

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 еритритолу за використання *Pseudozyma tsukubaensis*

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 1

Лозіна Владислава Євгеніївна  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Красінько Вікторія Олегівна  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Ломберг М.Л.  
(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 «Біотехнологія та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і  
мікробіології

Пирог Т.П.

“ 01 ” квітня 2021 року

## ЗАВДАННЯ

### НА ДИПЛОМНИЙ ПРОЕКТ (РОБОТУ) СТУДЕНТУ

Лозиній Владиславі Євгеніївні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Одержання еритритолу за використання *Pseudozyma tsukubaensis*»

керівник роботи Красінько Вікторія Олегівна, к.т.н., доц.,  
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 27.05.2021

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Pseudozyma tsukubaensis*, цільовий продукт: еритритол.

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

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема виробництва еритритолу – 1 аркуш формату А0. Апаратурна схема виробництва еритритолу – 2 аркуша формату А0. Схема автоматизації ділянки кристалізації та виділення кристалів еритритолу – 1 аркуш формату А4

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2021 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання Етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика еритритолу.</i>	01.04.2021-03.04.2021	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	04.04.2021-14.04.2021	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування.</i>	09.04.2021-24.04.2021	
4.	<i>Біосинтез еритритолу.</i>	14.04.2021-24.04.2021	
5.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва еритритолу.</i>	24.04.2021-05.05.2021	
6.	<i>Специфікація обладнання</i>	24.04.2021-05.05.2021	
7.	<i>Опис технологічної схеми виробництва еритритолу.</i>	03.05.2021-10.05.2021	
8.	<i>Контроль виробництва еритритолу.</i>	05.05.2021-15.05.2121	
9.	<i>Автоматизація ділянки виробництва еритритолу</i>	15.05.2021-25.05.2021	
10.	<i>Охорона довкілля</i>	15.05.2021-25.05.2021	
11.	<i>Оформлення пояснювальної записки</i>	23.05.2021-28.05.2021	
12.	<i>Виконання графічної частини проекту</i>	05.05.2021-28.05.2021	

**Здобувач**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Лозіна В.Є.**

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали)

**Керівник роботи**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Красінько В.О.**

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали)

## РЕФЕРАТ

Представлено проект виробництва еритритолу у вигляді сухих кристалів культивуванням штаму дріжджів *Pseudozyma tsukubaensis* KN 75, який синтезує на середовищі з глюкозою 245 г/л цільового продукту. Еритритол (еритрит) – чотиривуглецевий цукровий спирт, що використовується як цукрозамінник або смакова добавка у виробництві продукції здорового та дієтичного харчування, продукції для діабетиків, а також в фармацевтичній промисловості і косметології. Розрахована потужність його виробництва становить 306 м<sup>3</sup> культуральної рідини або 50 362 кг кристалів на рік.

Технологічний процес складається з допоміжних (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживних середовищ, розчину глюкози для підживлення, розчину мікроелементів, підготовки смол та активованого вугілля для колонок, підготовки повітря для сушарки) та основних робіт (вирощування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторі, посівних апаратах, виробничого біосинтезу, зберігання культуральної рідини, відділення біомаси, очищення супернатанту, концентрування та кристалізації, виділення кристалів еритритолу, сушіння кристалів еритритолу, пакування, маркування та відвантаження, знешкодження відходів).

Дипломний проект викладений на 121 стор. друкованого тексту, містить 21 таблицю, 9 рисунків і складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (63 джерела) та графічної частини (3 креслення формату А0 та 1 креслення формату А4).

**Ключові слова:** еритритол, цукрозамінник, діабет, *Pseudozyma tsukubaensis* KN 75, підготовка аераційного повітря, кристали, активоване вугілля, кристалізація, посівний матеріал, дріжджі.

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	2
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. Характеристика еритритолу.....	8
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	12
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	17
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	19
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	20
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	22
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	22
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	22
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів...	23
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	24
РОЗДІЛ 4. Біосинтез еритритолу.....	29
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента...	29
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	31
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва еритритолу.....	35
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	35
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера...	35
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	36
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	38
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	43

5.1.5. Особливості підготовки та стерилізації розчину глюкози для підживлення.....	46
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	48
5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення еритритолу.....	54
5.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	56
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	60
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми виробництва еритритолу.....	67
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва еритритолу.....	81
8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів.....	81
8.2. Мікробіологічний контроль.....	85
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	86
8.3.1. Концентрація біомаси.....	86
8.3.2. Концентрація цільового продукту.....	87
8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	88
8.4. Показники якості готового продукту.....	89
РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва еритритолу.....	94
9.1. Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формуванням завдання на розробку системи автоматизації.....	94
9.2. Опис схеми автоматизації з специфікацією засобів автоматизації.....	96
9.3. Специфікація обладнання.....	97
РОЗДІЛ 10 Охорона довкілля.....	99
10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	99
10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	102

10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....	102
10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	105
10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів.....	108
10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів.....	112
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	114
ДОДАТКИ.....	122

## ВСТУП

Цукровий діабет – захворювання, на яке, за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, страждає майже 350 млн людей (3 % населення Землі). Передбачається, що до 2030 р. ця кількість перевищить 552 млн осіб.

На ріст захворюваності впливають такі чинники, як: вік; генетична схильність; ожиріння; малорухомий спосіб життя; хронічні стреси та ін. Оскільки протягом останніх десяти років значно скоротились енерговитрати більшості людей (у 1,5–2 рази), то й відбулося зрушення рівноваги в системі енергетична цінність раціону/енерговитрати. Через це у багатьох країнах світу серйозно постала проблема ожиріння та надмірної маси тіла: на них страждає від 30 до 50 % населення [1].

Важливе значення у профілактиці та лікуванні цукрового діабету має харчування. Дієтичне харчування повинно сприяти нормалізації обміну речовин, лікувати й попереджувати загострення хвороби.

Аналіз тенденцій розвитку світового ринку продуктів свідчить про щорічне розширення асортименту продуктів оздоровчого харчування – на 40–50 %. Однак цього не можна сказати про Україну, наразі в торговельній мережі спостерігається малий вибір продуктів спеціального призначення.

Розробка продуктів харчування із природними підсолоджувачами та цукрознижуючими добавками є актуальним і перспективним напрямом технології виробництва продукції. Більш ніж 70 % хворих на цукровий діабет та людей з проблемою ожиріння використовують цукрозамінники і підсолоджувачі в чистому вигляді, або споживають їх у складі спецпродукції.

Україна належить до небагатьох країн, де культивується природний цукрозамінник – стевія, яка є надійною альтернативою цукру [1]. Але серед усіх переваг, наявні і суттєві недоліки, на які найчастіше скаржиться споживач: смак і запах трави та обмеження щодо кількості споживання на

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Лозіна В.Є.			Вступ	Літера	Аркуш	Аркушів
Перевір.		Красінко В.О.					6	121
Консультант								8
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

добу. Чудовою альтернативою є природний цукрозамінник – еритритол, який має солодкий смак і відсутність запаху, та за рішенням ЖЕСФА (Об'єднаний Комітет Експертів по Харчовим Додаткам) його можна споживати «без обмежень».

Еритритол (еритрит) – чотириуглецевий цукровий спирт, що використовується як цукрозамінник або смакова добавка у виробництві продукції здорового та дієтичного харчування, а також продукції для діабетиків. Нерідко еритрит використовують у фармацевтичній промисловості для виробництва сиропів, жувальних таблеток та інших препаратів для маскування неприємного або гіркокого смаку медичних препаратів; і в косметології для виробництва зубної пасти, ополіскувачів ротової порожнини та кремів. Судячи з вище зазначеного еритритол повинен мати високий ступінь очистки, тому післяферментаційні стадії виділення та очищення мають надзвичайно важливе і вирішальне значення для отримання високоякісного продукту.

**Метою** даної роботи є проектування ділянки виробництва еритритолу дріжджами *Pseudozyma tsukubaensis* KN 75 з його подальшим виділенням, очищенням та пакуванням в дой-пак крафт пакети.

**Актуальність теми.** Промислове виробництво еритриту і використання його в якості безпечного харчового інгредієнта - це новий безпрограшний тренд в харчовій індустрії. В поєднанні з повною безпекою і численними позитивами еритритол може розглядатися в якості одного з найбільш перспективних видів цукрозамінників в даний час, і цілком може становити серйозну конкуренцію звичайному бурякового / очеретяному цукру.

**Новизна.** Біологічний агент *P. tsukubaensis* KN 75 характеризуються високою продуктивністю (2,86 г/л/год) та здатністю синтезувати еритритол у високих концентраціях (245 г/л) [2]. Методи виділення і очищення еритритолу та їх апаратурне оформлення на основі пошуку і ґрунтовного аналізу патентної та наукової літератури дає змогу отримати максимально очищений та якісний продукт.

## РОЗДІЛ 1

### ХАРАКТЕРИСТИКА ЕРИТРИТОЛУ

Еритритол (еритрит) - це чотиривуглецевий цукровий спирт, також відомий як поліол, який утворюються в результаті процесів гідролізу альдегідної або кетонної групи в різних вуглеводах. Він зустрічається як метаболіт або запасна речовина в морських водоростях та грибах, а також є складовою ряду звичайних фруктів (дині, винограду та груші), ферментованих продуктах (соевий соус, квасоля місо), напоях (саке, вино та пиво) [3].

Еритрит - симетрична молекула (рис. 1.1), що існує лише в одній формі – мезо-формі.

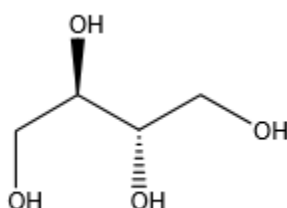


Рис.1.1. Хімічна структура еритритолу

Утворює безводні кристали з помірною солодкістю 60-80% сахарози, має дуже низьку гігроскопічність і температуру плавлення 122°C. Не має відновлювальних кінцевих груп, завдяки чому має чудову стабільність до впливу температур (стійкий до 180°C і не проявляє реакції буріння Майяра (конденсація між амінокислотами і цукрами, яка відбувається при нагріванні)) та рН. Порівняно з групою поліолів, які зараз використовуються як замітники цукру (сорбіт, ксиліт, маніт, лактит і мальтит [4]), еритритол має найнижчу молекулярну масу 122,12 г/моль, що надає йому різні властивості, такі як більш високий осмотичний тиск і нижча активність води в розчині. Технічні характеристики еритритолу наведені в таблиці (табл. 1.1) [5].

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Лозіна В.Є.				РОЗДІЛ 1. Характеристика еритритолу	Літера	Аркуш	Аркушів
Перевір.	Красінько В.О.						8	121
Консультант								10
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.	Пирог Т.П.							

## Технічні характеристики еритритолу

Систематична назва	1,2,3,4-бутантетрол
С.А.С. номер	149-32-6
Молекулярна маса	122,12 г/моль
Хімічна формула	$C_4H_{10}O_4$
Діапазон плавлення	119-123 °С
Щільність	1,45 г/см <sup>3</sup>
Розчинність	Вільно розчинний у воді, слабо розчинний у етанолі, нерозчинний у діетиловому ефірі

Властивості еритриту:

- має найнижчу калорійність 0-0,2 кал/г порівняно з іншими поліолами (2 кал/г) [4, 5];
- більша частина еритриту не метаболізується організмом і виводиться без зміни рівня глюкози та інсуліну в крові. Завдяки цій властивості еритритол може використовуватися в спеціалізованих продуктах харчування для діабетиків та людей зі збитковою вагою [4, 5];
- діє як антиоксидант *in vivo* і може сприяти захисту від ураження судин, спричиненого гіперглікемією [5];
- стійкий до метаболізму пероральними бактеріями і сприятливий для зубів [4, 5];
- має чистий солодкий смак, не має післясмаку - це покращує відчуття у роті та маскує неприємні смаки [4, 5];
- проявляє цікаві якісні та кількісні синергії з інтенсивними підсолоджувачами (наприклад, цукралозою, аспартамом, ацесульфамом-К) або стевією. [5].

**Практичне застосування.** Еритритол використовується в харчовій промисловості [4, 5], косметології та фармацевтиці [4]. У харчовій галузі еритрит в основному використовується як підсолоджувач, щоб збалансувати готовий продукт по відношенню до його сенсорних характеристик, таких як аромат, колір та текстура. Еритритол як цукрозамінник можна знайти в напоях, жувальній гумці, шоколаді, цукерках та хлібобулочних виробках [4].

Поліоли зазвичай використовуються в галузі особистої гігієни як, наприклад, косметологічній чи туалетній продукції. Завдяки своїй зволожуючій функції, а також приємному смаку, солодкості і некаріогенній властивості, еритритол можна використовувати в якості основи для зубної пасти (надає зубним пастам необхідну в'язкість і вологість) та засобів для полоскання рота. Крім того, еритрит у поєднанні з ксилітом пригнічує утворення карієсу. Його включають як допоміжну речовину при виробництві таких засобів, як креми, лосьйони, засоби для макіяжу, парфуми та дезодоранти [4].

У фармацевтичній галузі еритритол можна використовувати в широкому діапазоні твердих і рідких препаратів, включаючи гранульовані порошки, таблетки, покриття для таблеток, пастилки, лікарські жувальні гумки, сиропи. Через свої властивості, еритрит як допоміжний засіб має хорошу текучість і стабільність, що робить його ідеальним носієм для активів у пакетиках та капсулах. Все більше активних інгредієнтів отримують за допомогою біотехнологічних процесів, які часто дуже ефективні, але також надзвичайно реакційноздатні. Використання еритриту, що є нередукуючим цукром, замість лактози, яка є найбільш часто використовуваним фармацевтичним ексципієнтом, запобігає реакції між аміногрупами активного та редукуючого цукру. Тому лактоза частіше замінюється еритритолом [4].

**Джерела одержання та виробники.** Для широкомасштабного виробництва еритриту введені хімічні та ферментативні процеси. Хімічно може бути отриманий з диальдегідного крохмалю при високих температурах у присутності каталізатора нікелю, але цей процес не був індустріалізований

через його низьку ефективність. Натомість еритритол виробляється ферментативними процесами з використанням молочнокислих бактерій, осмофільних дріжджів або грибів *Aureobasidium*, *Candida*, *Moniliella*, *Pseudozyma*, *Torula*, *Yarrowia* [2, 6].

Промислово еритритол випускається лише кількома компаніями по всьому світу, серед яких: Baolingbao Biotechnology (Дечжоу Ши, Китай), Bolak Corporation (Сеул, Південна Корея), Cargill Food & Pharma Specialities (Міннеаполіс, США), Jungbunzlauer (Базель, Швейцарія), Mitsubishi Chemical Corporation (Токіо, Японія) та O'Laughlin Corporation (Тяньцзінь, Китай) [7]. На полицях магазинів здорового харчування можна побачити еритрит від таких компаній: Herboveda «So Sweet» (Індія) [8], NKD Living «100% natural Erythritol» (Великобританія) [9], NOW Real Food «Erythritol» (США) [10].

## РОЗДІЛ 2

### ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Еритритол отримують мікробними методами з використанням переважно осмофільних дріжджів, здатних переносити високий осмотичний тиск, таких як *Pichia*, *Candida*, *Torulopsis*, *Trigonopsis*, *Moniliella*, *Aureobasidium*, *Trichosporon* spp., *Torula*, *Trichosporonoidea*, *Pseudozyma*, *Yarrowia*, [5, 11] *Zygosaccharomyces*, *Zygoichia*, *Moniliella tomentosa*, *Debaryomyces*, *Hansenula* та *Ustilaginomycetes* [3]. Також еритритол виробляють молочнокислі бактерії, а саме *Leuconostoc oenos*, що утворює еритрит з глюкози [3].

Комерційно еритритол отримують з глюкози, одержаної в результаті хімічного або ферментативного гідролізу пшеничного та кукурудзяного крохмалю, з використанням мутантних штамів *Aureobasidium* sp. та *Pseudozyma tsukubaensis*. Завдяки високій урожайності та продуктивності в промислових масштабах виробництва, еритрит служить недорогим вихідним матеріалом для виробництва інших цукрів [3, 12].

Ферментативний процес отримання еритритолу залежить від багатьох факторів: концентрації глюкози, рН, концентрації розчиненого кисню, температури, осмотичного тиску середовища, джерел азоту та вуглецю [2, 5, 6, 11].

Узагальнені дані щодо синтезу еритритолу з використанням різних продуцентів наведено у таблиці (табл. 2.1).

Найвищий показник синтезу цільового продукту (еритриту) – 245 г/л досягається при культивуванні дріжджів *Pseudozyma tsukubaensis* KN75.

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента					
Розроб.	Лозіна В.Є.							Літера	Аркуш	Аркушів
Перевір.	Красінко В.О.								12	121
Консультант										14
Н. Контр.								Кафедра БТМ		
Затверд.	Пирог Т.П.									

Високі показники синтезу спостерігаються також у *Moniliella* sp. N61188-12 та *Torula* sp. – 189,4 г/л та 182 г/л відповідно. Найнижча концентрація еритритолу спостерігається у *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 (58,2 г/л), так само як і вихід продукту (38 %) [2, 11-13].

Найдовше культивування спостерігається у *Moniliella* sp. N61188-12 – 249 год. Тривалість культивування *Torula* sp. становить 135 год, з використанням *P. tsukubaensis* KN75 – 85 год, а *Y. lipolytica* Wratislavia K1 – 74,5 год [2, 11-13].

Проте така порівняльна характеристика технологічно процесу (див. табл. 2.1) є недостатньою. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента порівнювали вартість поживних середовищ, використовуваних усіма продуцентами (табл. 2.2). Дані, наведені у табл. 2.2, засвідчують, що середовище для культивування *Y. lipolytica* Wratislavia K1 є найдешевшим серед усіх запропонованих. Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент розраховали умовну вартість 1 г цільового продукту – еритритолу (табл. 2.3).

Узагальнивши всі дані, можна зробити висновок, що доцільніше використовувати для одержання еритритолу осмофільні дріжджі *P. tsukubaensis* KN75. Незважаючи на трохи більший період культивування (85 год) та трохи дорожче поживне середовище (вартість 1 л середовища – 9,83 грн) порівняно з культурою *Y. lipolytica* Wratislavia K1, концентрація цільового продукту, синтезованого *P. tsukubaensis* KN75, значно вища (245 г/л), а умовна вартість 1 г цільового продукту нижча (0,04 грн/г).

Продуктивність біосинтезу еритритолу у дріжджів *P. tsukubaensis* KN75 є в чотири рази вищою порівняно з *Y. lipolytica* Wratislavia K1 (2,86 і 0,78 г/л/год відповідно), оскільки за 74,5 год культивування останні накопичують 58,2 г еритриту, тоді як осмофільні дріжджі *P. tsukubaensis* KN75 за 85 год – 245 г еритритолу.

Таблиця 2.1

## Порівняльна характеристика продуцентів еритритолу

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Показники синтезу (концентрація еритритолу; вихід продукту; продуктивність)	Тривалість процесу, год	Особливості процесу	Література
<i>Torula</i> sp.	Глюкоза – 400, дріжджовий екстракт – 20, фітинова кислота – 0,00066 (0,5 μM)	182 г/л; 45,5 %; 1,35 г/л/год	135	Періодичне культивування у 5-ти літровому ферментері	Lee J.-K., Ha S.-J., Kim S.-Y., Oh D.-K. Increased erythritol production in <i>Torula</i> sp. with inositol and phytic acid. <i>Biotechnology Letters</i> . 2001, 23: 497-500. doi: 10.1023/A:1010386500326.
<i>Moniliella</i> sp. N61188-12	Глюкоза – 350, дріжджовий екстракт – 10	189,4 г/л; 48 %; 0,8 г/л/год	249	Періодичне культивування з дробним підживленням після 137 год	Lin S.-J., Wen C.-Y., Wang P.-M., Huang J.-C., Wei C.-L., Chang J.-W., Chu W.-S. High-level production of erythritol by mutants of osmophilic <i>Moniliella</i> sp. <i>Process Biochemistry</i> . 2010, 45: 973-979. doi: 10.1016/j.procbio.2010.03.003.

