citric acid by fungi. J Islamic Acad Sci 5: 100-106.



Citric Acid Production by *Aspergillus Niger* on a Corn Cob Solid Substrate using One-factor-at-a-time Optimisation Method

M.G. Addo¹, A. Kusi², L.A. Andoh³ and K. Obiri-Danso⁴

Dept. of Theoretical and Applied Biology, Kwame Nkrumah University of Science & Technology, Kumasi, Ghana^{1,2,3,4}

Abstract: The potential of corn cobs as solid substrates for the production of citric acid was investigated using *Aspergillus niger* KA88, a local isolate as the fermenting organism. One-factor-at-a-time (OFAT) model was used to optimize the fermentation media to achieve the maximum yield of citric acid. The fermentation parameters studied and their resultant optimised levels were found to be 28 °C incubation temperature, 15% (w/v) sucrose for 6 days fermentation period, 50% each of (0.5-1mm and 3-5mm) particle sizes. Di-ammonium hydrogen phosphate was the preferred nitrogen source at a concentration of 4g/l. The final OFAT fermentation media gave 138.24 g anhydrous citric acid/kg dry corn cob. In general, corn cob proved to be a highly promising solid substrate for commercial citric acid production.

Keywords: Substrate, *Aspergillus niger*, fermentation, Temperature, One-factor-at-a-time model.

I. INTRODUCTION

Citric acid is widely used to impart a pleasant, tart flavour to foods and beverages. It also finds applications as a function of additive detergents, pharmaceuticals, cosmetics and toiletries. It is therefore an important commodity in our everyday life with worldwide tonnage of 1.8 million in 2010 [1]. *Aspergillus niger*, a ubiquitous fungus, alone is credited with the production of over 1 million tonnes of citric acid annually. Among the microorganisms, the fungus *A. niger* has remained the organism best suited for commercial production, because, it produces more citric acid per unit time [2]. Although citric acid can be produced chemically from the juice of citrus fruits, fungal fermentation to produce citric acid has gained more prominence than chemical synthesis because the latter is a much more expensive endeavour [3]. Again, even though submerged fermentation is known to dominate worldwide citric acid production, recent works on solid state fermentation by [2-4] yielded considerable amount of citric acid. Over 60% of Ghanaians engage in agriculture in one way or the other, producing millions of tonnes of agro-wastes such as corn cobs.

These pose serious health and aesthetic environmental problems and efforts aimed at disposing these corn cobs have proven to be a mirage. Corn is an important cereal in Ghana and other parts of West and Central Africa. Citric acid production in Sub-Saharan Africa and for that matter Ghana has been on the quiet for one reason or the other despite increasing disposal problems and efforts at by-product utilisation. In Ghana, corn cobs are used as a fuel in direct combustion in cooking in maize growing areas, while in the United States, technology is well advanced in using cobs for cellulosic ethanol, co-firing and gasification projects [5-6]. Local industries have to spend the meagre profits earned to mop up the little foreign exchange in the system to import citric acid and other organic acids, which puts more pressure on an already struggling Ghanaian

currency. The average maize farmer earns GHC 296 per hectare as gross margin per season, with a meager GHC 0.88 as return on investment [7]. For not dumping or burning the corn cobs, but gathering and sending them to "Cobs Point of Sale" the farmer is able to earn extra income by transforming waste to wealth. In this regard, 'Cob Processing Units' could be established around major maize farming communities, where some microbial isolates from the naturally degrading cobs could be tested as starter cultures for the production of compounds of economic importance such as organic acids, sugars, bioethanol and nutritious animal feed supplements. This study therefore seeks to maximize citric acid production by *Aspergillus niger* using corn cob as the solid substrate by optimizing the fermentation media.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Pre-treatment of corn cobs

The corn cobs were collected from local farmers after threshing in Antoa, Kwabre East District, Ashanti-Ghana, and brought to the lab for various pretreatments to be carried on them.

B. Isolation of *Aspergillus niger* KA88

This particular *Aspergillus niger* strain was isolated from a rotten cassava by serial dilution in the Microbiology Research Laboratory of the Kwame Nkrumah University of Science and Technology. One millimeter of each diluent was plated on the solidified agar plates by streaking. The plates were incubated at 37 °C for 3-5 days to ensure maximum fungal growth. The fungal strains were purified by re-streaking on the medium and each pure culture were maintained on Potato Dextrose Agar (PDA) slants and stored at 4 °C in a refrigerator. The isolate was therefore named as *Aspergillus niger* KA88. Sub-culturing was done monthly on slopes of potato dextrose agar at 30 °C for 7 days.

C. Solid state production of citric acid

To 10 g of substrate in each Erlenmeyer flask (250 ml), 35 ml stock mineral salt solution with a concentration of (g/l): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5; KH_2PO_4 , 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25; NaCl, 0.25; and 15% (g/l) sucrose was added. The resultant corn cob in each flask gave the following salt concentration in terms of kg dry corn cob: 17.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 17.5 g KH_2PO_4 , 0.88 g NaCl, 0.88g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 525g of sucrose. 0.1 M NaOH/HCl was used to adjust the pH of the medium to 5. The flask was cotton plugged and wrapped by two layers of aluminium foil and then sterilised at 121°C for 15 minutes.

After sterilisation by double autoclaving, the flasks were cooled and inoculated with 2 ml homogenised inoculum culture of 1.0×10^7 spores/ml under aseptic conditions and incubated at 30 °C for 6 days. Each fermentation parameter was investigated and the outcome introduced into the succeeding parameter – in a one-factor-at-a-time manner – as a means of gradually optimizing the fermentation media. At the end of the fermentation, 9 parts of distilled water was added to 1 part of the fermented substrate in the flask and vortexed for 10 mins to extract the impregnated citric acid to the mycelia. The broth was filtered with mash followed by Whatman no. 1 filter paper and the supernatant was analysed for citric acid content, a modification of [8].

D. Analytical Technique

Citric acid was determined titrimetrically (AOAC) [9] by using 0.1 NaOH and phenolphthalein as indicator.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Effect of Incubation Temperature on Citric Acid Production

At 26 °C, low amount of citric acid was produced (Table I), which may be attributed to low enzyme activity of the fermenting organism. As temperature increases, rate of reaction also increased, until it reached its optimal threshold of 28°C.

At temperatures above 28 °C, deactivation effect of temperature on endogenous metabolism set in, leading to a reduction in the biosynthesis of citric acid. Selahzadeh and Roehr [10] asserted that, at lower temperatures, analysing the metabolic effects of the fermenting organism show a waste of large amounts of the carbon source, primarily due to an increase in the organism's respiratory activity. Roukas [11] also reports that, at higher temperatures, there is the inhibition of the enzyme citrate synthase; the terminal enzyme of the pathway responsible for the biosynthesis of citric acid. This rather aids in the accumulation of oxalic acid at such temperatures.

Furthermore, higher fermentation temperatures result in severe moisture losses, making the environment unfavourable for growth. Kareem and Rahman, [12] in their work on the production of citric acid using pineapple waste under solid state fermentation had the highest citric acid titre (43.5 g/kg) at 30 °C. The 28 °C optimum temperature falls within the range observed by Szewczyk and Myska [13] on the growth of *Aspergillus niger* to be between 26°C – 34°C.

TABLE I: Mean amount of citric acid produced at different temperature of incubation

Incubation Temp't (°C)	Citric Acid Produced (g/kg DCC)	Standard Deviation
26	32.64	1.985
28	46.72	2.161
30	34.00	2.014
32	16.00	1.880
34	12.80	1.564

(Substrate to moisture ratio: 80%, Incubation temperature: 30°C, pH: 5, Sugar source: 15% g/l sucrose, Fermentation period: 6 days, Particle size: 3-5mm, Initial inoculum size: 2ml of 1×10^7 spores/ml, Nitrogen source: 5g/l Ammonium sulphate)