Закінчення табл. 2.1

<i>Y. lipolytica</i> Wratislavia K1	Гліцерин –150, NH <sub>4</sub> Cl – 3, MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O – 1, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,2, дріжджовий екстракт – 1	58,2 г/л; 38 %; 0,78 г/л/год	74.5	Періодичне культивування до повного споживання гліцерину у ферментері <sup>3</sup> лопатевою мішалкою	Rywinska A., Tomaszewska L., Rymowicz W. Erythritol biosynthesis by <i>Yarrowia lipolytica</i> yeast under various culture conditions. <i>African Journal of Microbiology Research</i> . 2013, 7 (27): 3511-3516. doi: 10.5897/12.2272.
<i>P. tsukubaensis</i> KN 75	Глюкоза –300, кукурудзяне борошно– 15, MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O – 0,01, CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O – 2	245 г/л; 61 %; 2,86 г/л/год	85	Періодичне культивування <sup>3</sup> дрібним підживленням шляхом постійного додавання 68,31 л розчину глюкози. Підживлення глюкози проводили, 6 разів, кожні 12 год ферментації для підтримки концентрації глюкози 225 г/л.	Jeya M., Lee K.-M., Tiwari M. K., Kim J.-S., Gunasekaran P., Kim S.-Y., et al. Isolation of a novel high erythritol-producing <i>Pseudozyma tsukubaensis</i> and scale-up of erythritol fermentation to industrial level. <i>Microbiol Biotechnol</i> . 2009, 83: 225-231. doi: 10.1007/s00253-009-1871-5.

**Вартість компонентів поживного середовища для продуцентів еритритолу**

Біологічний агент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Література (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)*
<i>Torula</i> sp.	Глюкоза - 400	31,20	12,48	1
	Дріжджовий екстракт - 20	1100,00	22,00	2
	Фітинова кислота – 0,00066	4100,00	0,0027	3
	Вартість 1 л середовища – 34,48 грн			
<i>Moniliella</i> sp. N61188-12	Глюкоза - 350	31,20	10,92	1
	Дріжджовий екстракт - 10	1100,00	11,00	2
	Вартість 1 л середовища – 21,92 грн			
<i>Y. lipolytica</i> Wratislavia K1	Гліцерин - 150	39,00	5,85	4
	NH <sub>4</sub> Cl - 3	21,00	0,63	2
	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O - 1	15,00	0,015	5
	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> – 0,2	1575,00	0,31	6
	Дріжджовий екстракт-1	1100,00	1,1	2
	Вартість 1 л середовища – 7,9 грн			
<i>P. tsukubaensis</i> KN 75	Глюкоза –300	31,20	9,36	1
	Кукурудзяне борошно – 15	19,81	0,29	7
	MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O – 0,01	11,32	0,000113	7
	CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O – 2	92,50	0,18	9
	Вартість 1 л середовища – 9,83 грн			

**Примітка.\*** – Ціни наведено станом на травень 2021 р. 1. <https://www.systopt.com.ua/>, 2. <https://kiev.prom.ua>, 3. <https://www.abcdef.com.ua>, 4. <https://novohim.com.ua/>, 5. <https://ahc.in.ua/>, 6. <https://dnep-r-market.com.ua>, 7. <https://russian.alibaba.com/>, 8. <https://himfarminvest.com.ua>.

**Умовна вартість 1 г цільового продукту (еритритолу) при  
культивуванні *Torula* sp., *Moniliella* sp. N61188-12, *Y. lipolytica* Wratislavia  
K1, *P. tsukubaensis* KN 75**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація еритритолу, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Продуктивність, г/л/год
<i>Torula</i> sp.	34,48	182	0,19	135	1,35
<i>Moniliella</i> sp. N61188-12	21,92	189,4	0,12	249	0,8
<i>Y. lipolytica</i> Wratislavia K1	7,9	58,2	0,14	74,5	0,78
<i>P. tsukubaensis</i> KN 75	9,83	245	0,04	85	2,86

## 2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування 85 год, концентрація еритритолу в культуральній рідині становить 245 г/л, а концентрація біомаси – 25,2 г/л.

### *Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення*

*Потреби для синтезу еритритолу.* Як джерело вуглецю для одержання еритриту використовується глюкоза.

Розрахуємо, скільки вуглецю міститься в 245 г еритритолу. Молекулярна маса еритриту [C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>] становить 122. Отже, у 122 г еритритолу міститься 48 г Карбону, а в 245 г еритриту  $(48 \times 245) / 122 = 96,4$  г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах глюкози міститься 96,4 г Карбону, враховуючи, що вміст Карбону у глюкозі становить 40 %. Отже, у 100 г глюкози міститься 40 г Карбону, а 96,4 г Карбону міститься у  $(96,4 \times 100) / 40 = 241$  г  $\approx 24$  % глюкози.

Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на глюкозі близько 40 % субстрату окиснюється до CO<sub>2</sub> для одержання енергії, необхідної для

конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме  $(241 \times 0,4) + 241 = 337,4$  г/л  $\approx 34$  %.

*Потреби для синтезу біомаси.* У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 25,2 г біомаси становить  $25,2 \times 0,5 = 12,6$  г. Ця кількість Карбону міститься у  $(12,6 \times 100) / 40 = 31,5$  г глюкози.

Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 25,2 г/л біомаси у середовище необхідно внести  $(31,5 \times 0,4) + 31,5 = 44,1$  г/л глюкози (44 %).

Отже, загальний вміст глюкози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (25,2 г/л) та еритритолу (245 г/л), становить  $337,4 + 44,1 = 381,5$  г/л  $\approx 38$  %.

#### ***Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення***

*Потреби для синтезу біомаси.* Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену.

Таким чином, у 25,2 г біомаси вміст азоту становить 2,52 г.

Продуцент еритритолу асимілює як джерело азотного живлення кукурудзяне борошно.

Розрахуємо кількість кукурудзяного борошна, необхідну для одержання 25,2 г/дм<sup>3</sup> біомаси. Концентрація доступного для бактерій органічного Нітрогену у кукурудзяному борошні становить 10 %. Отже, у 15 г кукурудзяного борошна міститься  $(10 \times 15) / 100 = 1,5$  г Нітрогену.

Кількість Нітрогену, необхідна для синтезу біомаси становить 2,25 г/л. З врахуванням Нітрогену, що міститься в кукурудзяному борошні, у середовище повинно бути внесено додатково  $2,25 - 1,5 = 0,75$  г/л кукурудзяного борошна.

#### ***Розрахунок складу глюкозного підживлювального розчину***

У вигляді підживлювального розчину в середовище необхідно внести у процесі культивування продуцента еритритолу 321,5 г/л глюкози. Тривалість культивування становить 85 год. Прийmemo, що підживлення додається у середовище кожні 12 год. Тоді кількість порцій підживлення становить

$(85-12) / 12 = 6$ . Отже, з кожною порцією підживлення у середовище повинно вноситись  $321,5 / 6 = 53,6$  г/л глюкози.

### ***Інші компоненти середовища***

Джерелами таких необхідних для росту мікроорганізмів елементів, як Фосфор, Магній, Кальцій і Ферум є кукурудзяне борошно.

Варто зауважити, що сіль Купруму вноситься у досить великій кількості через те, що перетворення субстрату в цільовий продукт еритрит-продукуючими мікроорганізмами відбувається за допомогою пентозофосфатного шляху, і Купрум впливає на активність головного ферменту - еритрозо редуктазу, а також створює осмотичний тиск в середовищі до того моменту, як буде внесена перша порція підживлення. Остаточо вплив Купруму на механізм перетворення пентозофосфатного шляху та його регулювання, а також ферменти задіяні в біотрансформації субстрату у еритритол не з'ясовані [5].

Наведені вище розрахунки щодо складу поживного середовища можна подати у вигляді таблиці 2.4.

*Таблиця 2.4*

### **Склад поживного середовища для культивування продуцента еритритолу**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л			
	Сумарний	Початковий	У глюкозному підживлювальному розчині	В одній порції підживлення
Глюкоза	381,5	60	321,5	53,6
Кукурудзяне борошно	15,75	15,75	—	—
MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O	0,01	0,01	—	—
CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	2	2	—	—

### 2.3. Морфолого-культуральні та фізико-біохімічні ознаки біологічного агента

**Морфолого-культуральні ознаки.** Дріжджі базидіоміцети, клітини розміром  $1,5 \times 5,0$  мкм (рис. 2.1) [3].

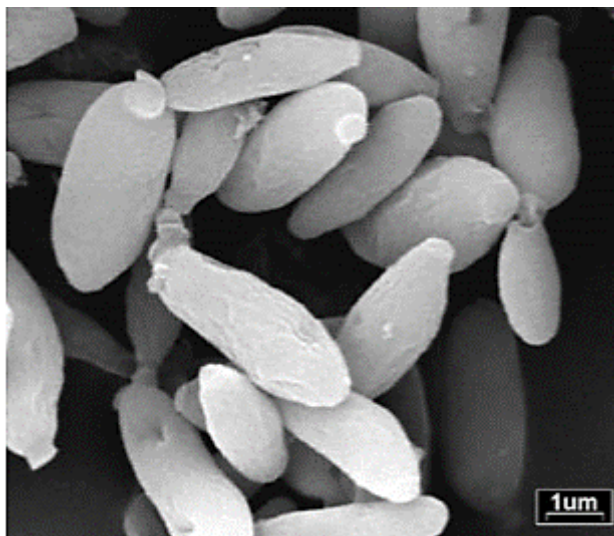


Рис. 2.1. Скануюча електронна мікрофотографія *P. tsukubaensis* KN75, збільшення  $\times 2500$  [3]

Після 3-денного зростання на агарі Лурії-Бертані (LB) при  $25^\circ\text{C}$  колонії були блискучими, від білого до кремового кольору, клітини опуклі кулеподібні, деякі сфероподібні. Утворення плівки не спостерігалось [3].

**Фізіолого-біохімічні ознаки.** *P. tsukubaensis* є осмофільним, облігатним аеробом. Оптимальна температура та рН для росту на бульйоні LB складають відповідно  $37^\circ\text{C}$  та 6,0. За типом живлення – хемоорганогетеротроф, може рости за наявності 10% NaCl та 5% глюкози [3].

Продукція амілоїдних з'єднань і реакції з діазонієвим синім В були негативними [3].

Сечовину не гідролізує [3]. Цукри не зброджуює. Асимілює інозит. Крохмалеподібні з'єднання не утворює. Ксилоза в гідролізатах клітин відсутня. Переважає убіхінон Q-10 [14].

### 2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *P. tsukubaensis* наведена згідно даних BOLD [15].

Царство – *Fungi*

Відділ – *Basidiomycota*

Клас – *Ustilaginomycetes*

Порядок – *Ustilaginales*

Родина – *Ustilaginaceae*

Рід – *Pseudozyma*

## РОЗДІЛ 3

### ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

#### 3.1. Потреба у цільовому продукті

В Україні все більше зростає попит на цукрозамінники. Натуральні та синтетичні цукрозамінники не виробляють в Україні, а імпортують з країн Азії та Європи.

Зважаючи на швидкі темпи приросту хворих на цукровий діабет в Україні, а також тенденція постійного зростання інтересу до здорового харчування та спорту, постає питання в пошуку безпечної заміни цукру без шкоди для здоров'я, з низьким глікемічним індексом, але зі збереженим показником солодкості. Таким продуктом є еритритол, він задовольняє усім вище зазначеним вимогам (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

#### Порівняння показників цукру та еритритолу

Показники \ Продукт	Цукор	Еритритол
Солодкість	100%	70%
Глікемічний індекс	70	0
Інсуліновий індекс	43	2
Калорійність (на 100 г продукту)	3696,29 ккал	200ккал

#### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

В Україні офіційно зареєстровано 1,3 млн хворих на цукровий діабет [1]. Щоб замінити потребу діабетиків у цукрі потрібно розрахувати кількість еритритолу, що буде еквівалентною цукру по солодкості.

Так як станом на 2018 рік 1 особа споживає 29,8 кг цукру/рік [16],

НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Лозіна В.Є.		
Перевір.		Красінько В.О.		
Консультант				
Н. Контр.				
Затверд.		Пирог Т.П.		
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування				
		Літера	Аркуш	Аркушів
			22	124
Кафедра БТМ				

необхідно розрахувати, яка кількість еритритолу може його замінити, враховуючи, що еритрит має 70% солодкості цукру, треба виробляти на 30% більше, тобто:  $29,8 + 30\% = 38,74$  кг/рік.

Незважаючи на поставки еритритолу з-за кордону, Україна має розробити своє власне виробництво. Для того, щоб оцінити попит на еритритол, на перших етапах виробництва, виготовимо таку кількість еритриту, щоб забезпечити 0,1% людей хворих на цукровий діабет в Україні:  $1300000 \cdot 0,001 = 1300$  осіб. Отже 1300 людей в рік будуть споживати:  $1300 \cdot 38,74 = 50\,362$  кг еритриту.

Оскільки еритрит виробляється за допомогою дріжджів, то знаючи синтезувальну здатність продуцента, можемо розрахувати кількість культуральної рідини, яку необхідно одержати, щоб забезпечити хворих людей на цукровий діабет.

Продуцент еритриту – осмофільні дріжджі *Pseudozyma tsukubaensis*, синтезують 245 г еритритолу на 1 л культуральної рідини.

Кількість культуральної рідини, необхідної для отримання 50 362 кг становить:

$$0,245 \text{ кг} - 1 \text{ л}; \quad X = 205\,559 \text{ л} = 205,6 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини}$$

$$50\,362 \text{ кг} - X;$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні та очищенні (32,8 %) [17], необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = 205,6 / (1 - 0,328) = 306 \text{ м}^3$$

### **3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів**

Для забезпечення 0,1 % діабетиків еритритолом, потрібно одержати (з врахуванням втрат при виділенні)  $306 \text{ м}^3$  культуральної рідини ( $V_{\text{гл}}$ ).

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 ( $V_d$ ) становитиме:

$$V_d = V_{\text{гп}} / \text{Трд} = 306 / 330 = 0,93 \text{ м}^3.$$

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

$$V_{\text{кр}} = (K_1 \cdot V_d \cdot T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \cdot 0,93 \cdot 95) / 24 = 4 \text{ м}^3 / \text{цикл},$$

де  $T_{\text{цф}}$  – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (85 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год).  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ( $K_1 = 1,1 - 1,5$ ).

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

4  $\text{м}^3$  культуральної рідини ( $V_{\text{цк}}$ ) можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$V_{\text{г}} = V_{\text{цк}} / K_{\text{зап}} = 4 / 0,65 = 6,2 \text{ м}^3$ , де  $K_{\text{зап}} = 0,65$  – коефіцієнт заповнення ферментера.

У додатку 4 знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер  $V_{\text{ф}} = 6,3 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення  $K_{\text{зф}} = V_{\text{цк}} / V_{\text{ф}} = 4 / 6,3 = 0,63$ , що не перевищує заданого значення.

### **3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу**

За виробничий цикл отримують  $V_{\text{кр}} = 4 \text{ м}^3$  культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 4 / (1 - 0,15) = 4,7 \text{ м}^3$ , де  $E_{\text{ф}}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом  $V_{роб.1}=4,7 \text{ м}^3$ .

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{зап} = 0,65$  розраховують можливий геометричний об'єм ферментера ( $V_{ф}$ ), що становить:

$$V_{ф} = V_{роб.1}/K_{зап} = 4,7/0,65 = 7,2 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 8 \text{ м}^3$ , та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап1} = V_{роб.1}/V_{сф} = 4,7/8 = 0,59.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

Оскільки, в процесі біосинтезу буде вноситися розчин для підживлення ( $2,96 \text{ м}^3$ ), необхідно розрахувати якого об'єму необхідний ферментер з коефіцієнтом заповнення  $0,65$ . Тоді необхідно взяти ферментер геометричним об'ємом:  $4,7+2,96=7,66 \text{ м}^3$ ,  $7,66/0,65 = 11,8 \text{ м}^3 \approx 12 \text{ м}^3$ . Уточнюємо коефіцієнт заповнення:  $7,66/12=0,64$ , отже геометричний об'єм ферментера обрано вірно.

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить  $10 \%$  від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+X_{ф}) = 4,7 / (1+0,1) = 4,3 \text{ м}^3$ , де  $X_{ф} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить  $V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 4,7 - 4,3 = 0,4 \text{ м}^3$ .

Для одержання  $0,4 \text{ м}^3$  інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від  $10$  до  $15\%$ .

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1}/(1-E_{па}) = 0,4/(1-0,10) = 0,44 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить  $10 \%$  від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити

$V_{пс2} = V_{роб.2}/(1+X_{па}) = 0,44/(1+0,1) = 0,4 \text{ м}^3$  , де  $X_{па} = 0,1$  – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 0,44 - 0,4 = 0,04 \text{ м}^3 \text{ або } 40 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту  $V_{роб.2} = 0,44 \text{ м}^3$  можна одержати під час культивування дріжджів у посівному апараті геометричним об'ємом  $V_{па2} = V_{роб.2}/K_{зап} = 0,44/0,65 = 0,68 \text{ м}^3$ . Приймаємо найближчий за об'ємом  $V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 0,44 - 0,4 = 0,04 \text{ м}^3$  або 40 л.

Кількість інокуляту  $V_{роб.2} = 0,44 \text{ м}^3$  можна одержати під час культивування дріжджів у посівному апараті геометричним об'ємом  $V_{па2} = V_{роб.2}/K_{зап} = 0,44/0,65 = 0,68 \text{ м}^3$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 1 \text{ м}^3$ , уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.2}/V_{сф} = 0,44/1 = 0,44.$$

Для одержання 40 л 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

$$V_{роб.3} = V_{пм2}/(1-E_{ін}) = 40/(1-0,10) = 44,4 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$V_{пс3} = V_{роб.3}/(1+X_{ін}) = 44,4/(1+0,1) = 40,4 \text{ л}$  , де  $X_{ін} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріала для інокулятора становить  $V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 44,4 - 40,4 = 4 \text{ л.}$

Кількість інокуляту  $V_{роб.3} = 44,4$  л можна одержати під час культивування дріжджів в інокуляторі геометричним об'ємом  $V_{ін3} = V_{роб.3} / K_{зап} = 44,4 / 0,65 = 68,3$  л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 0,1$  м<sup>3</sup>, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення

$$K_{з1} = V_{роб.3} / V_{сф} = 44,4 / 100 = 0,44.$$

Для одержання 4 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:

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

Кількість посівного матеріалу (доза) для малого інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища в малому інокуляторі.

Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде становити

$V_{пс4} = V_{роб.4} / (1 + X_{ін}) = 4,4 / (1 + 0,1) = 4$  л, де  $X_{ін} = 0,10$  – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить  $V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 4,4 - 4 = 0,4$  л.

Кількість інокуляту  $V_{роб.4} = 4,4$  л можна одержати під час культивування дріжджів в малому інокуляторі геометричним об'ємом  $V_{ін4} = V_{роб.4} / K_{зап} = 4,4 / 0,65 = 6,77$  л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 10$  л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення

$$K_{з1} = V_{роб.4} / V_{сф} = 4,4 / 10 = 0,44.$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора  $V_{пм4} = 0,4$  л можна одержати культивуванням дріжджів у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом  $V_{колб} = 750$  мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ .

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме  
 $N_{\text{колб}} = V_{\text{пмЗ}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 400 / (750 \cdot 0,2) = 2,7$ .

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 3 качалочні колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу еритритолу у ферментері об'ємом 8 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,65 буде проходити у чотири етапи.

Таким чином, за результатами розрахунків для біосинтезу еритритолу *P. tsukubaensis* приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом 8 м<sup>3</sup>, один інокулятор об'ємом 1 м<sup>3</sup>, один інокулятор об'ємом 0,10 м<sup>3</sup> і один інокулятор об'ємом 0,01 м<sup>3</sup>.

## РОЗДІЛ 4

### БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

#### 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

*P. tsukubaensis* KN 75 як джерело вуглецю може використовувати глюкозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, сахарозу, декстрини, крохмаль, кукурудзяний крохмаль, гліцерин та соєву олію. Найвище виробництво еритритолу досягається, коли глюкоза є джерелом вуглецю. Джерелом азоту можуть слугувати: кукурудзяне борошно, соєве борошно, картопляний протеїн, дріжджовий екстракт, пептон, солодовий екстракт, яловичий екстракт та триптон. Кукурудзяне борошно виявилось найкращим джерелом азоту, на другому місці виступає дріжджовий екстракт [2]. За умов росту на глюкозі (див. табл. 2.1) у штаму *P. tsukubaensis* KN 75 функціонує гліколіз та пентозофосфатний цикл (рис. 4.1). Схему метаболізму глюкози у *P. tsukubaensis* KN 75 наведено за спорідненим організмом *Y. lipolytica* згідно даних KEGG [18, 19].