B. Effect of Sugar Concentration at Different Fermentation Periods on Citric Acid Production

The low amount of citric acid produced (Table II) may be due to unavailability of readily metabolised carbon source in the control media. Sucrose and glucose are readily metabolised by *Aspergillus niger*, so it is added to the corn cob substrate for easy uptake, for the growth of the fungus. Karimi [14] reports that the fungi cultures after utilizing the readily metabolized sugar source are primed to hydrolyse the lignocellulosic components of corn cobs. The general rise in citric acid titres from day two and peaking on day six, and the ensuing fall on day seven may be due to the age of fungus, depletion of the readily metabolised carbon source or nitrogen. This exhaustion of fermentable sugars may activate a decay in the enzyme system. The organism then tends to feed on the citric acid, secreted into the fermentation media, or citric acid catalysis may have ensued due to the accumulation of waste products in the media. Largely, increasing the sugar concentration resulted in a considerable increase in the amounts of citric acid produced. Peksal and Kubicek [15], hold the view that, a high rate of acidogenesis in *A. niger* is observed only under conditions of high glycolytic metabolism and can be induced by the addition of an excess amount of sucrose or other carbohydrates. Tkacz and Lange, [16] report that, production of more citric acid by the sucrose induced culture to glucose may be attributed to the production of an extracellular mycelium bound invertase by *A. niger* that is active at low pH and rapidly hydrolyses sucrose but the presence of glucose represses the genes that encode invertase. Moreover, the two glucose transporters found in *A. niger* are strongly susceptible to citrate inhibition, thereby terminating citric acid accumulation at some point, even though much of the glucose substrate still exist in the medium. The 20% sucrose media showed a steady rise in citric acid titres and did not witness any drop on the day seven as evident in the other media. Roukas [11] reports that further increase of sugar concentration above 20% (w/v) results in a decrease in the rate of citric acid accumulation as a result of reduced water activity and plasmolysis. This reduced water activity and plasmolysis extend the lag phase of the fungus, reducing fungal numbers, and thereby the amount of citric acid secreted outside the hyphal walls. Ishaq et al.

[17] in their work reports that citric acid production starts after a lag phase of one day and peaks at the onset of stationary phase or even late. This observation is in line with the works of (Hossain *et al.*; Papagianni) [18-19] that sucrose is the best sugar source for citric acid production. They further backed their conclusions by showing the direct relationship that aconitase has on the sugar source during citric acid accumulation.

TABLE II: Effect of Sugar Concentration at Different Fermentation Periods on Citric Acid Production

Fermentation media	Mean Citric acid (g/kg DCC) at different fermentation periods (days)/SD					
	2	3	4	5	6	7
Corn cob only (control)	13.68/2.352	14.73/2.332	16.44/2.340	17.15/2.411	18.78/2.377	16.38/2.329
Corn cob + 5% glucose	18.84/2.300	19.78/2.423	20.24/2.398	21.96/2.435	22.03/2.443	21.34/2.322
Corn cob + 10% glucose	21.67/2.401	23.96/2.421	26.01/2.427	27.88/2.403	29.31/2.433	26.75/2.392
Corn cob + 15% glucose	24.50/2.413	26.44/2.419	30.98/2.456	32.17/2.438	33.00/2.429	31.33/2.410
Corn cob + 20% glucose	22.32/2.406	24.54/2.422	26.71/2.430	28.56/2.428	29.66/2.387	30.23/2.392
Corn cob + 5% sucrose	21.45/2.408	22.91/2.405	24.12/2.414	25.66/2.426	27.08/2.425	25.35/2.404
Corn cob + 10% sucrose	25.56/2.427	27.88/2.439	30.26/2.420	33.45/2.423	35.14/2.436	31.77/2.408
Corn cob + 15% sucrose	31.11/2.416	35.67/2.453	40.58/2.466	45.27/2.472	48.60/2.512	42.04/2.500
Corn cob 20% sucrose	28.50/2.422	32.82/2.430	35.63/2.444	39.25/2.461	41.94/2.468	42.68/2.490

(Substrate to moisture ratio: 80%, Incubation temperature: 28°C, pH: 5, Sugar source: 15% g/l sucrose, Fermentation period: 6 days, Particle size: 3-5mm, Initial inoculum size: 2ml of 1×10^7 spores/ml, Nitrogen source: 5g/l Ammonium sulphate): SD - Standard deviation

C. Effect of Particle Size/Distribution on Citric Acid Production

The smaller the particle size, the larger the surface area of the corn cob particles. This increases the availability of substrate to the *Aspergillus niger*, hence citric acid production is favoured, as a consequence of a more pronounced contact catalysis. The results of this study contradicts this assertion, in that, the finest corn cob particles used in this study produced the lowest amount of citric acid (Table III).

As the particle size was increased to some extent, the citric acid titres also increased. Kumar and Jain, [20] in their findings concluded that the high packing densities evident in smaller sized particles restrict airflow and inhibit fungal growth. Further increases in the particle size beyond the (3.0 – 5mm = c), led to a decrease in the amount of citric acid produced. This is contrary to earlier assertion that relatively larger particle sizes increase the rate of heat and mass transfer in the media, to counteract the highly exothermic respiratory metabolism of *A. niger*, hence, resulting in increases in citric acid titres.

The reason may be, for the 10 g corn cob supplied in each fermenter, the media containing the larger particle sizes were not much exposed to the fermenting organism as there was a considerable reduction in the surface area. Therefore, an effective balance of increasing substrate availability to the fermenting fungus and ensuring adequate heat and mass transfer within the media has to be the utmost priority.

In this instance, localised build-up of temperature and non-homogenous fermentation conditions are eradicated. This is evident in Table III, where the finest particle size which favours substrate availability was mixed with a relatively larger particle size in a 1:1 ratio and ended up as the media with the maximum citric acid produced. This compares favourably with the results from Gopinath [21] on the influence of particle size on citric acid production by *Aspergillus niger* using rice chaff and sesamum oil cake as substrates; and also Bari *et al.* [22] on the effect of particle size on the production of citric acid from oil palm empty fruit branches as new substrate by wild *Aspergillus niger*.

TABLE III: Amount of citric acid produced at different particle size and/or distribution

Particle size and/or distribution	Citric Acid Produced (g/kg DCC)	Standard Deviation
(0.5 – 1mm = a)	17.92	2.316
(1.0 – 3mm = b)	26.88	2.421
(3.0 – 5mm = c)	37.12	2.465
(5.0 – 7mm = d)	35.20	2.445
(7.0- 10mm= e)	29.44	2.399
a+b (1:1)	42.88	2.560
a+c (1:1)	51.84	2.608
a+d (1:1)	48.08	2.597
a+e (1:1)	41.60	2.553

(Substrate to moisture ratio: 80%, Incubation temperature: 28°C, pH: 5, Sugar source: 15% g/l sucrose,



Fermentation period: 6 days, Particle size: varied, Initial inoculum size: 2ml of 1×10^7 spores/ml, Nitrogen source: 5g/l Ammonium sulphate)

D. Effect of Different Nitrogen Sources on Citric Acid Production

For the nitrogen compounds analysed, Di-ammonium hydrogen phosphate ; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Di-ammonium hydrogen sulphate; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Urea ; $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ and Ammonium chloride; NH_4Cl reflected the amount of citric acid produced in decreasing order (Table IV). This same order also reflected the ability to excrete stoichiometric amounts of protons into the media, thereby reducing the pH. Brainard and Tsao [23] observed that, within 24 h after the inoculation of spores, ammonium ions are rapidly consumed with the excretion of stoichiometric amounts of protons.

As a result the vegetative growth of germinated spores slows down due to the decrease in pH and citric acid accumulation ensues. In contrast, the hydrolysis of urea liberates ammonia into the fermentation media, leading to a rapid alkalisation of the media. Hence, biomass accumulation is favoured, to the detriment of citric acid accumulation. With regards to this assertion, a consciously chosen concentration of the nitrogen source, should take cognizance of the initial inocula levels of *A. niger* needed to utilise the ammonia present for the early onset of citric acid accumulation. In fact, literature shows that ammonium sulphate is the preferred source of nitrogen in microbial citric acid production [4, 19-24]. In this study, the di-ammonium hydrogen sulphate gave the optimum citric acid yield of 138.24 g citric acid/kg dry corn cob, with the highest for ammonium sulphate being 115.20 g/kg DCC. Nitrogen is a constituent of many vital compounds including amino acids, basic proteins, enzymes, coenzymes and nucleic acids. An optimum nitrogen concentration must be used to maintain proper C:N ratio in the optimum range because citric acid synthesis will decrease at both lower and higher nitrogen levels [4].

TABLE IV: Effects of Different Nitrogen Sources and their Limitations on citric acid production

Nitrogen Source	Conc.(g/l)	Citric Acid Produced(g/kg)	SD
[$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$]	3	66.56	3.1
	4	44.16	2.6
	5	12.80	1.9
	6	10.24	1.8
[$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]	3	97.92	4.5
	4	115.20	5.2
	5	51.12	2.9
[NH_4Cl]	3	19.84	2.0
	4	38.40	3.2
	5	30.08	3.3
[$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$]	3	21.76	2.1
	4	19.84	2.2
	5	120.96	5.6
	3	120.96	5.6
	4	138.24	5.9
	5	112.00	5.1
	3	51.20	2.8
	4	51.20	2.8