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	Літера	Аркуш	Аркушів
Розроб.	Лозіна В.Є.						29	121
Перевір.	Красінько В.О.							31
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							



**Рис. 4.1. Шлях катаболізму глюкози у *P. tsukubaensis* KN 75**

Ферменти: 1 – фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 3 – 6-фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11); 4 –

глюкозо-біфосфатальдолаза (КФ.4.1.2.13); 5 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 6 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 7 – фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.11); 8 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 9 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

#### **4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт**

Під час росту *P. tsukubaensis* KN 75 з використанням глюкози як джерела вуглецю, анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення втрат інтермедіатів циклу трикарбонових кислот (ЦТК) – попередників біосинтезу амінокислот, є карбоксилювання фосфоенолпірувату за допомогою фосфоенолпіруваткарбоксілази (КФ 4.1.1.31) з утворенням оксалоацетату та карбоксилювання пірувату з утворенням малату і оксалоацетату під дією малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.39) та піруваткарбоксілази (КФ 6.4.1.1) відповідно.

Такі сполуки як піруват та 3-фосфогліцерат, попередники піруватної родини (аланін, валін, лейцин), фосфоенолпіруват, один із попередників ароматичної групи амінокислот утворюються під час катаболізму ростового субстрату.

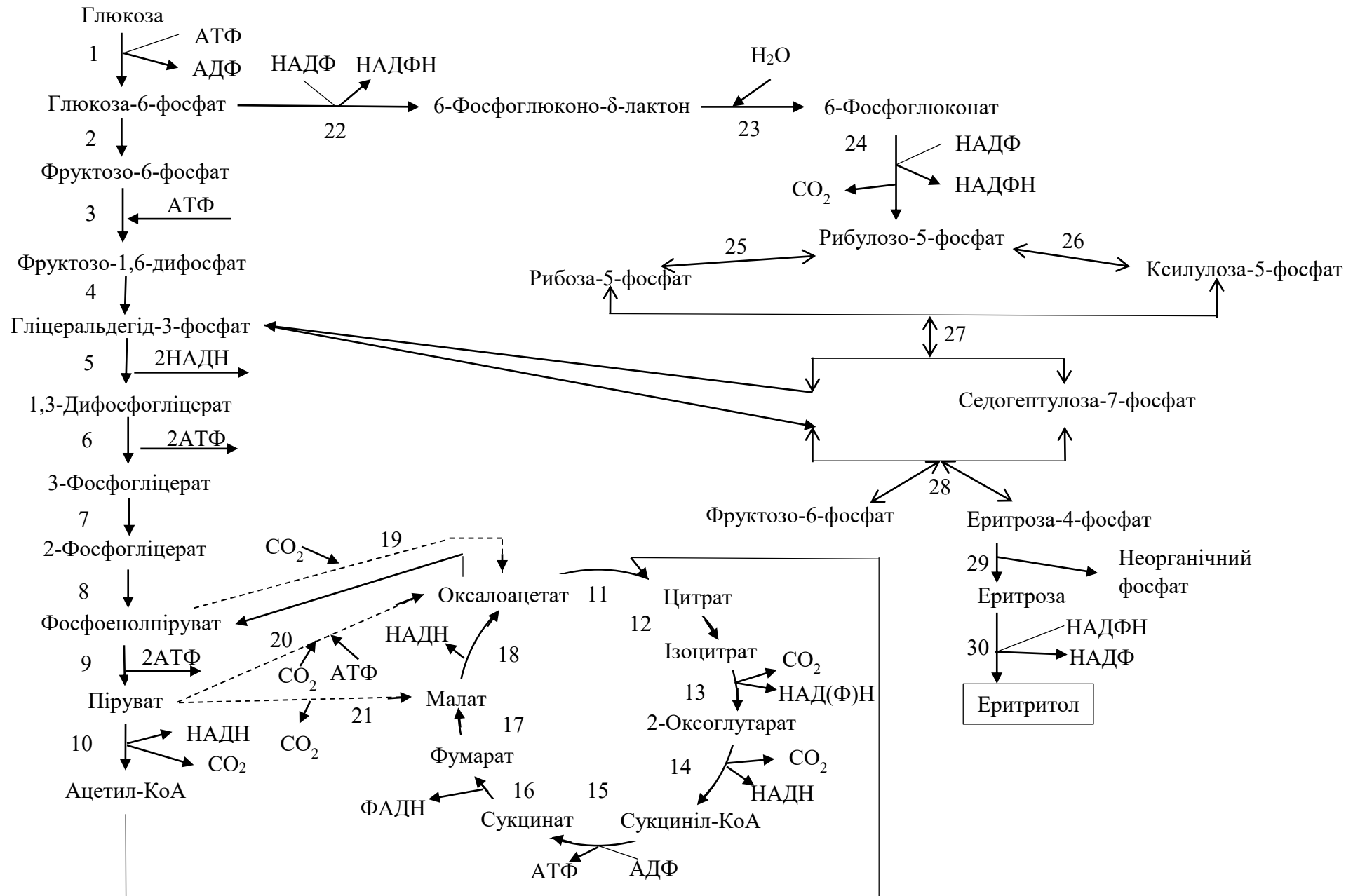
Інші попередники ароматичної групи: еритрозо-4-фосфат та 5-фосфорибозил-1-пірофосфат (попередник гістидину) утворюються у пентозофосфатному циклі. Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват – попередники фенілаланіну, тирозину та триптофану.

Амінокислоти аспаргатової родини (аспаргат, аспарагін, метіонін, треонін, ізолейцин) утворюються з оксалоацетату, який є інтермедіатом ЦТК.

Амінокислоти глутаматової родини (глутамат, глутамін, пролін, аргінін) утворюються з 2-оксоглутарату (інтермедіату ЦТК).

Глюкоза за участю гексокінази (КФ 2.7.1.1) перетворюється на глюкозу-6-фосфат, яка за допомогою глюкозо-6-фосфат дегідрогенази (КФ 1.1.1.49) перетворюється на 6-фосфоглюконо- $\delta$ -лактон. 6-фосфоглюконолактоназа (КФ 3.1.1.31) активує перетворення 6-фосфоглюконо- $\delta$ -лактону в 6-фосфоглюконат, який під дією 6-фосфоглюконат дегідрогенази (КФ 1.1.1.44)

перетворюється в рибулозо-5-фосфат. Рибулозо-5-фосфат, в свою чергу за допомогою рибулозо-5-фосфат ізомерази (КФ 5.3.1.6) та рибулозо-5-фосфат 3-епімерази (КФ 5.1.3.1) перетворюється в рибозу-5-фосфат та ксилулозу-5-фосфат відповідно. Рибоза-5-фосфат та ксилулоза-5-фосфат під дією транскетолази (КФ 2.2.1.1) утворюють гліцеральдегід-3-фосфат та седогептулозу-7-фосфат, вони за допомогою трансальдолази (КФ 2.2.1.2) перетворюються на фруктозо-6-фосфат та еритрозо-4-фосфат, остання під дією еритрозо-4-фосфат кінази (фосфатази) (КФ 2.7.1.210) перетворюється в еритрозу. Кінцевою реакцією є перетворення еритрози за допомогою еритрозо редуктази (КФ 1.1.1.21) в еритритол (*рис. 4.2*) [3, 5].



**Рис. 4.2. Схема біотрансформації ростового субстрату у цільовий продукт**

**Умовні позначення:** → основний шлях біосинтезу; ---▶ анаплеротичні реакції;

**Ферменти:** 1 – фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 3 – 6-фосфоглюкофруктокіназа (КФ.2.7.1.11); 4 – глюкозо-бифосфатальдолаза (КФ.4.1.2.13); 5 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 6 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 7 – фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.11); 8 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 9 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40); 10 – піруватдегідрогеназа (КФ 1.2.1.51); 11 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 12 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 13 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 14 – дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4); 15 – сукциніл-КоА синтетаза, альфа-субодиниця (КФ 6.2.1.5); 16 – сукцинатдегідрогеназа, цитохром b субодиниця (КФ1.3.5.4); 17 – фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2); 18 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 19 – фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31); 20 – піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1); 21 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.39); 22 – глюкозо-6-фосфат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.49); 23 – 6-фосфоглюконолактоназа (КФ 3.1.1.31); 24 – 6-фосфоглюконат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.41); 25 – рибозо-5-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.6); 26 – рибулозо-5-фосфат 3-епімераза (КФ 5.1.3.1); 27 – транскетолаза (КФ 2.2.1.1); 28 – трансальдолаза (КФ 2.2.1.2); 29 – еритрозо-4-фосфат кіназа (фосфатаза) (КФ 2.7.1.210); 30 – еритрозо редуктаза (КФ 1.1.1.21).

## РОЗДІЛ 5

### ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЕРИТРИТОЛУ

#### 5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Оскільки оптимальною температурою для культивування аеробного штаму *P. tsukubaensis* KN 75 є 34°C, а оптимальне значення рН 6,0, то можливий ризик контамінації сторонніми мезофільними та нейтрофільними мікроорганізмами. Це зумовлює необхідність забезпечення асептичних умов під час біосинтезу, чого неможливо досягти при поверхневому культивуванні.

Для забезпечення процесу біосинтезу необхідною умовою є аерація та перемішування. Швидкість перемішування регулювали в діапазоні від 500 до 850 об/хв, щоб підтримувати концентрацію розчиненого кисню близько 30%. Швидкість аерації підтримували на рівні 1 об/хв.

У зв'язку з викладеним вище, культивування *P. tsukubaensis* KN 75 для біосинтезу еритриту здійснюють глибинним способом.

Незважаючи на суттєві переваги безперервного культивування перед періодичним, біосинтез еритриту здійснюється у періодичному процесі. Оскільки, для приготування поживного середовища необхідно 381,5 г/л глюкози, а великі концентрації можуть зашкодити мікроорганізму, то використовують дробне підживлення.

##### 5.1.1. Обґрунтування способу культивування та типу ферментера

1. У процесі культивування продуцента еритриту необхідною умовою є аерація та контроль концентрації розчиненого кисню, тому ферментер повинен бути оснащений автоматичною подачею кисню та датчиком рО<sub>2</sub>.

2. Для інтенсифікації массообмінного процесу використовуємо перемішуючий пристрій з частотою обертання 500-850 об/хв.

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Лозіна В.Є.				РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва еритриту	Літера	Аркуш	Аркушів
Перевір.	Красінко В.О.						35	121
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

3. Для забезпечення оптимальної температури в 34°C ферментер оснащується датчиком температури та сорочкою.

4. Для підтримання сталої концентрації глюкози (225 г/л) в процесі ферментації, необхідно, щоб ферментер був оснащений системою додаткового підживлення.

Зважаючи на вище зазначені умови, доцільно буде обрати ферментер від компанії Biorus (Росія) [[Промышленные ферментеры от компании Biorus - BIORUS \(bio-rus.ru\)](http://www.biorus.ru)]. Дана компанія виробляє промислові біореактори на замовлення з обраним об'ємом.

У ферментерах даного виробника є всі необхідні для культивування дріжджів компоненти. Вони оснащені датчиками:  $pO_2$  (для контролю концентрації розчиненого кисню), рН, температури. Також мають автоматичну подачу кисню через фільтри, порт для відбору проб та систему контролю температури, а у верхній боковій стінці є система додаткового підживлення. Швидкість обертання в даному ферментері передбачена до 1000 об/хв, що задовольняє наші вимоги.

Отже, для проведення виробничого біосинтезу, необхідно замовити виробництво ферментера та приготувати розчин глюкози для підживлення.

### **5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря**

Для синтезу еритритолу за допомогою дріжджів *P. tsukubaensis* KN 75 необхідною умовою є аерація. Тому важливим етапом підготовки виробництва є стадія підготовки аераційного повітря.

Спочатку відбувається забір атмосферного повітря за допомогою повітрозбірника, у якому для попереднього очищення повітря від грубих часточок пилу встановлюють стільникові фільтри, що заповненні металевою сіткою чи скловолокном. Обираємо стільниковий фільтр з дрібнопористою металевою сіткою, що здатний вловлювати частинки розміром більше 2 мкм. Такі фільтри мають довгий строк служби та легко очищаються.

Для виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу повітря необхідно стерилізувати в два етапи, за допомогою попередньої та остаточної очистки.

Для попередньої (грубої) очистки використовують головний фільтр на основі волокнистих матеріалів, що забезпечує очистку повітря на 95% і встановлюється на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря в ферментаційному цеху.

В головних (набивних) фільтрах як фільтраційні матеріали використовують: перхлорвінілове, поліакрилонітрильне волокно, скловолокна чи базальтові волокна [20], синтетичні волокна (лавсан), антимікробне віскозне волокно, металокерамічні пористі матеріали [21] та ін.

Доцільно буде обрати фільтр зі скловолокном. Структура матеріалу така, що у напрямку руху повітря діаметр волокон зменшується, а щільність упаковки волокон збільшується. Така будова скловолокна має перевагу в порівнянні з іншими набивними матеріалами так як частинки пилу накопичуються рівномірно по всій глибині. Запобігаючи передчасному забрудненню поверхні фільтруючого матеріалу з боку входу повітря і, як наслідок, збільшує пило-ємність і термін використання самого фільтра, а також він підлягає регенерації [22].

Для остаточної очистки використовують індивідуальні фільтри ступінь очистки повітря яких 99,99 %, що встановлюють безпосередньо перед ферментером.

Для тонкого очищення застосовують базальтові волокна, синтетичні волокна, картон, фторопласт, тощо [21]. Доцільно буде обрати індивідуальні фільтри для газів ВІО-Х II, які представляють собою картриджі з нержавіючої сталі, наповнені гідрофобним середовищем із волокон боросилікатного скла. Фільтри такого типу та конструкції здатні затримувати частинки розміром 0,01 мкм і мають підвищену стійкість до температура, а тому можуть стерилізуватися паром [23].

Для підготовки повітря в лабораторії та боксах, де працюють з посівним матеріалом та інокулятом, встановлюють УФ-лампи.

### **5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

#### ***Обґрунтування вибору миючих засобів для оброблюваних об'єктів***

1) Для миття ферментерів, реакторів змішувачів та УБС пропоную обрати дезінфекційний засіб «Деканаль», діючими речовинами якого є глутаровий альдегід у межах 18,0-22,0 % та алкілдиметилбензиламоніум хлорид у межах 8,0-12,0 %. Даний засіб можна використовувати для достерилізаційної очистки обладнання. Робочі розчини «Деканаль» мають мийні властивості, не викликає корозії металів, не фіксує органічні забруднення на поверхнях об'єктів, добре змивається та не залишає нальоту. Спектр антимікробної дії засобу дуже широкий, він проявляє бактерицидні, віруліцидні, фунгіцидними та спороцидні властивості.

Концентрація робочих розчинів та час експозиції: для предстерилізаційного очищення – 0,5% -30хв; 1% -15 хв [24].

2) Для миття підлоги, стін, обладнання, вентиляції можна обрати «Біонол» - засіб дезінфікуючий з мийними властивостями. Який використовується для передстерилізаційного очищення, очищення сильно забруднених підлог в цехах, очищення різного технологічного обладнання з антикорозійних матеріалів, а також для миття вентиляції. Діючою речовиною засобу є алкілбензосульфат натрію у межах 4,5-10,0%. «Біонол» виявляє змочувальні, мийні, емульгуючі властивості, повністю розчиняється у воді, добре піниться у гарячій та холодній воді, утворює стійку стабільну піну. Ефективно працює при низьких концентраціях (0,5-2%) у воді будь якої жорсткості навіть за відсутності гарячої води. Використовують засіб згідно з МВ МОЗ України №206-2013 від 12.04.2013. зберігання невикористаного робочого розчину допускається протягом 14 діб [25].

3) Для миття вікон, стін, підлоги, обладнання можна також застосовувати засіб мийний лужний пінний з дезінфікуючим ефектом на основі активного хлору «DISOVER SA4». Діючою речовиною якого є

гіпохлорит натрію – 7%. Комбінована дія лугів та активного хлору обумовлює активне видалення забруднень. Застосовується для очищення та дезінфекції сильно забруднених поверхонь обладнання, стін, стель, підлоги, вікон, допускається використання в якості профілактичного очищення водостоків.

Концентрат розводять з водою у співвідношенні 1:2-1:50 в залежності від ступені забруднення, температура робочого розчину 5-50°C, час експозиції 20-30 хв; не дозволяють висихання розчину, після активації змивають водою, яка має характеристики питної [26].

4) Для миття приміщень, обладнання та інвентарю також можна використовувати «ПроСанітЕксп». Діючими речовинами засобу є: алкілдиметиламоній хлорид - 0,5%, дидецилдиметиламоній хлорид – 0,4%, N,N'біс (3 –амінопропил) додециламін – 0,5%. Має високоефективні віруліцидні, бактерицидні, фунгіцидні та спороцидні властивості. Використовують для всіх видів вологого прибирання у теплому або холодному стані, поверхнево-активні речовини з помірним піноутворенням забезпечують ретельне змочування поверхонь дезінфікуючими речовинами розчину та дозволяє однаково легко обробляти як горизонтальні, так і вертикальні поверхні. Після висихання не потребує видалення. Можлива обробка поверхонь оприскувачем.

Застосовується у вигляді водного розчину від 0,5 до 2,5%. Для обробки поверхонь (на 1 м<sup>2</sup>) достатньо 0,1 л 1% розчину [27].

Порівнявши вище зазначені мийні засоби пропоную обрати для миття ферментерів, реакторів-змішувачів та ємностей дезінфекційний засіб «Деканаль», який має призначення саме для предстерилізаційного миття обладнання.

Для миття поверхонь, обладнання, підлоги та стін пропоную обрати серед даних представників засіб дезінфекційний з мийною здатністю «ПроСанітЕксп», який підходить для усіх типів матеріалів поверхонь та не потребує змивання.

## ***Обґрунтування вибору дезінфікуючого засобу для оброблюваних об'єктів***

Для того, щоб не виникли дезрезистентні форми мікроорганізмів пропоную обрати два дезінфікуючих розчини, щоб їх періодично замінювати один на інший.

Перший дезінфікуючий засіб, який я пропоную обрати – «Біопагdez». Діючими речовинами даного засобу є: полі (гексаметиленгуанід) гідрохлорид – 1,8%; алкіл С12-18 диметилбензиламоній хлорид – 9,0%. Робочі розчини засобу мають гарні миючі, дезодоруючі, змочувальні, емульгуючі властивості, усувають неприємні запахи, не пошкоджують вироби та поверхні з різноманітних матеріалів, добре змиваються з поверхонь, не утворюють нальоту і плям, не фіксують органічні забруднення, мають пролонговану дію. Засіб є не токсичним, не горючим, вибухо- і пожежобезпечним, не містить окислювачів, добре розчинний у воді, екологічно безпечний, не провокує і не посилює виділення летких хімічних речовин із поверхонь та виробів, що піддаються обробці. Серед недоліків - не сумісність з милами та аніонактивними ПАР.

«Біопагdez» використовують для дезінфекції обладнання та різноманітних поверхонь приміщень. Виявляє широкий спектр антимікробної дії: має бактерицидні, туберкулоцидні, спороцидні, віруліцидні, фунгіцидні та овоцидні і ларвіцидні властивості

Робочі розчини відповідної концентрації готують відповідно до таблиці, наприклад, для 10 л 0,5% розчину необхідно 50 мл концентрату (концентрат розчиняють у холодній або теплій воді), час експозиції 5 хв. Норма витрати розчину 50-100 мл/м<sup>2</sup>, термін придатності робочого розчину – 21 доба [28].

Другий дезінфікуючий засіб, який я пропоную обрати – «Даноксин». Діючими речовинами даного засобу є: перкарбонат натрію – 16,5%, полі(гексаметиленбігуанід)гідрохлорид – 0,45%. Робочі розчини не мають окислювальних властивостей, мають гарні змочувальні, очищаючі, мийні, емульгуючі, знежирюючі та дезодоруючі властивості, низьке піноутворення,

не фіксують органічні забруднення, ефективні для видалення біоплівки, видаляють органічні та неорганічні забруднення, добре змиваються, не залишають нальоту і плям, не ушкоджують матеріали поверхонь, усувають неприємні запахи, є не токсичним і повністю біодеградує. Недоліки засобу: не придатний для інструментів з латуні, міді, а також хромоаний та нікельованих інструментів з механічними пошкодженнями; його розчини не сумісні з аніоноактивними ПАВ; слід уникати змішування з альдегідутримуючими сполуками.

«Даноксин» використовують для поточної та заключної дезінфекції поверхонь та обладнання. Виявляє широкий спектр антимікробної дії: має бактерицидні, туберкулоцидні, спороцидні, віруліцидні, фунгіцидні та овоцидні і ларвіцидні властивості.

Робочі розчини дезінфекційного засобу «Даноксин» готують шляхом розчинення необхідної кількості засобу у воді при температурі 18-40°C протягом 15 хв, для пришвидшення розчинення порошку, розчин декілька разів перемішують. У готовому розчині може залишитися невелика кількість нерозчинного осаду, який не знижує його активності, а є буфером, що забезпечує його стабільність протягом 36 год з моменту приготування

Для приготування робочих розчинів відповідної концентрації користуються таблицею, наприклад, для 5л 0,5% розчину необхідно 25 г концентрату, час експозиції 5 хв. Норма витрати розчину 50-100 мл/м<sup>2</sup> [29].

Узагальнені дані потреби у деззасобах наведені у таблиці 5.1.

**Орієнтовний розрахунок потреби в мийних та дезінфекційних засобах для дезінфекції поверхонь у приміщеннях, обладнання, тощо**

№ з/п	Назва об'єкта	Площа, що підлягає дезінфекції, м <sup>2</sup>		Дезінфікуючий засіб (мийний)			Кратність обробок			Потреби у деззасобах, л (кг)			
		При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні	Назва	Концентрація виробничого розчину, %	Норма витрати робочого розчину на 1 м <sup>2</sup>	На добу	На місяць	На рік	На одну обробку		На місяць	На рік
										При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні		
1	Мийка ферментерів, реакторів-змішувачів, УБС	31,89 м <sup>3</sup>	-	Деканаль	0,5	100 мл	-	6	72	159,45 м <sup>3</sup>	-	4385 м <sup>3</sup>	52618,5 м <sup>3</sup>
2	Мийка приміщення, обладнання та інвентарю	450	264	ПроСанітЕксп	1	100 мл	3	82	990	450 мл	450 мл	12,37	148,5
3	Дезінфекція обладнання, поверхонь та інвентарю	264	264	Біопагdez	0,5	100 мл	3	82	990	225 мл	225 мл	6,19	74,25
4	Дезінфекція обладнання, поверхонь та інвентарю	264	264	Даноксин	0,5	100 мл	3	82	990	225 мл	225 мл	6,19	74,25

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

Для виробничого біосинтезу використовується середовище наступного складу (г/л):

- Глюкоза – 60;
- Кукурудзяне борошно – 15,75;
- $MnSO_4 \times 4H_2O$  – 0,01;
- $CuSO_4 \times 5H_2O$  – 2.

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 12 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,65. Підготовка посівного матеріалу відбувається у чотири етапи ( в колбах на качалках, у посівних апаратах об'ємом 1 м<sup>3</sup>, 100 л та 10 л).

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках, з попереднім поділом на композиції, будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (0,4 л); для вирощування в інокуляторі і посівних апаратах поживне середовище буде поділено на композиції та здійснена стерилізація у реакторах-змішувачах або безпосередньо у самих апаратах; для виробничого біосинтезу поживне середовище попередньо готують у реакторі-змішувачі та перекачують насосом на стерилізацію до УБС-5.

Для того, щоб визначити спосіб приготування деяких компонентів (мікроелементи) та визначитися з необхідними для цього колбами чи збірниками, розрахуємо кількість таких компонентів, необхідну для приготування середовища на кожну з чотирьох стадій виробництва (табл. 5.2).

**Розрахунок вмісту мікроелементів в різних об'ємах поживного середовища**

Об'єм середовища, л	Вміст мікроелементів	
	MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O
0,4	4 мг	0,8 г
4	40 мг	8 г
40,4	0,40 г	80,8 г
400	4 г	800 г
4300	43 г	8,6 кг

Дані, наведені у табл. 5.2, свідчать, що для першої стадії (вирощування інокуляту в колбах і посівному апараті об'ємом 10 л) необхідно готувати запасний розчин мікроелементів, для решти – мікроелементи можна безпосередньо вносити у композиції.

Нижче наведено особливості приготування і стерилізації середовища для вирощування інокуляту (4 стадії) і виробничого біосинтезу.

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

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *P. tsukubaensis* KN 75, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації):

Композиція А: глюкоза, кукурудзяне борошно (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Кукурудзяне борошно попередньо суспендують в холодній воді в колбі на 750 мл, а потім поступово нагрівають до температури 70-90°C, на водяній бані, і витримують при цій температурі протягом 20-30 хв. Після цього до одержаної суспензії додають глюкозу та стерилізують в автоклаві.

Окремо готують запасний розчин мікроелементів (MnSO<sub>4</sub>×4H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O) об'ємом 100 мл (з розрахунку на використання в двох стадіях

підготовки посівного матеріалу). Розчин мікроелементів стерилізують в автоклаві при 131°C протягом 40 хв.

### ***Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в малому інокуляторі***

Стерилізація 4 л поживного середовища, необхідної для цієї стадії, здійснюється в інокуляторі об'ємом 0,01 м<sup>3</sup>, тому ми отримуємо наступний поділ поживного середовища на композиції:

Композиція А: глюкоза, кукурудзяне борошно (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Кукурудзяне борошно суспендується та заварюється у реакторі-змішувачі, далі туди вноситься глюкоза, суміш перемішується і перекачується насосом в інокулятор для стерилізації.

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

Стерилізація 40,4 л та 400 л поживного середовища, необхідної для цієї стадії, здійснюється у посівних апаратах об'ємом 0,1 м<sup>3</sup> і 1 м<sup>3</sup> відповідно, що потребує перескладання композиції поживного середовища.

Композиція А: глюкоза, кукурудзяне борошно (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б:  $MnSO_4 \times 4H_2O$ ,  $CuSO_4 \times 5H_2O$  (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Кукурудзяне борошно суспендується та заварюється у реакторі-змішувачі, далі туди вноситься глюкоза суміш перемішується, і перекачується насосом в посівний апарат для стерилізації (для посівного апарату об'ємом 0,1 м<sup>3</sup>) та стерилізується безпосередньо в реакторі-змішувачі (для посівного апарату об'ємом 1 м<sup>3</sup>).

Композиція Б готується і стерилізується у колбах (для посівного апарату об'ємом 0,1 м<sup>3</sup>) та у реакторі-змішувачі з подальшою стерилізацією у посівному апараті (для посівного апарату об'ємом 1 м<sup>3</sup>).

### ***Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу***

Для виробничого біосинтезу необхідно приготувати та простерилізувати 4 м<sup>3</sup> середовища. Щоб швидко досягнути стерильності, зменшити витрати води та пару, потрібних для стерилізації і не допустити істотних змін та деструкції компонентів поживного середовища доцільніше використання безперервного способу стерилізації в УБС-5.

В збірник, що знаходиться перед УБС, подаємо борошно та холодну воду, перемішуємо та заварюємо борошно поступово піднімаючи температуру до 80°C.

Після заварювання додаємо інші компоненти середовища: воду, глюкозу,  $MnSO_4 \times 4H_2O$  та  $CuSO_4 \times 5H_2O$ , перемішуємо та насосом перекачуємо у попередньо простерилізований разом із всією установкою збірник УБС та проводимо стерилізацію при 131°C. Тривалість повного циклу стерилізації всього об'єму поживного середовища для виробничої стерилізації (розрахований час роботи УБС) становитиме 51,6 хв.

#### **5.1.5. Особливості підготовки та стерилізації розчину глюкози для підживлення**

Також, у ході виробничого біосинтезу, для того, щоб забезпечити максимальний рівень біосинтезу еритритолу (245 г/л) необхідно підтримувати концентрацію глюкози на рівні 225 г/л.

##### ***Розрахунок кількості порцій підживлення***

У вигляді підживлювального розчину в середовище необхідно внести у процесі культивування продуцента еритритолу 321,5 г/л глюкози. Тривалість культивування становить 85 год. Прийmemo, що підживлення додається у середовище кожні 12 год. Тоді кількість порцій підживлення становить  $(85-12) / 12 = 6$ . Отже, з кожною порцією підживлення у середовище повинно вноситись  $321,5 / 6 = 53,6$  г/л глюкози.

##### ***Розрахунок об'єму розчину для підживлення***

Кінцева концентрація джерела вуглецю  $C_k = 225$  г/л (кг/м<sup>3</sup>);

Початкова концентрація джерела вуглецю  $C_{\text{п}} = 60$  г/л (кг/м<sup>3</sup>);

Концентрація розчину підживлення  $C_{\text{ж}} = 321,5$  г/л (кг/м<sup>3</sup>);

Кількість етапів підживлення  $n = 6$ .

Спочатку необхідно розрахувати початковий об'єм культуральної рідини і розчину підживлення (за правилом хреста):

321,5            96,5 – 3,86 частин – початкове поживне середовище.  
225

60                165 – 6,6 частин – розчин підживлення.  
(321,5-225=96,5; 225-60=165)

Співвідношення початкового об'єму культуральної рідини до розчину підживлення 3,86:6,6.

1 частина культуральної рідини становить:  $V_{\text{роб}} / (\text{поч.п.с} + \text{роз-н підж.})$   
 $= 4700 / (3,86+6,6) = 449,3$  л, де  $V_{\text{роб}} = 4,7$  м<sup>3</sup> = 4700 л.

Об'єм розчину підживлення  $V_{\text{ж.сум.}} = 6,6 \cdot 449,3 = 2965,4$  л = 2,96 м<sup>3</sup>.

Початковий об'єм культуральної рідини  $V_{\text{п.кр.}} = 3,86 \cdot 449,3 = 1734,3$  л = 1,734 м<sup>3</sup>.

Тепер розрахуємо об'єм розчину підживлення та масу джерела вуглецю на одноразове підживлення:

$V_{\text{ж}} = V_{\text{ж.сум.}} / n = 2965,4/6 = 494,2$  л = 0,494 м<sup>3</sup>.

$m_{\text{ж}} = V_{\text{ж}} \cdot C_{\text{ж}} = 0,494 \cdot 321,5 = 158,8$  кг.

Проводимо перевірку розрахунку за сумарною кінцевою масою джерела вуглецю:

$m_{\text{к}} = V_{\text{роб}} \cdot C_{\text{к}} = 4,7 \cdot 225 = 1057,5$  кг.

$m_{\text{к}} = V_{\text{п.кр.}} \cdot C_{\text{п}} + n \cdot V_{\text{ж}} \cdot C_{\text{ж}} = 1,734 \cdot 60 + 6 \cdot 0,494 \cdot 321,5 = 104,04 + 952,926 = 1056,966 \approx 1057$  кг.

Отже, технологічна схема окрім стадій підготовки поживного середовища, включає таку додаткову стадію, як приготування та стерилізація розчину мікроелементів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках та інокуляторі об'ємом 0,01 м<sup>3</sup>.

Крім того, необхідно передбачити:

- реактор-змішувач для приготування і стерилізації розчину для підживлення;
- реактор-змішувач для приготування композиції А: 5 л, 50 л та 500 л;
- реактор-змішувач для приготування композиції Б: 15 л.

## **5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту**

Культуральна рідина містить, як цільовий продукт – еритритол, так і залишки поживного середовища, продукти метаболізму та дріжджову біомасу.

Виділення і очищення цільового продукту включає такі стадії:

1. Відділення біомаси
2. Іонообмінна хроматографія та очищення і знебарвлення на колонці з активованим вугіллям
3. Концентрування та кристалізація
4. Відокремлення кристалів еритритолу
5. Сушіння

### ***Вибір способу відділення біомаси***

На даному етапі відбувається відділення фільтрату від дріжджових клітин. Для розділення рідкої та твердої фаз використовують методи центрифугування та сепарування. В патенті [17] пропонують використання центрифугування, яке повторюється три рази, з використання центрифуги типу де Лавалля. Дані центрифуги мають продуктивність 4-20 м<sup>3</sup>/год та затримують 70-95% клітин, що задовольняє вимогам виробництва еритритолу, але для досягнення такої ефективності необхідно, до оброблюваного осаду додавати високомолекулярні поліелектроліти [30].

Центрифугування має основну перевагу в порівнянні з іншими методами розділення – збільшення ефективності та продуктивності розділення, можливість видалення частинок розміром до 0,01 мкм. До недоліків даного процесу можна віднести: складність конструкції та експлуатації, висока вартість та енергоємність, нагрівання мікроорганізмів, складність герметизації та асептики [21].

За своєю суттю сепаратори є відстійними центрифугами, але внаслідок високого фактора розділення конструкції їх більш складні [31]. Сепарування має високу ефективність, дозволяє розділяти суспензію, що погано фільтрується, інтенсифікувати виділення та концентрування мікроорганізмів та твердих часток розміром більше 0,5 мкм. До недоліків можна віднести зниження ефективності при утворенні великої кількості осаду [21].

Для виділення біомаси дріжджів краще обрати сепаратори для концентрування дріжджової маси і відділення фільтрату. Існують сепаратори безперервної та періодичної дії. Сепаратори безперервної дії використовують для відділення суспензій з вмістом твердої фази 1-10%, сепаратори періодичної дії поділяють на дві категорії: 1) з вмістом твердої фази до 0,5%, 2) з вмістом твердої фази до 5% та періодичним самовивантаженням осаду [31]. Для відділення дріжджової біомаси від супернатанту, що містить еритритол, краще обрати сепаратор безперервної дії з вмістом твердої фази 1-10%, це значно зекономить час вивантаження осаду та самого процесу.

#### ***Вибір способу виділення і очищення еритритолу***

Згідно патенту [17] отриманий супернатант, який містить еритритол, можна очистити перед кристалізацією використовуючи два способи: 1) іонообмінна хроматографія, а потім фільтрування крізь колонку з активованим вугіллям; 2) хроматографічне розділення, іонообмінна хроматографія, фільтрування крізь колонку з активованим вугіллям.

Перший спосіб включає спільні стадії очищення. Для демінералізації супернатанту використовують іонообмінну хроматографію. Іонообмінник складається з трьох колонок наповнених наступними смолами: 1) сильнокислою катіонообмінною смолою; 2) слаболужною аніонообмінною смолою; 3) сильнокислою катіонообмінною та сильнолужною аніонообмінною смолами [17].

Другий спосіб відрізняється лише наявністю хроматографічного розділення, але для цього необхідне попереднє концентрування супернатанту, для видалення солей та олігосахаридів. Після стадії очистки, на етапі

кристалізації, швидкість видалення ацетоїну, що є небажаною домішкою, становить 97%, для першого ж способу – 91%. Але в кінцевому результаті, після всіх стадій виділення та очищення, отримуємо меншу кількість кристалів еритритолу [17]. Тому даний спосіб є більш довготривалим, енерговитратним та дороговартісним.

Для знебарвлення розчину та додаткового очищення від побічних продуктів ферментації чи інших домішок, що залишилися після іонного обміну демінералізований супернатант пропускають через колонку з активованим вугіллям.

### ***Вибір способу концентрування та кристалізації***

Для утворення кристалів еритритолу, концентрування та кристалізацію проводять при температурі 50-100°C та 60-90°C відповідно [17]. Процес кристалізації відрізняється лише тим, що після нагрівання рідину поступово охолоджують в тому самому апараті. Пропоную обрати випарний апарат та кристалізатор, які з'єднані послідовно.

Для концентрування пропоную розглянути: випарний апарата Кестнера, який зазначений в патенті, роторно-плівковий апарат та апарат з примусовою циркуляцією.

Випарний апарат Кестнера має такі переваги: малі температурні втрати, велика швидкість руху плівки рідини, яка сприяє хорошій теплопередачі. До недоліків відносять великі габарити апарату, чутливість до нерівномірної подачі розчину, складність очистки довгих трубок та те, що рідина піднімається знизу вгору лише один раз [32].

Роторно плівковий апарат має ряд переваг: на нагрівачі не утворюється відкладення при температурі випарювання до 150°C; використання великої різниці температур між що гріючою парою та випарюваним розчином, що дозволяє повністю зберегти склад первинного продукту; висока теплонапруженість теплообмінної поверхні та низька металоємність конструкції; модульність і технологічність конструкцій; високий енергетичний потенціал вторинної пари; малий час перебування вихідного

продукту в апараті при його вертикальному компонуванні; високий ступінь випарювання [20]. Недоліки: незначна поверхня нагріву, наявність обертання ротора (зниження економічності), нерівномірність зазору між лопатками та корпусом [21].

Переваги випарного апарата з примусовою циркуляцією: високий коефіцієнт теплопередачі, відсутність забруднення поверхні теплообміну, також їх можна використовувати при роботі з малою різницею температур між гріючою парою та розчином і при випарюванні розчинів з великою в'язкістю, циркуляція природним способом яких є складною. Недоліки цих апаратів – необхідність електроенергії для роботи насосу [33].

Зважаючи на всі переваги та недоліки розглянутих апаратів пропоную обрати роторно-плівковий випарювач.

У роторно-плівковому випарному апараті очищена рідина, яка містить еритрит, нагрівається до 90°C. Потім сконцентрований розчин поступає до охолоджуючого кристалізатора, де поступово відбувається охолодження до 4-8°C та утворення кристалів.

В якості охолоджувальних кристалізаторів розглянемо: ємнісний кристалізатор охолоджувального типу з сорочкою і мішалкою, кристалізатор барботажного типу, охолоджувальний кристалізатор зі стрічковою мішалкою [34].

Переваги ємнісного кристалізатора: невеликі розміри, можливість проводити періодичний чи безперервний процеси, здатність роботи під атмосферним тиском чи під вакуумом [34].

Недоліки кристалізатора барботажного типу: утворення шару піни над розчином та заростання насадки-барботера кристалами, які перешкоджають розподілу холодного повітря, що подається [34].

Основні недоліки кристалізатора зі стрічковою мішалкою: невисокий коефіцієнт теплопередачі, утворення відкладень солей на стінках апарату, необхідність періодичного очищення, займає багато місця [34].

Зважаючи на переваги та недоліки пропоную обрати ємнісний кристалізатор охолоджувального типу з сорочкою і мішалкою.

### ***Вибір способу виділення цільового продукту з кристалічної суспензії***

Кристали еритритолу, які випадають в осад необхідно зібрати, для цього використовують метод фільтрації. Для фільтрації невеликих об'ємів рідини використовують нутч-, друк-фільтри та ротаційно-вакуумні фільтри, а для фільтрації великих об'ємів – фільтр-преси, мішкові фільтри, барабанні вакуум-фільтри, тощо.

Переваги фільтр-пресів: 1) велика поверхня фільтрування на одиницю площі, яку займає фільтр; 2) значна рушійна сила процесу (перепад тиску); 3) можливість контролю роботи та відключення окремих плит; 4) простота та надійність експлуатації завдяки відсутності рухомих частин. До недоліків відносять: 1) ручне обслуговування; 2) недостатньо повна промивка осаду; 3) швидкий знос фільтрувальної тканини через розборку фільтру і його роботи під тиском [33].

До переваг мішкового фільтра відносять: 1) промивання осаду з меншими витратами води; 2) менший знос тканини; 3) легкість обслуговування; 4) велика продуктивність на одиницю фільтрувальної поверхні внаслідок швидшого збирання фільтра, промивки та вивантаження осаду. Недоліками є: 1) складність виготовлення та висока вартість; 2) складність контролю кінцевої товщини осаду на елементах; 3) недостатнє перемішування суспензії (лише шляхом її рециркуляції), внаслідок цього при великій концентрації твердої фази в суспензії осад нерівномірно відкладається, що погіршує його промивання; 4) складність заміни фільтрувальної тканини [33].

Переваги барабанного вакуум-фільтра: 1) універсальність (підходить для обробки різноманітних суспензій); 2) можливість виготовлення із матеріалів, стійких до агресивних середовищ; 3) легкість обслуговування. До недоліків відносять: 1) невелика площа фільтрування та висока собівартість; 2) складність ретельної промивки та сушки осаду; 3) розподільна головка

віддалена від фільтрувальної поверхні, що призводить до затримки фільтрату та промивних вод всередині барабану і ускладнює їх окреме виведення [33].

Пропоную обрати фільтр-прес, деякі його недоліки можна виправити обравши напівавтоматичні чи автоматичні моделі з автоматичним вивантаженням осаду та регенерацією фільтрувальної тканини. Після вивантаження кристалів еритритолу їх промивають водою, в деяких фільтр-пресах фільтрування супроводжується промиванням осаду.