(Substrate to moisture ratio: 80%, Incubation temperature: 28°C, pH: 5, Sugar source: 15% g/l sucrose, Fermentation period: 6 days, Particle size: 5 g each of (0.5 – 1mm and 3-5mm), Initial inoculum size: 2ml of 1×10^7 spores/ml)

IV. CONCLUSION

In conclusion, the results obtained in the study proved the effectiveness of the OFAT studies in maximizing citric acid production. The first parameter trial conducted on the effect of incubation temperature produced 46.72 g citric acid per kg dry corn cob. After three other parameters were investigated, with the outcome of each trial been incorporated into the succeeding one, 138.24 g citric acid per kg dry corn cob was produced.

As a result, 91.52 g citric acid per kg dry corn cob was the amount of citric acid realized from the OFAT studies, thus the difference between the first and last trial. The study thus presents corn cob as a potential solid substrate for the commercial production of citric acid in Ghana.

ACKNOWLEDGEMENT

We are very thankful to the Technicians at the Microbiology Laboratory at the Department of Theoretical and Applied Biology, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana for facilitating the Lab. Work.

REFERENCES

- [1] IHS Chemical (2012) *Citric acid*. [Online] IHS Chemical. Available from <http://www.ihs.com/products/chemical/planning/ceh/citric-acid.aspx>. [Accessed 30/09/2013].
- [2] G. Narasimha, A. P. Kumar, A. Seilakshmi and K. H. Goud (2012). Citric acid production by *Aspergillus niger* through solid state fermentation using fruit wastes. *Biotechnology An Indian Journal*, 6(3), 93-96.
- [3] Q. Iqbal (2008) *Quantification of Fungal biomass growth during Citric Acid production by Aspergillus niger on extended clay solid substrate*. (Published Master's thesis, Department of Bioresource Engineering, McGill University, Montréal).
- [4] S. Javed, M. Asghar, M. A. Sheikh, H. Nawaz and A. Jamil, (2011) Enhanced citric acid production by *Aspergillus niger* EB-3 mutant using an inert solid support in molasses medium. *African Journal of Biotechnology* 10(55), 11784-11791.
- [5] B. G. Del Campo (2010). Corn cob dry matter loss in storage as affected by temperature and moisture content. Graduate Thesis and Dissertations. Paper 11796, Iowa State University.
- [6] Extension (2014) Corn cobs for biofuel production [Online] Extension. Available at <http://www.extension.org/pages/26619/corn-cobs-for-biofuel-production#.VZvDR0YmyU4> [Assessed 07/01/2015]
- [7] C. Ragasa, A. Chapoto and S. Kolavalli, (2014) Maize productivity in Ghana. *Int. Food Policy Res. Inst.*, 1-4.
- [8] H. Feleke, (2010) *Small-scale citric acid production on solid-state fermentation using Aspergillus niger*. Published thesis (MSc.) Faculty of Science, Addis Ababa University.
- [9] AOAC (1995). Official Methods of Analysis. 16th edn. Association of Official Analytical Chemist, Washington D.C.
- [10] R. M. Selahzadeh and M. Roehr (2003) Citric acid fermentation and the effects of temperature. *Acta Biotechnol.*, 23(1), 95-100.
- [11] T. Roukas (2014) *Biotechnology of citric acid production*. In Pometto, A., Shetty, K. Paliyath, G. and Levin, R. E (Eds), *Food biotechnology*, (2nd ed., pp. 350-395). USA: CRC Press.
- [12] S. O. Kareem and R. A. Rahman (2011) Utilisation of banana peels for citric acid production by *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. J. N. Am.*, 4(4), 384-387.

нейтрализатор, осветление раствора.

Независимо от способов и вариантов выделения лимонной кислоты, очистки ее растворов и других процессов можно записать следующую общую принципиальную технологическую схему.

Лимонную кислоту из культуральной жидкости выделяют в виде плохо растворимой соли — цитрата кальция. С целью повышения чистоты цитрата, в большой мере определяющей эффективность проведения последующих технологических процессов, перед его осаждением необходимо из культуральной жидкости удалить взвешенные примеси центробежным сепарированием. С той же целью выделяют щавелевую кислоту в виде оксалата кальция, полностью выпадающего в осадок при $\text{pH} \sim 3$ и отделяемого фильтрованием. Однако из-за стремления упростить технологию предварительную очистку культуральной жидкости от суспендированных частиц и щавелевой кислоты проводят не всегда [1].