### ***Вибір способу сушіння та сушарки***

Для сушіння кристалів еритриту використовують сушильні апарати з конвективним способом підводу тепла. Для сушіння цукру, кристали якого близькі за розміром до кристалів еритриту використовують барабанні сушарки. Також для сушіння кристалічних продуктів застосовують періодично діючі – камерні та безперервно діючі – барабанні, конвеєрні стрічкові, інші.

Барабанні сушарки забезпечують глибоке висушування сипучих матеріалів через постійний обертальний рух барабану, але є громіздкими та металоємким. Також варто зауважити, що температура теплоносія на вході – 90-95°C, на виході – 60-65°C, температура продукту – 30-40°C, а при сушінні еритритолу необхідно підтримувати 80°C .

Конвеєрні стрічкові сушарки є громіздкими та метало- і енергоємними, але існують компактні варіанти, які не займають багато місця, також вони мають велику продуктивність, легкі в обслуговуванні, можуть забезпечити сушіння великого об'єму продукту, мають декілька зон сушіння, які можна регулювати.

Камерні сушарки дають змогу підтримувати постійну температуру в камері, рівномірно прогрівати весь робочий об'єм камери, мають просту будову. До недоліків можна віднести періодичність їх роботи, витрати тепла на прогрівання камери після циклу вивантаження-завантаження та складність завантаження/вивантаження великих об'ємів продукту [21, 31].

Зважаючи на вище зазначені переваги та недоліки для сушіння еритритолу варто обрати конвеєрну стрічкову сушарку.

### **5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення еритритолу**

*Характеристика іонообмінних смол.* Як згадувалося вище в іонному обміні приймають участь три різновиди смол:

1) сильноокисла катіонообмінна смола ("Diaion SK1B, H type" produced by Mitsubishi Kasei Corp.) - високопористий сильноокислий катіоніт, що має в якості функціональної групи сульфокислоти, також має вищі перехресні зв'язки та контактуючу площу поверхні. Широко застосовується в технологічних процесах, таких як безводна каталітична реакція або видалення катіону з неполярного розчинника, і в якості каталізаторів для пришвидшення реакції очищення [35, 36]. За її допомогою із фільтрату видаляються катіони  $\text{Cu}^{2+}$  та  $\text{Mn}^{2+}$  та замінюються на іони водню;

2) слаболужна аніонообмінна смола ("Diaion WA 30, OH type") – це високопористий слаболужний аніоніт, що має третинний амін в якості функціональної групи з високою ефективністю регенерації. Широко застосовується, особливо в галузі видалення органічних речовин, попередньої обробки сирих вод, що містять органічні забруднення, деіонізації та знебарвленні гідролізатів крохмалю [35, 37]. За її допомогою видаляються залишки поживного середовища – глюкози і кукурудзяного борошна;

3) сильноокисла катіонообмінна ("Diaion SK1B, H type") та сильнолужна аніонообмінна смола ("Diaion PA 408, OH type") - це сильно пористий тип сильнолужної аніонообмінної смоли II типу (диметилетанол амонійні групи), що має 4% перехресних зв'язків. Широко застосовується, особливо у галузі демінералізації та знебарвлення цукрових лікерів [38]. За її допомогою видаляються аніони  $\text{SO}_4^{2-}$  замінюються на  $\text{OH}^-$ .

*Підготовка іонообмінних смол та активованого вугілля.* Для іонообмінних колонок смоли готують динамічним способом. Катіоні смоли підготовлюють наступним чином: спочатку їх заливають п'ятикратним

об'ємом насиченого розчину хлориду натрію і залишають на добу для набухання, після цього декантують рідину та заливають смоли 1 М розчином NaOH та залишають на 2-3 години для вимивання мінеральних домішок. Оброблену лугом катіону смолу переносять до хроматографічної колонки, через колонку пропускають 2М HCl до повного витіснення із смоли іонів Fe<sup>3+</sup>. В кінці промивають катіону смолу водою для позбавлення від надлишку кислоти.

Підготовка аніонообмінних смол відрізняється лише послідовністю її обробки лугом та кислотою. Спочатку оброблюють 2М розчином HCl, а потім 1М NaOH [39].

Активоване вугілля заливають 2М розчином HCl та кип'ятять 2-3 години. Якщо розчин кислоти зафарбовується, операцію повторюють. Потім вугілля промивають дистильованою водою до нейтральної реакції та додають 1М розчин NaOH, дають настоятися 8-10 годин. Операцію повторюють, якщо розчин забарвився. Очищене активоване вугілля промивають та зберігають у тарі з дистильованою водою до 6 місяців [40].

**Підготовка теплоносія для сушарки.** Джерелом тепла для сушарки може слугувати паливо (мазут, природний газ), пар, гаряча вода та електроенергія. В конвеєрних стрічкових сушарках теплоносієм є повітря, яке забирається з атмосфери, фільтрується, нагрівається в калорифері до температури сушіння та проходить над поверхнею матеріалу, що висушується. Частина відпрацьованого повітря може змішуватися з чистим повітрям та знову подаватися до сушарки.

#### **5.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях**

Вихідні дані для підбору технологічного обладнання:

- a. об'єм культуральної рідини з однієї ферментації -  $V_{кр} = 7,66 \text{ м}^3$ ;
- b. концентрація цільового продукту у КР  $C_{ант} = 245 \text{ г/л}$  ( $=245 \text{ кг/м}^3$ )
- c. концентрація біомаси у КР  $C_{БМ} = 25,2 \text{ г/л}$  ( $=25,2 \text{ кг/м}^3$ ) – АСБ,

d. втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 32,8%: початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає  $7,66 \text{ м}^3 \times 245 \text{ кг/м}^3 = 1876,7 \text{ кг}$ ; кінцева кількість (з урахуванням 32,8% втрат) має становити 1261,1 кг.

Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці 5.3.

## Підбір обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (разом 32,8%)	Вийшло	
<b>ТП 9. Зберігання культуральної рідини</b>						
1	ТП 9. Зберігання культуральної рідини	КР	7,66 м <sup>3</sup> (7660 л)	-	7,66 м <sup>3</sup> (7660 л)	Збірник КР об'ємом 8 м <sup>3</sup>
<b>ТП 10. Відділення біомаси</b>						
2	ТП 10.1. Сепарування культуральної рідини	Супернатант	7,66 м <sup>3</sup>	0,84 м <sup>3</sup> (11%)	6,82 м <sup>3</sup>	Сепаратор потужністю 10 м <sup>3</sup> /год (розрахунок на 41 хв роботи)
		Біомаса			193 кг (7,66 м <sup>3</sup> × 25,2 кг/м <sup>3</sup> )	Ємність для біомаси об'ємом 1 м <sup>3</sup>
<b>ТП 11. Виділення і очищення еритритолу</b>						
3	ТП 11.1 – ТП 11.3. Іонообмінна хроматографія	Супернатант	6,82 м <sup>3</sup>	-	-	Збірник супернатанту об'ємом 8 м <sup>3</sup>
		Демінералізований супернатант	-	0,14 м <sup>3</sup> (2%)	6,68 м <sup>3</sup>	Колонки об'ємом 1116 л
4	ТП 11.4. Очищення та знебарвлення на колонці з активованим вугіллям	Очищений супернатант	6,68 м <sup>3</sup>	0,08 м <sup>3</sup> (1%)	6,6 м <sup>3</sup>	Збірник очищеного супернатанту об'ємом 8 м <sup>3</sup>

<b>ТП 12. Концентрування та кристалізація</b>						
5	ТП 12.1 Концентрування (ступінь концентрування $K_k=3$ )	Очищений супернатант	6,6 м <sup>3</sup>	-	-	Роторно-плівковий випарний апарат продуктивністю 450 кг/год
		Концентрат	2,2 м <sup>3</sup> (6,6/3)	0,066 м <sup>3</sup> (3%)	2,134 м <sup>3</sup>	Одразу подається до кристалізатора
6	ТП 12.2. Кристалізація	Кристалічна суспензія	-	0,034 м <sup>3</sup> (1,6%)	2,1 м <sup>3</sup>	Кристалізатор об'ємом 5м <sup>3</sup>
<b>ТП 13. Виділення кристалів еритритолу</b>						
7	ТП 13.1. Відділення кристалів еритритолу на автоматичному фільтр-пресі	Кристалічна суспензія	2,1 м <sup>3</sup>	-	-	
		Фільтрат	-	0,1 м <sup>3</sup> (2%)	2 м <sup>3</sup>	Збірник фільтрату об'ємом 2,5 м <sup>3</sup>
		Вологий кристалічний осад	-	-	1376,9 кг	Автоматичний фільтр-прес з об'ємом камери 1,7 м <sup>3</sup>
<b>ТП 14. Сушіння кристалів</b>						
8	ТП 14.1. Сушіння в конвеєрній стрічковій сушарці	Вологий кристалічний осад	З урахуванням 4,3% вологи – 1436,1 кг (1376,9+4,3%)	-	-	
		Висушені кристали (вологість 3-5%)	-	172,3 кг (12%)	1263,7 кг	Конвеєрна стрічкова сушарка

<b>ТП 15. Пакування, маркування, відвантаження</b>						
9	ПМВ 15.1. Фасування, пакування, маркування еритритолу у дой-пак крафт пакети	Висушені кристали (вологість 3-5%)	1263,7 кг	-	-	Бін об'ємом 1 м <sup>3</sup>
		Упакований у дой-пак крафт пакети еритрит	-	2,6 кг (0,2%)	1261,1 кг	Фасувальна машина продуктивністю до 600-1200 уп/год

**РОЗДІЛ 6**  
**СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ**

Таблиця 6.1

**Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт, виробничого біосинтезу та виділення і очищення еритритолу**

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1 ПЗ-2	Повітрозбірник	2	Вентиляційна шахта Lindab. Матеріал – нержавіюча сталь. Продуктивність до 30000 м <sup>3</sup> /год. <a href="https://alpix.com.ua/catalog/lindab/vozdukhoraspredelenie-i-regulirovanie-vozdukha/ventilyatsionnye-shakhty/pryamougolnye-ventilyatsionnye-shakhty-sp/">https://alpix.com.ua/catalog/lindab/vozdukhoraspredelenie-i-regulirovanie-vozdukha/ventilyatsionnye-shakhty/pryamougolnye-ventilyatsionnye-shakhty-sp/</a>
Ф-3 Ф-4	Фільтр попередньої очистки повітря	1	Фільтр марки ФВП-3, фільтруючий матеріал – металева сітка, Е – 65-80 %. <a href="https://electrovent.ru/ventilyaciya/filtry-dlya-ventilyacii/filtry-gruboj-ochistki/filtr-vozdushnyj-panelnyj-fvp-3/">https://electrovent.ru/ventilyaciya/filtry-dlya-ventilyacii/filtry-gruboj-ochistki/filtr-vozdushnyj-panelnyj-fvp-3/</a>
К-5	Компресор	1	Компресор ЛІДЕР ВК 20 ЕС. Потужність 2,4 м <sup>3</sup> /хв. Робочий тиск до 15 МПа. <a href="https://xkz.com.ua/p1196991913-kompressor-vintovoj-lider.html?utm_source=google_xkz&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_campaign=cid_11567835790&amp;utm_target=&amp;utm_group=gid_114414696202&amp;utm_content=aid_478017924932&amp;placement=&amp;utm_term">https://xkz.com.ua/p1196991913-kompressor-vintovoj-lider.html?utm_source=google_xkz&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_campaign=cid_11567835790&amp;utm_target=&amp;utm_group=gid_114414696202&amp;utm_content=aid_478017924932&amp;placement=&amp;utm_term</a>
Т-6	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник WHE 2050. Потужність 190л/хв. Робочий тиск до 2,5 МПа. <a href="http://paskal.ua/ua/product/teploobmenik-whe-2050_172.html">http://paskal.ua/ua/product/teploobmenik-whe-2050_172.html</a>
Р-7	Ресивер	1	Ресивер РВ 250 Центррезервуарсервис (Україна). Об'єм 250 л, номінальний тиск 8 МПа. <a href="https://rezervuary.com/p1250221900-vozduhosbornik-resiver-vozdushnyj.html">https://rezervuary.com/p1250221900-vozduhosbornik-resiver-vozdushnyj.html</a>
Т-8	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник SS300100А-Р, виготовлений з алюмінію. Потужність 35-140 л/хв. Робочий тиск 2,5-3,5 МПа. <a href="https://skr-hydraulic.com.ua/ru/vozdushnyy-teploobmennik-ss100100a-p-5-40-lmincopy-3-item?gclid=CjwKCAiAqJn9BRB0EiwAJ1SztQj4KVBe5M7zFgqaTZ-ivmorW0mNOx6ecqQocFtUINGbo6wVidf6QxoCCHUQAvD_BwE">https://skr-hydraulic.com.ua/ru/vozdushnyy-teploobmennik-ss100100a-p-5-40-lmincopy-3-item?gclid=CjwKCAiAqJn9BRB0EiwAJ1SztQj4KVBe5M7zFgqaTZ-ivmorW0mNOx6ecqQocFtUINGbo6wVidf6QxoCCHUQAvD_BwE</a>

НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Лозіна В.С.			
Перевір.	Красінко В.О.			
Консультант				
Н. Контр.				
Затверд.	Пирог Т.П.			
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання			Літера	Аркуш
				60
			Кафедра БТМ	
			Аркуші	121

Ф-9	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр марки ФЯС, фільтруючий матеріал – скловолокну пропускна здатність 2440 м <sup>3</sup> /год, Е – 90-95 %. <a href="https://lazerps.ru/uslugi/filtry/filtry-fyas/">https://lazerps.ru/uslugi/filtry/filtry-fyas/</a>
Ф-10 Ф-11 Ф-12 Ф-13	Фільтр тонкої очистки	5	Фільтр ВІО-Х ІІ, фільтруючий матеріал – волокна боросилікатного скла, матеріал корпусу – нержавіюча сталь, Е – 99,995%. <a href="https://air-part.ru/product/filtr-dlja-gazov-bio-x-ii/">https://air-part.ru/product/filtr-dlja-gazov-bio-x-ii/</a>
Р-14	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчину глюкози для підживлення	1	Реактор-змішувач «Красный Октябрь»; робочий об'єм 6,3 м <sup>3</sup> ; габаритні розміри (мм): d=1800, h=4800; оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм – лопатевою мішалкою, швидкість перемішування 100 об./хв; матеріал – нержавіюча сталь. <a href="https://tdredoctober.com/catalog/vertikalnye-mehanicheckie-meshalki/lopastnaja-meshalka-v25-63-m3.html">https://tdredoctober.com/catalog/vertikalnye-mehanicheckie-meshalki/lopastnaja-meshalka-v25-63-m3.html</a>
Р-15	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації глюкози та кукурудзяного борошна	1	Реактор-змішувач робочим об'ємом 5 л; габаритні розміри (мм): d=400, h=940; оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм – турбінною мішалкою, швидкість перемішування 25-2500 об./хв; матеріал - сталь AISI 316L. <a href="https://promvit.com.ua/laboratornyj-reaktor-so-vstroennym-gomogenizatorom-pod-davleniem-10-bar/">https://promvit.com.ua/laboratornyj-reaktor-so-vstroennym-gomogenizatorom-pod-davleniem-10-bar/</a>
Н-16 Н-17 Н-18 Н-19 Н-20 Н-21 Н-22 Н-23 Н-24 Н-25 Н-26 Н-27	Насос відцентровий	12	Насос відцентровий з магнітною муфтою DM 06 (Італія), продуктивність 0,5 – 6,5 м <sup>3</sup> /год. <a href="#">Герметичний насос з магнітною муфтою DM 06   DEBEM (Італія)</a>

ФР-28	Ферментер (інокулятор) об'ємом 0,01 м <sup>3</sup>	1	Ферментер, робочим об'ємом 10 л, габаритні розміри (мм): d=250; h=800; корпус – нержавіюча сталь 316L; обладнаний сорочкою та перемішувачем – турбінною мішалкою зі швидкість перемішування 25-1200 об./хв. Апарат обладнаний датчиками контролю температури, рівня рН, концентрації CO <sub>2</sub> та розчиненого кисню. <a href="http://biofermenter.ru/pilotnyye-i-promyshlennyye-fermentery-i-bioreaktory-ot-10-do-15000-l">http://biofermenter.ru/pilotnyye-i-promyshlennyye-fermentery-i-bioreaktory-ot-10-do-15000-l</a>
Р-29	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації глюкози та кукурудзяного борошна	1	Реактор-змішувач РСМ-50, робочим об'ємом 50 л; габаритні розміри (мм): d=655, h=1275; оснащений сорочкою та перемішувачем – лопатевою мішалкою зі швидкістю перемішування до 300 об./хв. Матеріал – сталь AISI 316L. <a href="http://promvit.ru/reaktor-mobilnyj-rsm-50-dlya-prigotovleniya-rastvorov/">http://promvit.ru/reaktor-mobilnyj-rsm-50-dlya-prigotovleniya-rastvorov/</a>
ФР-30	Ферментер (посівний апарат) об'ємом 0,1 м <sup>3</sup>	1	Ферментер РФ-100. Робочий об'єм 100 л; габаритні розміри (мм): d=700, h=1600; корпус – сталь AISI 316L; перемішувач – турбінна мішалка зі швидкістю перемішування 200-500 об./хв, апарат обладнаний сорочкою та датчиками для контролю температури, тиску, рівня рН. <a href="https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rabochim-obemom-100-l/">https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rabochim-obemom-100-l/</a>
Р-31	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації глюкози та кукурудзяного борошна	1	Реактор-змішувач РВ – 0,5; робочим об'ємом 500 л; габаритні розміри (мм): d=1185, h=2385; оснащений сорочкою та перемішувачем – рамною мішалкою зі скребком, швидкість перемішування 100 об./хв, матеріал – сталь AISI 316L. <a href="https://www.stroy-union.ru/i_store/item_517262/smesiteli-reaktory-tihohodnaya-meshalka.html">https://www.stroy-union.ru/i_store/item_517262/smesiteli-reaktory-tihohodnaya-meshalka.html</a>
Р-32	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації мідного	1	Реактор-змішувач робочим об'ємом 15 л; габаритні розміри (мм): d=380, h=500; оснащений сорочкою та перемішувачем – пропелерною мішалкою, швидкість

	купоросу та сульфату марганцю (II)тетрагідрату		перемішування до 200 об./хв; матеріал - сталь AISI 316L. <a href="https://khimmix.ua/himicheskie-reaktory/laboratornyj-reaktor-15-1">https://khimmix.ua/himicheskie-reaktory/laboratornyj-reaktor-15-1</a>
ФР-33	Ферментер (посівний апарат) об'ємом 1 м <sup>3</sup>	1	Ферментер Sysbiotech.; робочий об'єм 1 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): d=1000, h=2000; оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою, швидкість перемішування до 1500 об./хв; матеріал – нержавіюча сталь 316L; апарат обладнаний датчиками рівня, піни, температури, рівня рН, концентрації розчиненого кисню. <a href="https://en.sysbiotech.at/industrial-scale-bioreactor-500-1000/">https://en.sysbiotech.at/industrial-scale-bioreactor-500-1000/</a>
Р-34	Реактор-змішувач для УБС	1	Реактор-змішувач «Красный Октябрь»; робочий об'єм 6,3 м <sup>3</sup> ; габаритні розміри (мм): d=1800, h=4800; оснащений сорочкою та перемішувачим пристроєм – лопатевою мішалкою, швидкість перемішування 100 об./хв; матеріал – нержавіюча сталь. <a href="https://tdredoctober.com/catalog/vertikalnye-mehhanicheskie-meshalki/lopastnaja-meshalka-v25-63-m3.html">https://tdredoctober.com/catalog/vertikalnye-mehhanicheskie-meshalki/lopastnaja-meshalka-v25-63-m3.html</a>
УБС-35	Установка безперервної стерилізації 5м <sup>3</sup>	1	Стерилізаційна установка УНТ Inoxpa (Іспанія). Габаритні розміри (мм): 5000×2000×2000. Продуктивність 5 м <sup>3</sup> /год. Установка складається з реактора-змішувача, вихрового насоса, нагрівача ємнісного типу, змійового витримувача та теплообмінника-охолоджувача типу «труба в трубі». Матеріал - нержавіюча сталь AISI 316L. <a href="https://k-tep.com.ua/inoxpa-ispaniya/inoxpa-sektor/kompleksnye-resheniya-pischa/964-sterilizacionnaya-ustanovka.html">https://k-tep.com.ua/inoxpa-ispaniya/inoxpa-sektor/kompleksnye-resheniya-pischa/964-sterilizacionnaya-ustanovka.html</a>
ФР-36	Ферментер виробничий	1	Ферментер Biogus; робочий об'єм 12 м <sup>3</sup> ; габаритні розміри (мм): d=2000, h=5000; оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою, швидкість

			<p>перемішування – до 850 об/хв, матеріал – нержавіюча сталь AISI 316L; апарат оснащений датчиками температури, рівня рН, піни, концентрації розчиненого кисню та керування процесами - контролером Siemens S7-200 Smart.</p> <p><a href="https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus%C2%AE/promyishlennyye-fermenteryi.html">https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus%C2%AE/promyishlennyye-fermenteryi.html</a></p>
Зб-37	Збірник культуральної рідини	1	<p>Збірник об'ємом 8 м<sup>3</sup>, обладнаний сорочкою та перемішувачем пристроєм – турбінною мішалкою, швидкість мішалки до 300 об/хв, габаритні розміри (мм): d=2000, h=5000.</p> <p><a href="https://www.alibaba.com/product-detail/8000L-Industrial-Packed-Bed-Reactor_60796479128.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_title.7ffe3264emVeKe">https://www.alibaba.com/product-detail/8000L-Industrial-Packed-Bed-Reactor_60796479128.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_title.7ffe3264emVeKe</a></p>
СП-38	Сепаратор	1	<p>Сепаратор Flottweg AC 1000, максимальний об'єм барабана – 4 л, максимальний об'єм осаду – 1,5 л, потужність 10 000 л/год, швидкість обертання до 12 000 об/хв.</p> <p><a href="https://www.flottweg.com/fileadmin/user_upload/data/pdf-downloads/Separator-RU.pdf">https://www.flottweg.com/fileadmin/user_upload/data/pdf-downloads/Separator-RU.pdf</a></p>
Є-39	Ємність для біомаси	1	<p>Ємність вертикальна з робочим об'ємом 1 м<sup>3</sup>, матеріал – пластик тришаровий, габаритні розміри (см): d=107, h=128.</p> <p><a href="https://europlast.ua/emkost-vertikalnaya-trekhslojnaya-sinyaya-1000-litrov">https://europlast.ua/emkost-vertikalnaya-trekhslojnaya-sinyaya-1000-litrov</a></p>
Зб-40	Збірник супернатанту	1	<p>Збірник із нержавіючої сталі з сорочкою, робочий об'єм – 8 м<sup>3</sup>, габаритні розміри (мм): d=2000, h=5000, робочий тиск 0,3 МПа або залишковий не нижче 0,04 МПа.</p> <p><a href="https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-nerzhavayushchiy/584.html">https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-nerzhavayushchiy/584.html</a></p>

К-41 К-42 К-43 К-44	Колонки	4	Колонки 4872 Wave Cyber закритого типу, габаритні розміри (мм): $h = 2225$ , $d = 1227$ , об'єм корпусу – 1675 л, об'єм заправки – 1116 л, робоча температура – 4-49°C, максимальний робочий тиск – 10 атм. <a href="https://prom.ua/p885826434-korpus-filtra-48h72.html?&amp;primelead=OS4yMQ">https://prom.ua/p885826434-korpus-filtra-48h72.html?&amp;primelead=OS4yMQ</a>
Зб-45	Збірник очищеного супернатанту	1	Збірник із нержавіючої сталі з сорочкою, робочий об'єм – 8 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): $d=2000$ , $h=5000$ , робочий тиск 0,3 МПа або залишковий не нижче 0,04 МПа. <a href="https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-nerzhaveyushchiy/584.html">https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-nerzhaveyushchiy/584.html</a>
РПВ-46	Роторно-плівковий випарний апарат	1	Роторно-плівковий випарний апарат працюючий при атмосферному тиску, максимальна площа – 3 м <sup>2</sup> , продуктивність – 450 кг/год, тиск гріючої пари – 7 кг/см <sup>3</sup> , витрати гріючої пари – 500 кг/год. <a href="https://www.oborud.info/product/jump.php?13927&amp;c=619">https://www.oborud.info/product/jump.php?13927&amp;c=619</a>
Кр-47	Кристалізатор	1	Ємнісний охолоджуючий вакуум-кристалізатор GLFJ-50 з сорочкою та мішалкою, робочий об'єм – 5000 л, робочий тиск – 0,05-0,4 МПа <a href="https://www.alibaba.com/product-detail/Industrial-crystallization-tank-evaporative-crystallizer-Vacuum_60757855663.html?spm=a2700.details.0.0.23de22c6BQjXDN">https://www.alibaba.com/product-detail/Industrial-crystallization-tank-evaporative-crystallizer-Vacuum_60757855663.html?spm=a2700.details.0.0.23de22c6BQjXDN</a>
ФП-48	Автоматичний фільтр-прес	1	Фільтр-прес «Прогресс-КМПМ», площа поверхні фільтрування – 12,5-196 м <sup>2</sup> , вміст твердої фази в суспензії – 50-1200 кг/м <sup>3</sup> , допустима товщина осаду – 10-40 мм, температура суспензії для фільтрування – 5-80°C. <a href="http://www.pke.kz/cms/uploads/files/kmpm.pdf">http://www.pke.kz/cms/uploads/files/kmpm.pdf</a>
Зб-49	Збірник фільтрату	1	Збірник робочим об'ємом 2500 л, габаритні розміри (мм): $h = 2625$ , $d = 1400$ , матеріал – нержавіюча сталь AISI 316 L. <a href="https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-nerzhaveyushchiy/583.html">https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-nerzhaveyushchiy/583.html</a>

Кл-50	Калорифер	1	Калорифер ВВП 113-202-02 (2-06), продуктивність 2500 м <sup>3</sup> /год, робочий тиск не більше 1,2 МПа. <a href="https://ventsistema.net/products/kalorifer-vnp-teplonositel-par/#product_description_tab">https://ventsistema.net/products/kalorifer-vnp-teplonositel-par/#product_description_tab</a>
С-51	Конвеєрна стрічкова сушарка	1	Конвеєрна стрічкова сушарка П/Т5-1, температура в робочій зоні: 0-250°C, ширина конвеєрної стрічки – 620 мм, швидкість руху конвеєрної стрічки (м/хв) – регульована, навантаження на 1 м стрічки – не більше 120 кг, розмір робочої камери (мм): 700×5000×320. <a href="https://ua.all.biz/uk/susharka-konveerna-g8161966">https://ua.all.biz/uk/susharka-konveerna-g8161966</a>
Є-52	Ємність для висушених кристалів	1	Бін L1000, об'ємом 1000 л, матеріал – нержавіюча сталь AISI 316/304, габаритні розміри (мм): h = 1586, d = 510. <a href="https://inoxpharm.ru/katalog-produkczii/farm-biny/seria-l.html">https://inoxpharm.ru/katalog-produkczii/farm-biny/seria-l.html</a>
ПК-53	Підйомна колона	1	Підйомна колона вантажопідйомністю до 1000 кг з функціями обертання навколо вертикальної та горизонтальної осі, максимальна висота підйому 2 м, матеріал – нержавіюча сталь AISI 316. <a href="https://promvit.com.ua/farmaceuticheskaya-kolonna-podemnaya-gruzopodemnostyu-500-kg-do-1000-kg/">https://promvit.com.ua/farmaceuticheskaya-kolonna-podemnaya-gruzopodemnostyu-500-kg-do-1000-kg/</a>
ФМ-54	Фасувальна машина	1	Автомат для фасування в дой-пак крафт зір-пакет з ваговим дозатором АФ-35-Д-В, допустимі межі дозування – 50-1500 г, продуктивність – до 600-1200 уп/год, місткість магазину пакетів – 250-300 шт. <a href="https://packtech.com.ua/oborudovanie/fasovochnoe/avtomaty-poluavtomaty-serii-doj-pak/af-35-dpom">https://packtech.com.ua/oborudovanie/fasovochnoe/avtomaty-poluavtomaty-serii-doj-pak/af-35-dpom</a>

**РОЗДІЛ 7**  
**ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА**  
**ЕРИТРИТОЛУ**

Технологічна схема біосинтезу та виділення і очищення еритритолу включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування і стерилізація поживних середовищ та розчину глюкози для підживлення, підготовка смол для іонообмінної хроматографії та підготовка активованого вугілля, а також підготовка теплоносія для сушарки) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, біосинтез цільового продукту, відділення біомаси, очищення супернатанту, концентрування та кристалізація, виділення кристалів еритритолу та їх сушіння, а також пакування, маркування та відвантаження). Технологічну схему біосинтезу наведено у графічній частині.

***ДР 1. Підготовка аераційного повітря***

Для забезпечення оптимальних умов росту мікроорганізму необхідною умовою є підтримання концентрації розчиненого кисню в середовищі близько 30%. Тому у процесі культивування та виробничого біосинтезу культура дріжджів *P. tsukubaensis* KN 75 аерується стерильним повітрям.

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

Оскільки найбільша кількість мікроорганізмів, пилу, комах та тварин знаходиться біля поверхні землі, а з висотою їх концентрація зменшується, то забір повітря роблять на висоті близько 2-3 м над рівнем даху будівлі за допомогою повітрозбірника (ПЗ-1).

***ДР 1.2. Попередня очистка повітря***

На цій стадії відбувається попереднє очищення повітря від грубих часточок пилу ( $E = 65-80\%$ ) за допомогою стільникового фільтра з дрібнопористою металевою сіткою (Ф-3).

***ДР 1.3. Стиснення повітря***

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Лозіна В.Є.			РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми виробництва еритритолу	Літера	Аркуш	Аркушів
Перевір.		Красінько В.О.					67	121
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Для стиснення та нагнітання повітря використовують компресор (**К-5**), щоб у процесі культивування забезпечити подачу повітря через всю систему очищення у ферментери й щоб підтримувався надлишковий тиск 0,01-0,03 МПа.

#### *ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи*

За допомогою компресора (**К-5**) повітря подається до теплообмінника (**Т-6**) де охолоджується до температури 25°C. Потім у ресивері (**Р-7**) відбувається стабілізація вологості повітря  $W=60-70\%$ .

#### *ДР 1.5. Нагрівання повітря*

В теплообміннику (**Т-8**) повітря нагрівається до температури вищої від температури культивування на 5-10°C, тобто до 39-44°C, з вологістю 40-50%.

#### *ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі*

Подальше очищення повітря відбувається в фільтрі грубого очищення (**Ф-9**) зі скловолокна. Ступінь очищення повітря  $E = 90-95\%$ .

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

Для заключного очищення повітря перед ферментерами встановлюються фільтри індивідуального очищення (**Ф-10-13**) з волокон борсилікатного скла, ступінь очищення яких  $E = 99,995\%$ .

### ***ДР 2. Приготування та стерилізація розчину для підживлення***

#### *ДР 2.1. Приготування і стерилізація розчину глюкози для підживлення*

Для приготування розчину з концентрацією глюкози 321,5 г/л, необхідно зважити на технічних терезах 953,4 кг глюкози і розчинити у 2965,4 л води. Стерилізують в реакторі-змішувачі (**Р-14**) при температурі 112°C 30 хв.

### ***ДР 3. Приготування та стерилізація запасного розчину мікроелементів***

#### *ДР 3.1. Приготування та стерилізація розчину солей*

На лабораторних терезах зважують 44 мг  $MnSO_4 \times 4H_2O$  та 8,8 г  $CuSO_4 \times 5H_2O$ , переносять у мірний стакан та розчиняють у 100 мл води. Автоклавують при 131°C 40 хв.

#### ***ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ***

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

Для вирощування інокуляту потрібно приготування 0,4 л поживного середовища. Джерелом вуглецю в середовищі є глюкоза, джерелом азоту – кукурудзяне борошно. Для цієї стадії необхідно 0,36 л питної води, з них 50 мл йде на приготування запасного розчину солей.

Вміст компонентів для приготування середовища для качалочних колб наведено в *табл.7.1*.

*Таблиця 7.1*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування середовища для качалочних колб**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 0,4 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	60	24	А	0,31
Кукурудзяне борошно	15,75	6,3		
Вода		0,2797 (л)		
Конденсат		0,04 (л)		0,04

*ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних терезах зважують 6,3 г кукурудзяного борошна і поміщають в колбу на 500 мл. Борошно суспендують в холодній воді (0,2797 л), а потім поступово, на водяній бані, нагрівають до температури 70-90°C , і витримують при цій температурі протягом 20-30 хв. Потім зважують 24 г глюкози та переносять в колбу до кукурудзяного борошна і стерилізують в автоклаві при 112°C 30 хв.

*ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 0,01 м<sup>3</sup>*

Для культивування дріжджів в інокуляторі об'ємом 0,01 м<sup>3</sup> необхідно приготувати 4 л поживного середовища.

Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал об'ємом 400 мл, загальна кількість води, яку необхідно додати для приготування середовища – 3,6 л. З них 50 мл питної води йде на приготування запасного розчину солей.

Вміст компонентів для приготування середовища для інокулятора об'ємом 0,01 м<sup>3</sup> наведено в *табл. 7.2*.

*Таблиця 7.2*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування середовища для інокулятора об'ємом 0,01 м<sup>3</sup>**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 4 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	60	240	А	3,55
Кукурудзяне борошно	15,75	63		
Вода		3,247 (л)		
Конденсат		0,4 (л)		0,4

*ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних терезах зважують 63 г кукурудзяного борошна і поміщають в реактор-змішувач (Р-15) на 5 л. Борошно суспендують в холодній воді (3,247 л), а потім поступово нагрівають до температури 70-90°C, подаючи глуху пару у сорочку апарату, і витримують при цій температурі протягом 20-30 хв. Потім зважують 240 г глюкози та переносять в реактор до кукурудзяного борошна, утворений розчин самоплином переносять до інокулятора (ФР-28) і стерилізують при 112°C 30 хв.

*ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для посівного апарату об'ємом 0,1 м<sup>3</sup>*

Для культивування дріжджів в посівному апараті необхідно приготувати 40,4 л поживного середовища. Загальна кількість води, яку необхідно додати – 36,36 л.

Вміст компонентів для приготування середовища для посівного апарата об'ємом 0,1 м<sup>3</sup> наведено в *табл. 7.3*.

*Таблиця 7.3*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування середовища для посівного апарату об'ємом 0,1 м<sup>3</sup>**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 40,4л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	60	2424	А	34,92
Кукурудзяне борошно	15,75	636		
Вода		31,86 (л)		
Конденсат		4 (л)		4
MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O	0,01	0,40	Б	1,08
CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	2	80,8		
Вода		1 (л)		
Конденсат		0,4 (л)		0,4

*ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних терезах зважують 636 г кукурудзяного борошна і поміщають у реактор-змішувач (**Р-29**). Борошно суспендують в холодній воді (31,86 л), а потім поступово нагрівають до температури 70-90°C, подаючи глуху пару в сорочку апарату, і витримують при цій температурі протягом 20-30 хв. Потім зважують 2424 г глюкози та переносять до кукурудзяного борошна, утворений розчин самоплином передають до посівного апарату (**ФР-30**) і стерилізують при 112°C 30 хв.

*ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

Потрібно приготувати розчин мікроелементів, для цього зважують 0,4 г MnSO<sub>4</sub>×4H<sub>2</sub>O та 80,8 г CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O, переносять у плоскодонну колбу об'ємом 2 л та додають 1 л питної води, перемішують до повного розчинення компонентів. Після цього солі стерилізують в автоклаві при 131°C 40 хв.

*ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для посівного апарату об'ємом 1 м<sup>3</sup>*

Для культивування дріжджів в посівному апараті об'ємом 1 м<sup>3</sup> необхідно приготувати 400 л поживного середовища. Загальна кількість води, яку необхідно додати – 360 л.

Вміст компонентів для приготування середовища для посівного апарату об'ємом 1 м<sup>3</sup> наведено в *табл. 7.4*.

*Таблиця 7.4*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування середовища для посівного апарату об'ємом 1 м<sup>3</sup>**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 400л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	60	24 кг	А	349,2
Кукурудзяне борошно	15,75	6,3 кг		
Вода		318,9 (л)		
Конденсат		38 (л)		38
MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O	0,01	4	Б	10,8
CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	2	800		
Вода		10 (л)		
Конденсат		2 (л)		2

*ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних терезах зважують 6,3 кг кукурудзяного борошна і поміщають в реактор-змішувач (**Р-31**). Борошно суспендують в холодній воді (318,9 л), а потім поступово нагрівають до температури 70-90°C, подаючи глуху пару в сорочку апарату, і витримують при цій температурі протягом 20-30 хв. Потім зважують 24 кг глюкози та переносять до кукурудзяного борошна і стерилізують при 112°C 30 хв.

*ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

Потрібно приготувати розчин мікроелементів, для цього зважують 4 г MnSO<sub>4</sub>×4H<sub>2</sub>O та 800 г CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O, переносять у реактор-змішувач (**Р-32**) об'ємом 15 л, додають 10 л питної води та вмикають перемішувачий пристрій

до повного розчинення компонентів. Отриманий розчин самоплином переносять до посівного апарата (**ФР-33**) та стерилізують при 131°C 40 хв.

*ДР 4.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 12 м<sup>3</sup>*

Для культивування дріжджів в ферментері об'ємом 8 м<sup>3</sup> необхідно приготувати 4,3 м<sup>3</sup> поживного середовища. Загальна кількість води, яку необхідно додати – 3870 л.

Хоча стерилізація поживного середовища буде відбуватися в УБС-5, необхідно попередньо заварити борошно у реакторі-змішувачі (**Р-27**) об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>, тому середовище поділяємо на композиції.

Вміст компонентів для приготування середовища для ферментеру об'ємом 12 м<sup>3</sup> наведено в *табл. 7.5*.

*Таблиця 7.5*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування середовища для ферментеру об'ємом 12 м<sup>3</sup>**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 4,3 м <sup>3</sup> середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	60	258	А	3850
Кукурудзяне борошно	15,75	67,7		
Вода		3524,3 (л)		
MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O	0,01	43 г	Б	20
CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	2	8,6		
Вода		20 (л)		
Конденсат		430 (л)		430

*ДР 4.5.1. Приготування поживного середовища для УБС*

На технічних терезах зважують 67,7 кг кукурудзяного борошна і поміщають в реактор-змішувач (**Р-34**). Борошно суспендують в холодній воді (3524,3 л), а потім поступово нагрівають до температури 70-90°C, подаючи глуху пару в сорочку апарату, і витримують при цій температурі протягом 20-30 хв. Потім зважують 258 кг глюкози та переносять до кукурудзяного

борошна. Після цього до утвореною суспензії вносять 43 г  $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$  та 8,6 кг  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , додають 20 л питної води та вмикають перемішувачий пристрій.

#### *ДР 4.5.2. Стерилізація поживного середовища в УБС*

Насосом (Н-17) нестерильне поживне середовище (від ДР 4.5.1) перекачують на стерилізацію до установки безперервної стерилізації (УБС-35), стерилізацію проводять при температурі 131°C, загальний час роботи установки становить 51,6 хв.

#### **ДР 5. Підготовка смол та активованого вугілля для колонок**

Для іонного обміну використовують три колонки заповнені наступними смолами: 1) сильнокислою катіонообмінною (720,42 л), 2) слаболужною аніонообмінною (720,42 л), 3) сильнокислою катіонообмінною (240,14 л) та сильнолужною аніонообмінною (480,28 л), четверта колонка заповнена активованим вугіллям (11,378 кг).

#### *ДР 5.1. Підготовка смол для іонного обміну*

Для іонообмінних колонок смоли готують динамічним способом. Катіоні смоли підготовлюють наступним чином: спочатку їх заливають п'ятикратним об'ємом насиченого розчину хлориду натрію і залишають на добу для набухання, після цього декантують рідину та заливають смоли 1 М розчином NaOH та залишають на 2-3 години для вимивання мінеральних домішок. Оброблену лугом катіону смолу переносять до хроматографічної колонки, через колонку пропускають 2М HCl до повного витіснення із смоли іонів  $\text{Fe}^{3+}$ . В кінці промивають катіону смолу водою для позбавлення від надлишку кислоти.

Підготовка аніонообмінних смол відрізняється лише послідовністю її обробки лугом та кислотою. Спочатку оброблюють 2М розчином HCl, а потім 1М NaOH [39].