К нагретой культуральной жидкости добавляют водную суспензию гидроксида кальция (известковое молоко) до $\text{pH} > 6,0$, при этом в результате реакции нейтрализации образуется осадок цитрата кальция [2]. Если щавелевая кислота предварительно не выделялась, то осаждается и она. Кальциевые соли глюконовой кислоты в виду их хорошей растворимости не осаждаются. Химическое осаждение лимонной кислоты проводят в реакторе, называемом нейтрализатором.

Осадок цитрата отфильтровывают на фильтрах, работающих под вакуумом, и от него горячей водой отмывают остатки культуральной жидкости. Фильтрат упаривают и в виде концентрированного раствора реализуют в различных отраслях народного хозяйства. Часть промывок используют для разбавления мелассы при приготовлении питательной среды.

Цитрат кальция разлагают затем в отдельном реакторе («расщепителе») концентрированной серной кислотой, в результате чего освобождается лимонная кислота и выпадает осадок плохо растворимого гипса. При разложении цитрата оксалат не вступает в реакцию с серной кислотой и удаляется из реакционной смеси вместе с гипсом в процессе фильтрования. В реакторе цитрат суспендируют в небольшом количестве воды с таким расчетом, чтобы после разложения концентрация лимонной кислоты в растворе была не ниже 25 % [2]. Приливание серной кислоты в цитратную суспензию сильно разогревает реакционную смесь. При последующем выдерживании с целью созревания кристаллов гипса заданную температуру поддерживают подачей пара.

По окончании разложения цитрата осаждают тяжелые металлы посредством ГЦФК, а мышьяк — сульфидом бария; их вместе с гипсом удаляют фильтрованием [1].

Проведение осаждения лимонной кислоты из культуральной жидкости в виде цитрата и разложения его серной кислотой при высокой температуре объясняется снижением растворимости цитрата и гипса. В первом случае уменьшаются потери цитрата с фильтратом и промывной водой, во втором — количество гипса, выпадающего из раствора лимонной кислоты при его выпаривании и частично отлагающегося на поверхности нагрева вакуум - аппаратов.

Описанный способ выделения лимонной кислоты, основанный на проведении ее через малорастворимую соль, называется классическим (в данном случае еще и цитратным), характерным для химии прошлого века. Именно так Шееле выделял лимонную, винную, молочную и другие кислоты из соответствующих субстратов.

Следующий по схеме технологический процесс — осветление раствора лимонной кислоты активным углем. Более рационально осветление проводить в отсутствие большого количества суспендированного гипса и других примесей. В этом случае после отфильтровывания осадка гипса раствор лимонной кислоты подвергают частичному выпариванию в вакуум-аппаратах и только затем обрабатывают активным углем. Выпадающее при упаривании небольшое количество гипса удаляют вместе с отработавшим активным углем.

Однако нередко осветление раствора лимонной кислоты совмещают с разложением цитрата. Реакционную массу фильтруют, осадок, состоящий из гипса, оксалата кальция, сульфидов тяжелых металлов и мышьяка, берлинской лазури и активного угля, идет в отвал [1].

Очищенный раствор лимонной кислоты вторично выпаривают под вакуумом и по достижении заданной концентрации (близкой к насыщению) сливают в кристаллизаторы, в которых постепенно снижают температуру. Выделившиеся кристаллы отделяют от маточного раствора на центрифугах, промывают небольшим количеством холодной воды, сушат и упаковывают.

Первый маточный раствор (с промывной водой) непосредственно или после осветления активным углем выпаривают, кристаллизуют, кристаллы отделяют, промывают и сушат. Второй маточный раствор осветляют активным углем и дальше перерабатывают так же, как и первый. Из этих кристаллов и кристаллов, полученных из основного раствора, составляют товарные партии лимонной кислоты. Третий маточный раствор в зависимости от его чистоты возвращают в нейтрализатор или разбавляют водой: до 15 %-ной концентрации (по лимонной кислоте), осветляют активным углем и получают цитрат, который присоединяют к основной массе цитрата в реакторе для разложения его серной кислотой.

Литература

1. *Смирнов В. А.* Пищевые кислоты. Москва.: Легкая и пищевая промышленность. -