#### *ДР 5.2 Підготовка активованого вугілля*

Активоване вугілля заливають 2М розчином HCl та кип'ятять 2-3 години. Якщо розчин кислоти зафарбовується, операцію повторюють. Потім

вугілля промивають дистильованою водою до нейтральної реакції та додають 1М розчин NaOH, дають настоятися 8-10 годин. Операцію повторюють, якщо розчин забарвився. Очищене активоване вугілля промивають та зберігають у тарі з дистильованою водою до 6 місяців [40].

## **ДР 6. Підготовка повітря для сушарки**

### *ДР 6.1 Забір атмосферного повітря*

Оскільки найбільша кількість мікроорганізмів, пилу, комах та тварин знаходиться біля поверхні землі, а з висотою їх концентрація зменшується, то забір повітря роблять на висоті близько 2-3 м над рівнем даху будівлі за допомогою повітрозбірника (ПЗ-2).

### *ДР 6.2 Попередня очистка повітря*

На цій стадії відбувається попереднє очищення повітря від грубих часточок пилу ( $E = 65-80\%$ ) за допомогою стільникового фільтра з дрібнопористою металевою сіткою (Ф-4).

### *ДР 6.3. Нагрівання повітря*

Після очищення повітря подається до калорифера (Кл-50) де воно нагрівається паром до температури 80°C та подіється до конвеєрної стрічкової сушарки (С-51).

## **ТП 7. Підготовка посівного матеріалу**

### *ТП 7.1. Підтримання колекційної культури*

Колекційну культуру *P. tsukubaensis* KN 75 зберігають в ампулах у ліофілізованому стані при 2-8°C.

### *ТП 7.2. Одержання робочої культури*

Після відкриття ампули туди вносять  $\approx 0,3$  мл поживного середовища для регідратації ((г/л): глюкоза – 10, пептон – 5, дріжджовий екстракт – 3, солодовий екстракт – 3) . Вміст ампули перемішують, переносять стерильною піпеткою в пробірку з поживним бульйоном та інкубують при 37°C протягом 18-24 год.

### *ТП 7.3. Одержання робочої культури в пробірках*

Після інкубації із поживного середовища (від *ТП 7.2*) роблять висів у пробірки з 5 мл ростового середовища ((г/100 мл): глюкоза – 20, дріжджовий екстракт – 1,  $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$  – 1 мг,  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,2) та інкубують при 30°C, 250 об/хв протягом 48 год.

#### *ТП 7.4. Вирощування культури в колбах на качалках*

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 500 мл із 270 мл композиції А (від *ДР 4.1.1*) в асептичних умовах вносять 50 мл запасного розчину мікроелементів (від *ДР 3.1*). Перемішують і розливають по 130 мл в стерильні качалочні колби об'ємом 250 мл.

В колби з розлитим поживним середовищем вносять 5 мл дріжджової суспензії (від *ТП 7.3*). Колби ставлять на качалки та інкубують при 30°C, 250 об/хв упродовж 24 год.

#### *ТП 7.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,01 м<sup>3</sup>*

Для вирощування рідкого посівного матеріалу в інокулятор (**ФР-28**) зі стерильною композицією А (від *ДР 4.2.1*), вноситься 50 мл запасного розчину мікроелементів (від *ДР 3.1*). Через засівну колбу вносять 400 мл посівного матеріалу (від *ТП 7.4*). У процесі культивування швидкість перемішування становить 500 об/хв, тривалість культивування 48 год при температурі 30°C.

#### *ТП 7.6. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 0,1 м<sup>3</sup>*

В посівний апарат (**ФР-30**) з простерилізованою композицією А (від *ДР 4.3.1*), через засівний пристрій вносять 1 л композиції Б (від *ДР 4.3.2*). Через трубу перетискування перекачують з інокулятора 4 л посівного матеріалу (від *ТП 7.5*). У процесі культивування швидкість перемішування становить 500 об/хв для підтримання концентрації розчиненого кисню більш 5%, температура 30°C, тривалість культивування 48 год.

#### *ТП 7.7. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 1 м<sup>3</sup>*

В посівний апарат (**ФР-33**) з простерилізованою композицією Б (від *ДР 4.4.2*) насосом (**Н-16**) подають з реактора-змішувача (**Р-31**) 310 л композиції А (від *ДР 4.4.1*). Через трубу перетискування перекачують з посівного апарата 40 л посівного матеріалу (від *ТП 7.6*). У процесі культивування швидкість

перемішування становить 500 об/хв для підтримання концентрації розчиненого кисню більш 5%, температура 30°C, тривалість культивування 60 год.

## **ТП 8. Біосинтез**

### *ТП 8.1. Виробниче культивування*

Виробниче культивування здійснюють у ферментері об'ємом 8 м<sup>3</sup> (**Ф-36**) з робочим об'ємом 4,7 м<sup>3</sup>. У ферментер простерилізоване середовище потрапляє з установки безперервної стерилізації (**УБС-35**) (від ДР 4.5.2). Через трубу перетискування перекачують з посівного апарата 400 л посівного матеріалу (від ТП 7.7). Під час ферментаційного процесу 6 разів, після кожних 12 год культивування, насосом (**Н-18**) перекачують 494,2 л розчину глюкози (від ДР 2.1), для підтримання концентрації глюкози на рівні 225 г/л. Культивують при температурі 34°C та рН рівним 5,5-6,0. Швидкість перемішування становить 500-800 об/хв, з постійним підтриманням концентрації розчиненого кисню на рівні 20-30% протягом 85 год.

Культивування припиняють за досягнення у культуральній рідині концентрації еритритолу та біомаси 245 та 25,2 г/л відповідно.

## **ТП 9.Зберігання культуральної рідини**

Після закінчення культивування, культуральна рідина від виробничого ферментера (**ФР-36**) насосом (**Н-19**) перекачується до збірника культуральної рідини (**ЗБ-37**) на зберігання.

## **ТП 10. Відділення біомаси**

### *ТП. 10.1. Сепарування культуральної рідини*

Для відділення біомаси 7,66 м<sup>3</sup> культуральної рідини зі збірника (**ЗБ-37**) насосом (**Н-20**) подають до сепаратора (**Сп-38**) з автоматичним вивантаженням осаду вагою 176,18 кг у ємність (**Є-39**) і відведенням 6,82 м<sup>3</sup> супернатанту у збірник (**ЗБ-40**). Тривалість сепарування 41 хв.

## **ТП 11. Виділення і очищення еритритолу**

*ТП 11.1. Іонообмінна хроматографія на сильнокислій катіонообмінній смолі "Diaion SK1B, H type"*

6,82 м<sup>3</sup> супернатанту зі збірника (ЗБ-40) насосом (Н-21) подається до іонообмінної колонки (К-41), яка попередньо завантажена підготовленою смолою (від ДР 5.1). На цій колонці відбувається видалення із супернатанту катіонів Cu<sup>2+</sup> і Mn<sup>2+</sup> та їх заміна на іони водню.

*ТП 11.2. Іонообмінна хроматографія на слаболужній аніонообмінній смолі "Diaion WA 30, OH type"*

Від колонки (К-41) насосом (Н-22) розчин перекачується до колонки (К-42), яка попередньо завантажена підготовленою смолою (від ДР 5.1). На цій колонці відбувається видалення залишків поживного середовища – глюкози і кукурудзяного борошна.

*ТП 11.3. Іонообмінна хроматографія на сильноокислій катіонообмінній смолі "Diaion SKIB, H type" та сильнолужній аніонообмінній смолі "Diaion PA 408, OH type"*

Від колонки (К-42) насосом (Н-23) розчин перекачується до колонки (К-43), яка попередньо завантажена підготовленою смолою (від ДР 5.1). На цій колонці відбувається видалення аніонів SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> та їх заміна на OH<sup>-</sup>.

*ТП 11.4. Очищення та знебарвлення на кінці з активованим вугіллям*

Демінералізований супернатант об'ємом 6,68 м<sup>3</sup> від останньої іонообмінної колонки (К-43) насосом (Н-24) подається до колонки (К-44) з попередньо підготованим активованим вугіллям (від ДР 5.2). Орієнтовний час роботи колонок – 56 хв. Після цього 6,6 м<sup>3</sup> очищеного супернатанту подається насосом (Н-25) до збірника очищеного супернатанту (ЗБ-45).

По закінченню процесу, крізь всі колонки пропускають знесолену воду для видалення сорбованих іонів зі смол та активованого вугілля, які після цієї операції направляються на стадію підготовки (до ДР 5).

## **ТП 12. Концентрування та кристалізація**

*ТП 12.1. Концентрування*

Зі збірника (ЗБ-45) насосом (Н-26) очищений супернатант перекачують до роторно-плівкового випарного апарату (РПВ-46). На цій стадії розчин концентрується в три рази. Температура концентрування 90°C.

### *ТП 12.2. Кристалізація*

2,134 м<sup>3</sup> концентрованого розчину від роторно-плівкового випарного апарату (**РПВ-46**) одразу спрямовується до ємнісного охолоджуючого вакуум-кристалізатора (**Кр-47**), де концентрат поступово охолоджується до 4-8°C, протягом 8 год. В процесі кристалізації утворюється 2,1 м<sup>3</sup> кристалічної суспензії.

### **ТП 13. Виділення кристалів еритритолу**

*ТП 13.1. Відділення кристалів еритритолу на автоматичному фільтр-пресі*

З кристалізатора (**Кр-47**) насосом (**Н-27**) кристалічна суспензія спрямовується до автоматичного фільтр-преса (**ФП-48**) де послідовно відбувається віджим, промивання, знову віджим, просушування та розвантаження 1376,9 кг кристалів до вбудованої ємності для осаду звідки спрямовується у бункер сушарки (**С-51**). 2 м<sup>3</sup> фільтрату, що утворюється спрямовується до збірника фільтрату (**ЗБ-49**).

### **ТП 14. Сушіння кристалів**

*ТП 14.1. Сушіння в конвеєрній стрічковій сушарці*

З вбудованої ємності фільтр-преса (**ФП-48**) надходить 1436,1 кг вологих кристалів (з вмістом води - 4,3%) на стадію сушіння, де вони потрапляють до конвеєрної стрічкової сушарки (**С-51**). Температура сушіння 80°C.

### **ТП 15. Пакування, маркування та відвантаження**

*ТП 15.1. Фасування, пакування, маркування еритритолу у дой-пак крафт пакети*

З конвеєрної стрічкової сушарки 1263,7 кг висушених кристалів еритритолу завантажують до біну (**Є-52**), який за допомогою підйомної колони (**ПК-53**) кріпиться до фасувальної машини (**ФМ-54**) продуктивністю 600-1200 уп/год, де відбувається фасування еритритолу у дой-пак крафт пакети по 200 г.

### **ТП 16. Знешкодження відходів**

*ТП 16.1. Знешкодження рідких відходів виробництва*

Рідкі відходи, що утворюються під час санітарної підготовки виробництва та промивання колонок очищуються на установці «BIOTAL-T», що складається з трьох SBR-реакторів. Очищена вода надходить в каналізаційну мережу або може бути використана в технічних цілях.

#### *ТП 16.2. Знешкодження твердих відходів виробництва*

Тверді відходи, у вигляді пакувальної тари, що утворюються на стадіях санітарної підготовки виробництва та приготування поживних середовищ і розчину для підживлення, переробляються на спеціалізованих заводах.

Біомаса, що утворюється після сепарування використовують в якості кормового білка: для цього біомасу промивають, піддають плазмолісу, упарюють та висушують.

#### *ТП 16.3. Знешкодження газоповітряних відходів виробництва*

Газоподібні відходи, що утворюються під час підготовки посівного матеріалу, біосинтезу та сушіння кристалів еритритолу містять вуглекислий газ та механічні часточки висушеного еритритолу.

Для утилізації газоповітряних відходів, що містять CO<sub>2</sub> використовують машини Climeworks, які уловлюють, зберігають, змішують діоксид вуглецю з водою та закачують глибоко під землю для перетворення у камінь внаслідок природної мінералізації.

Утилізацію газоподібних відходів після сушіння кристалів здійснюють в циклонах, де відбувається осідання механічних часточок.

## РОЗДІЛ 8

### КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ЕРИТРИТОЛУ

#### 8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 8.1

#### Карта постадійного контролю біосинтезу еритритолу

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативні значення показників
Кт 1.2 <i>Попередня очистка повітря</i>	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення повітря згідно паспорту фільтра	Після очищення повітря у фільтрі	E = 65-80%, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 <i>Стиснення повітря</i>	Ступінь стиснення повітря, температура, тиск	Технічний манометр, термометр	Після стиснення повітря	P = 0,01-0,03 МПа, t = 220-250°C
Кт 1.4 <i>Охолодження повітря та видалення вологи</i>	Охоложене повітря, температура. Повітря після видалення зайвої вологи	Технічний термометр, психрометричний метод	Температуру визначають після охолодження повітря, вологість визначають після видалення зайвої вологи	W=60-70%, t = 25°C
Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря, температура	Технічний термометр	Після нагрівання повітря	W=40-50%, t = 39-44°C
Кт 1.6 <i>Очищення повітря в головному фільтрі</i>	Очищене повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення повітря згідно паспорту фільтра	Після очищення повітря у фільтрі	E = 90-95%
Кт 1.7 <i>Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря на виході з фільтра, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення повітря згідно паспорту фільтра	Під час очищення повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,995%

НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		
Розроб.	Лозіна В.Є.					
Перевір.	Красінько В.О.					
Консультант						
Н. Контр.						
Затверд.	Пирог Т.П.					
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва еритритолу				Літера	Аркуш	Аркушів
					81	121
				Кафедра БТМ		

Кт, Км 2.1 <i>Приготування і стерилізація розчину глюкози для підживлення</i>	Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1 <i>Приготування і стерилізація розчину солей</i>	Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.1, 4.2.1, 4.3.1, 4.4.1 <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	<b>Композиція А</b> Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2, 4.4.2 <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ</i> <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	<b>Композиція Б</b> Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.5.2, <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ</i> <i>Стерилізація поживного середовища в УБС</i>	<b>Поживне середовище</b> Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 56,4 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	<b>Колекційна культура</b> <i>Pseudozyma tsukubaensis</i> <b>KN 75</b> Температура, мікробіологічна	Термометр, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 3 місяців	t = 2-8 °С, відсутність сторонньої мікробіоти

	чистота культури			
Кт, Км 7.2 <i>Одержання робочої культури</i>	<b>Колекційна культура <i>Pseudozyma Tsukubaensis</i> KN 75</b> Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термометр, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожних 8 год	t = 37 °С, τ = 18-24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 7.3 <i>Одержання робочої культури в пробірках</i>	<b>Колекційна культура <i>Pseudozyma Tsukubaensis</i> KN 75</b> Температура, тривалість вирощування, частота обертів, мікробіологічна чистота культури	Термометр, технічний годинник, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура контролюється і підтримується, швидкість обертання підтримується автоматично упродовж вирощування, мікробіологічний контроль проводять кожних 8 год	t = 30 °С, τ = 48 год, ω = 250 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 7.4 <i>Вирощування культури в колбах на качалках</i>	<b>Посівний матеріал</b> Температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури	Термометр, технічний годинник, технічний тахометр, центрифугування та сушіння, мікробіологічний контроль	Температура контролюється і підтримується, швидкість обертання підтримується автоматично упродовж вирощування, вимірювання концентрації біомаси та мікробіологічний контроль проводять кожних 8 год	t = 30 °С, τ = 24 год, ω = 250 об/хв, X <sub>біомаси</sub> = 11,5 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 7.5 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,01 м<sup>3</sup></i>	<b>Посівний матеріал</b> Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, концентрація	Термометр, технічний годинник, технічний тахометр, центрифугування та сушіння, мікробіологічний	Температура контролюється і підтримується, швидкість обертання підтримується автоматично упродовж	t = 30 °С, τ = 48 год, ω = 500 об/хв, X <sub>біомаси</sub> = 15 г/л, відсутність

	біомаси, мікробіологічна чистота культури	контроль (мікроскоп)	вирощування, вимірювання концентрації біомаси та мікробіологічний контроль проводять кожних 8 год	сторонньої мікробіоти
Кт, Км 7.6 <i>Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 0,1 м<sup>3</sup></i>	<b>Посівний матеріал</b> Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури	Термометр, технічний годинник, технічний тахометр, центрифугування та сушіння, мікробіологічний контроль (мікроскоп)	Температура контролюється і підтримується, швидкість обертання підтримується автоматично упродовж вирощування, вимірювання концентрації біомаси та мікробіологічний контроль проводять кожних 8 год	t = 30 °С, τ = 48 год, ω = 500 об/хв, X <sub>біомаси</sub> = 15 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 7.7 <i>Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 1 м<sup>3</sup></i>	<b>Посівний матеріал</b> Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури	Термометр, технічний годинник, технічний тахометр, центрифугування та сушіння, мікробіологічний контроль (мікроскоп)	Температура контролюється і підтримується, швидкість обертання підтримується автоматично упродовж вирощування, концентрацію біомаси вимірюють на 48 годину культивування, мікробіологічний контроль проводять кожних 8 год	t = 30 °С, τ = 60 год, ω = 500 об/хв, X <sub>біомаси</sub> = 17 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 8.1 <i>Виробниче культивування</i>	<b>Культуральна рідина</b> Температура, тривалість культивування, рівень рН, частота обертів мішалки,	Термометр, технічний годинник, технічний тахометр, центрифугування та сушіння,	Температура, рівень рН, концентрація розчиненого кисню контролюється і підтримується, швидкість	t = 34 °С, τ = 85 год, рН = 5,5-6,0, ω = 500 - 800 об/хв, DO = 20-30%, X <sub>біомаси</sub> = 25,2 г/л,

	концентрація біомаси, концентрація еритритолу, мікробіологічна чистота культури, концентрація еритритолу	метод ВЕРХ, мікробіологічний контроль (мікроскоп)	обертання підтримується автоматично упродовж культивування, вимірювання концентрації біомаси і еритритолу та мікробіологічний контроль проводять кожних 8 год	$S_{\text{еритритру}} = 245$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
--	--	---	---	---

## 8.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюють для контролю стерильності поживних середовищ для вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу кінцевого продукту, а також для підтвердження чистоти культуральної рідини під час біосинтезу та посівного матеріалу безпосередньо.

**Контроль стерильності поживного середовища.** Контроль здійснюють шляхом розсівання проби простерилізованого поживного середовища на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем: СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій, із подальшим інкубуванням [41].

**Виконання посівів.** Посіви здійснюють шляхом відбору 0,1 мл об'єму проби стерильною піпеткою і нанесення її на поверхню відповідних стерильних середовищ. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами поміщають у термостат за температури 32-34 °С протягом 1-2 діб для МПА та при температурі 24-26 °С протягом 3-5 діб для СА. Аналіз посівів здійснюють, починаючи з 6-8 години [41].

Відсутність мікробіоти на чашках з посівами свідчить про дотримання правильного режиму стерилізації поживних середовищ.

**Мікробіологічний контроль чистоти культури.** Здійснюється двома шляхами: прямий висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання.

Прямий висів здійснюється посівом культуральної рідини до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо–пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, та глюкозо–картопляним агаром (ГКА) або сусло–агаром (СА) – грибів та дріжджів [41].

Мікроскопіювання проводять з використанням світлового мікроскопа методом «роздавлена» крапля. На знежирене предметне скло за допомогою стерильної мікробіологічної петлі наносять краплину культуральної рідини і накривають покривним скельцем. Протилежним кінцем петлі притискають покривне скло до предметного та, за допомогою фільтрувального папера, видаляють надлишок рідини, прикладаючи папір по периметру покривного скла [42].

Під час мікроскопіювання препарату «роздавлена крапля» можна побачити клітини *P. tsukubaensis* KN-75. Клітини розміром 1,5-5 мкм, найкраще їх можна охарактеризувати як типові дріжджі. Клітини від кулеподібних до сфероїдальних форм, розташовані ланцюжками, спостерігається багатостороннє брунькування. Балістоспори не утворюють [2].

На агаризованих середовищах *P. tsukubaensis* утворюють блискучі колонії від білого до кремового кольору [2] з центральною дріжджовою частиною і субстратним та повітряним міцелієм по краю [14].

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

#### **8.3.1. Концентрація біомаси**

У стерильні пробірки для центрифугування відбирають по 10 мл (для культур вирощених в колбах на качалках), або по 20 мл (для культур вирощених в ферментерах) культуральної рідини у різні проміжки часу культивування. Відібрані проби рідини центрифугують при 5000 об/хв протягом 5 хв [43].

**Визначення концентрації абсолютно сухої біомаси.** Для визначення концентрації біомаси відцентрифуговані клітини збирають фільтруванням крізь мембрану з розміром пор 0,45 мкм, двічі промивають дистильованою водою, зважують і висушують до постійної ваги при 105°C [43].

### **8.3.2. Концентрація цільового продукту**

Відібрані проби рідини центрифугували при 3000 об/хв протягом 15 хв, потім супернатант фільтрували через 0,22 мкм целюлозно-ацетатний фільтр (Sigma F-0139) та використовували для визначення концентрації еритритолу та вмісту джерела Карбону і Нітрогену; фільтрат два рази розбавляли під прямим введенням в колонку ВЕРХ [44].

Для кількісного визначення концентрації еритритолу використовували метод високоефективної рідинної хроматографії. Принцип ВЕРХ полягає в розділенні компонентів аналізованих зразків в потоці рухомої фази за рахунок різних взаємозв'язків з сорбентами.

Для цього використовували: води ВЕРХ, як мобільну фазу: ацетонітрил (75%) та воду (25%) та культуральну рідину на різних етапах ферментації [45].

#### *Приготування стандартних розчинів*

Всі еталонні стандарти (хроматографічний сорт) були придбані у Merck або Aldrich (Олдріч, США). Стандартний розчин готували при концентрації від 100 до 300 проміле, використовуючи мобільну фазу як розчинник [45].

#### *Приготування досліджуваних зразків*

Відібрані проби рідини на різних етапах ферментації центрифугували при 3000 об/хв протягом 15 хв, потім супернатант фільтрували через 0,22 мкм целюлозно-ацетатний фільтр (Sigma F-0139), потім фільтрат два рази розбавляли під прямим введенням в колонку ВЕРХ [44].

Аналіз проводився в системі Waters 515 HPLC, оснащений насосом, ізократичною системою та детектором заломлення (RI (Waters 410)). Температура на печі колонки підтримувалася в 35°C, витрати носія 0,8 мл/хв. Хроматографічні дані були зібрані в програмному забезпеченні Empower-2. Стовпчик Ultra Amino Column (Restek) (довжина стовпчика 150 мм,

внутрішній діаметр 4.6 мм, 3.0 мкм розмір частинок, 100 Å° розмір пір). Інжектор - Rheodyne (петля 20 мкл) [45].

### **8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту**

#### ***Визначення вмісту джерела Карбону***

Для визначення концентрації глюкози було обрано метод швидкого визначення ВЕРХ з рефракційним детектором (RI) [44].

Метод ВЕРХ заснований на розподілі компонентів суміші між рухомою та нерухомою фазами, за рахунок різних взаємозв'язків з поверхнею сорбентів. Рефракційний детектор встановлюють для визначення показника заломлення аналізованої речовини по відношенню до розчинника.

#### ***Приготування стандартних розчинів***

Як стандартний розчин використовували глюкозу (Sigma Chemical, St.Louis, MO) [44].

Досліджуванні зразки готували так само, як і для визначення концентрації еритритолу.

Аналіз проводили при 60°C зі швидкістю потоку 0,6 мл/хв, використовуючи ізократичний елюент з 0,01 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> як рухливу фазу та силікагель як сорбент. Елюент фільтрували перед аналізом, використовуючи 0,22 мкм нейлонову мембрану GV (Millipore, Bedford, MA). Система ВЕРХ являла собою серію Jasco (Easton, MD) LC-800, оснащену насосом 880-PU та детектором заломлення 830-RI. Дані були отримані за допомогою хроматографічного інтегратора DP-700 (CarloErba, Мілан, Італія). Зразки були введені за допомогою клапана 7125, оснащеного 20 мкл петлею (Rheodyne, Cotati, Каліфорнія) на Aminex FOA (Bio-Rad, Richmond, CA) катіонообміннику (H<sup>+</sup>) стовпчик на основі смоли (100 × 7,8; 9 мкм) захищений стовпчиком із того ж матеріалу [44].

#### ***Визначення вмісту джерела Нітрогену***

Метод формольного титрування Серенсена використовується для визначення азоту вільних амінних груп амінокислот, пептидів і білків в препаратах, а також амінного азоту гідролізатів в поживних середовищах для

мікробіологічних аналізів. Метод заснований на захисті формальдегідом при рН 7,0 вільних аміногруп і титрування розчином луку еквівалентної кількості карбоксильних груп. Початок і кінець титрування визначають потенціометрично [46].

Реактиви: 1) натрію гідроксид (0,1 моль / л) або розчин соляної кислоти (0,1 моль / л); 2) натрію гідроксид 10% -й розчин; 3) розчин формаліну (40% -й розчин формальдегіду) [46].

У колбу об'ємом 50 мл наливають 10 мл супернатанту, що містить 1,5 - 5,0 мг амінного азоту, і доводять загальний об'єм дистильованою водою до 20 мл. Електроди потенціометра занурюють в досліджуваний розчин, рН якого доводять до значення 7,0 за допомогою розчину натрію гідроксиду (0,1 моль / л) або розчину соляної кислоти (0,1 моль / л) [46].

До нейтралізованого розчину додають 2 мл нейтрального формаліну, перемішують і, не виймаючи електроди, титрують зміст розчином натрію гідроксиду (0,1 моль / л) до рН 9,1. Проводять два паралельних вимірювання [46].

Кількісний зміст амінного азоту розраховують по формулі:

$$X = \frac{V \cdot K \cdot 1,4 \cdot 100}{A \cdot 1000}, \text{ де}$$

A - кількість зразка (мл) взятого на аналіз;

100 - коефіцієнт перерахунку міліграмів і відсотки;

1000 – коефіцієнт перерахунку міліграмів у грами [46].

#### **8.4. Показники якості готового продукту**

##### ***Визначення концентрації цільового продукту***

Для визначення концентрації цільового продукту використовують метод рідинної хроматографії.

Мобільна фаза: деіонізована вода.

##### ***Приготування стандартних та досліджуваних зразків***

Для аналізу на лабораторних терезах зважують близько 2 г стандартного еритритолу, попередньо висушеного у вакуумному ексікаторі при 70°C

продовж 6 годин, з точністю до 0,1 мг та переносять у мірну колбу об'ємом 50 мл. Еритрит розчиняють та доводять до об'єму деіонізованою водою, потім розчин перемішують та фільтрують через разовий фільтр (0,45 мкм).

Досліджуваний зразок готують так само, як і стандартний.

Для аналізу використовують рідкий хроматограф високого тиску, оснащений безімпульсним насосом з постійною витратою, та чутливим детектором диференціального показника заломлення RID-6A. Колонку заповнюють сильнодіючою катіонообмінною смолою водневої форми (MCI Gel-CK08EH, Shodex KC-811), що складається з макроретиккулярного сульфованого сополімеру полістирола та дивінілбензола, зшитого на 8%, розмір часток 9 мкм. Температура колонки 60°C. Інжектор зразку являє собою тип з фіксованою петлею (ручною або автоматичною), здатний точно вводити 30 мкл. Робоча витрата близько 0,5мл/хв. Максимальний тиск всієї системи близько 50 кгс/см<sup>2</sup>.

Спочатку хроматографують три порції по 30 мкл стандартного зразку, після цього – досліджуваного записуючи середні значення площ піків еритритолу. Процентний вміст еритритолу розраховують за формулою, %:

$$\text{Еритритол} = 100 \times (W/w) \times (a/A),$$

де W – стандартний зразок, г; w – досліджуваний зразок, г; A – середнє значення площ піків стандартного еритритолу; a - середнє значення площ піків досліджуваного еритритолу [47].

### ***Мікробіологічна чистота готового продукту***

Для перевірки на мікробіологічну чистоту використовують чашковий метод, який дозволить здійснити кількісний підрахунок мезофільних бактерій та грибів, які можуть рости в аеробних умовах.

*Приготування зразків.* Для аналізу відбирають та зважують 10 г досліджуваного еритритолу та розчиняють його в забуференому розчині хлориду натрію-пептону з рН 7,0. Зазвичай готують одне з десяти розведень.

*Глибинний метод.* В чашки Петрі діаметром 9 см вносять по 1мл досліджуваного зразка та заливають 15-20 мл рідкого агаризованого

середовища, підходящого для культивування бактерій (наприклад, казеїн-соевий гідролізований агар, CASO агар – триптиказо-соевий агар) або для культивування грибів (наприклад, середовище Сабуро) температурою не більше 45°C. Для кожного середовища готують не менше двох чашок Петрі, як і для кожного розведення. Готові чашки інкубують при температурі 30-35°C для бактерій та 20-25°C для грибів протягом 5 діб. Обирають чашки, які відповідають одному розведенню та мають найбільшу кількість колоній: 300 для бактерій та 100 для грибів. Після підрахунку вираховують середнє арифметичне значення та вираховують число КУО/г.

*Поверхневий метод.* Проводиться аналогічно глибинному, але досліджуваний зразок в кількості 1 мл вносять у чашки Петрі з вже застиглим відповідним середовищем. [48, 49]

*Тест на наявність кишкової палички.* Для тесту готують 100 мл CASO агару – триптиказо-соевого агару, гомогенезують, розливають по чашкам Петрі, дають застигнути та вносять 1 мл приготовленого зразку, інкубують при 35-37°C протягом 18-48 годин. За наявності росту, культуру пересівають на агар МакКонкі та інкубують протягом 18-72 годин при 35-37°C. Позитивною реакцією є ріст червоних колоній грам негативних паличок. За необхідності проводять додатковий тест-підтвердження – продукування індолу [48, 50].

*Тест на наявність сальмонели.* Для аналізу відбирають та зважують 10 г досліджуваного еритритолу та розчиняють його в бульйоні МакКонкі, гомогенезують та інкубують протягом 18-24 годин при 35-37°C. Переносять 1 мл зразку до 10 мл тетратіонатного жовчного бульйону з бриліантовим зеленим та інкубують протягом 18-24 годин при 41-43°C. Після інкубації, якщо наявний ріст, культуру пересівають на чашки з лактозо-сахарозним агаром з бриліантовим зеленим, ксилозо-лізиновим дезоксихолатним агаром та дезоксихолат-цитратним агаром. Чашки інкубують при 35-37°C протягом 18-72 годин. На присутність сальмонел свідчить ріст наступного виду:

- на дезоксихолат-цитратному агарі утворилися безбарвні колонії;

- на ксилозо-лізиновому дезоксихолатному агарі наявні червоні колонії з/без чорних серцевин;

- на лактозо-сахарозному агарі з бриліантовим зеленим утворилися мілкі, прозорі, безкольорові або рожеві чи непрозоро-білі колонії, часто оточені рожевою або червоною зоною.

Підозрілі колонії пересівають, використовуючи глибинний та поверхневий методи, у пробірки з трицукровим агаром із залізом та інкубують. Про наявність сальмонел свідчить зміна забарвлення середовища із червоного на жовтий при глибинному посіві та утворення сірководню (не завжди) [48, 50].

Загальна кількість життєздатних аеробних бактерій не повинна перевищувати  $10^3$  бактерій та  $10^2$  грибів на 1г еритритолу. *Escherichia coli* та *Salmonella* повинні бути відсутні.

При використанні еритритолу для виробництва парентеральних лікарських форм, загальна кількість життєздатних аеробів не повинна перевищувати  $10^2$  для грибів та бактерій на 1 г еритритолу [48].

### **Визначення вологості готового продукту**

Для визначення вологості в готовому продукті – еритритолі використовують вологомір.

Принцип дії вологоміра заснований на зневодненні зразка аналізованої речовини - об'єкту вимірів під дією інфрачервоного випромінювання з автоматичним безперервним зважуванням. Вологість продукту при цьому визначається як відношення початкової маси наважки до маси наважки після висушування.

Процес виміру включає наступні операції: оператор розміщує наважку еритритолу вагою 10 г в кювету та рівномірно розподіляє її по всьому об'єму кювети (діаметром не більше 100 мм). Потім поміщує її в сушильну камеру вологоміра та зважує. Після цього відбувається автоматичне визначення втрати маси під дією інфрачервоного випромінювання і перерахунок в одиниці

вмісту вологи, з урахуванням початкової маси проби. Результати аналізу виводяться на дисплей у відсотках [51].

## РОЗДІЛ 9

### АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА ЕРИТРИТОЛУ

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

Від попередньої технологічної установки – роторно-плівкового випарного апарата, до кристалізатора надходить 2,134 м<sup>3</sup> концентрованого розчину. У кристалізаторі відбувається кристалізація охолоджувального типу, внаслідок якої відбувається утворення кристалів та маткового розчину, що в сукупності являє собою кристалічну суспензію об'ємом 2,1 м<sup>3</sup>. Далі вона насосом спрямовується на фільтр-прес, де відбувається розділення кристалічного осаду від маткового розчину - фільтрату, фільтрат збирається у збірник фільтрату, а осад йде до наступної технологічної установки.

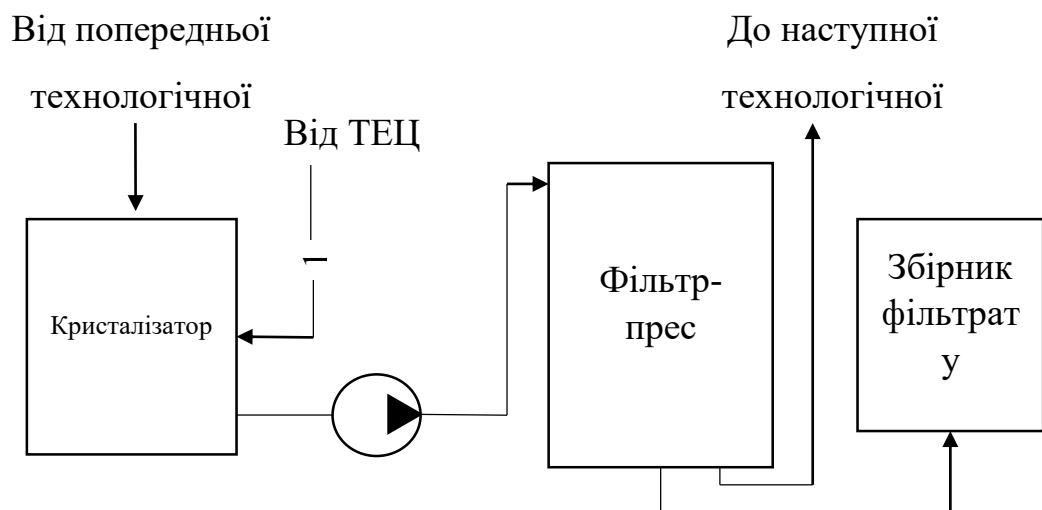


Рис.9.1. Машино-апаратна схема технологічного процесу

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

1. Контроль і регулювання температури у кристалізаторі шляхом зміни подачі температури води від системи водопостачання.
2. Контроль за рівнем рідини у кристалізаторі з сигналізацією досягнення верхнього припустимого рівня і управління клапаном подачі

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Лозіна В.Є.				РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва еритритолу	Літера	Аркуш	Аркушів
Перевір.	Красінко В.О.						94	121
Консультант	Клименко О.М.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

рідини у збірник.

3. Управління насосом перекачки рідини («ввімкнено», «вимкнено») із збірника у фільтр-прес.

4. Контроль тиску в фільтр-пресі по місцю.

5. Контроль за рівнем рідини у збірнику фільтрату з сигналізацією досягнення верхнього припустимого рівня і управління клапаном подачі рідини у збірник.

Таблиця 9.1

**Завдання на розробку системи автоматизації**

№ з.п	Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Припустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
1	Кристалізатор	Температура в апараті	3-8°C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату льодяної води
2	Кристалізатор	Рівень кристалічної суспензії в апараті	50-60%	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Управління	Захист від переповнення кристалізатора	Вплив на подачу концентрованого розчину у кристалізатор
3	Насос подачі рідини з кристалізатора на фільтр-прес	Стан насосу подачі рідини з кристалізатора на фільтр-прес	Вімкнено/вимкнено	Управління	Ручне, дистанційне	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю
4	Фільтр-прес	Тиск по місцю	Не більше 1,6 МПа	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
5	Збірник фільтрату	Рівень фільтрату в апараті	80-90%	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Управління	Захист від переповнення збірника	Вплив на подачу суспензії у збірник

## 9.2. Опис схеми автоматизації з специфікацією засобів автоматизації

У **першому контурі** контурі автоматичного контролю і управління, в кристалізаторі необхідно контролювати і регулювати температуру, яка має припустимі межі 3-8°C. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві. Для цього використовують термометр опору ТСП-1288, який вбудовується в корпус кристалізатора. Даний термометр опору має робочий діапазон вимірювальних температур від -50 до +250°C. Має клас точності А [52]. Для регулювання температури передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок зміни витрати льодяної води, що подається в сорочку кристалізатора.

У **другому контурі** автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати рівень рідини в кристалізаторі з сигналізацією досягнення верхнього припустимого рівня, який має межі 50-60%, і управління клапаном подачі рідини у кристалізатор [53]. Для цього використовують дискретний датчик рівня CleverLevel LFFS із нержавіючої сталі, який вбудовується в корпус кристалізатора і може використовуватися в середовищах температурою -40...+85°C [54]. Сигналізація про досягнення верхнього рівня передбачається на АРМі оператора-технолога.

У **третьому контурі** автоматичного контролю і управління, необхідно управляти роботою двигуна насосу подачі кристалічної суспензії з кристалізатора до фільтр-преса. Для цього передбачено управління вимкненням/вимкненням насосу з АРМа оператора та аварійне відключення насосу кнопкою «Стоп» розташованою «по місцю» біля насоса [55].

У **четвертому контурі** автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати тиск кристалічної суспензії в фільтр-пресі, який має регламентоване значення не більше 1,6 МПа. Для цього використовують датчик тиску Danfoss MBS 1700 з максимальним вимірювальним тиском 2,5 МПа. Управляючий сигнал 4-20мА [56]. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві.

У п'ятому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати рівень рідини в збірнику фільтрату з сигналізацією досягнення верхнього припустимого рівня, який має межі 80-90%, і управління клапаном подачі рідини у збірник фільтрату [53]. Для цього використовують дискретний датчик рівня CleverLevel LFFS із нержавіючої сталі, який вбудовується в корпус збірника і може використовуватися в середовищах температурою  $-40...+85^{\circ}\text{C}$  [54]. Сигналізація про досягнення верхнього рівня передбачається на АРМі оператора-технолога.

### 9.3. Специфікація обладнання

Таблиця 9.2

#### Специфікація приладів

№ позиції за схемою	Найменування і технічна характеристика виробу	Тип, модель	Виробник
1а	Термометр опору $d = 6$ мм, робочий діапазон температур від $-50$ до $+250^{\circ}\text{C}$ , клас точності А, показник теплової інерції не більше 8 с, умовний тиск вимірюваного середовища 0,4 МПа, матеріал захисної арматури прессматеріала АГ- 4В сталь 08Х13 або 12Х18Н10Т.	ТСП-1288	«Стандарт-М», Україна
	Клапан регулюючий, робочий діапазон температур $+5-260^{\circ}\text{C}$ , матеріал корпусу – сталь 20, максимальний перепад тиску на клапані – 2МПа.	КПСР 210	КПСР, Білорусь
2а, 4а	Датчик рівня, корпус із нержавіючої сталі AISI 304, кабельний вхід М16 пластик або нікельована латунь, температура середовища та зберігання від $-40$ до $+85^{\circ}\text{C}$ , вологість навколишнього середовища $<98\%$ , клас захисту IP67, матеріал контактної частини ПEEK нержавіюча сталь AISI 316L (1.4404), шорсткість поверхонь контактної частини $Ra <0,8$ мкм, тиск процесу $<100$ бар (стандарт), напруга живлення 12,5-36В постійного струму, максимальний струм навантаження 35мА, вихідний сигнал PNP, NPN, push-pull; затримка вихідного сигналу 0,1 с, безпека cULus, Клас 2, E365692.	CleverLevel LFFS	Baumer, Швейцарія
	Клапан регулюючий, робочий діапазон температур $+5-260^{\circ}\text{C}$ , матеріал корпусу –	КПСР 210	КПСР, Білорусь

Закінчення табл. 9.2

	сталь 20, максимальний перепад тиску на клапані – 2МПа.		
М	Насос відцентровий з магнітною муфтою, продуктивність 0,5 – 6,5 м <sup>3</sup> /год, робочий діапазон температур +3-95°С	DM 06	Debem, Італія
За	Датчик тиску, максимальний вимірювальний тиск 2,5 МПа, температура робочого середовища від -40 до +85°С, ступінь захисту IP65, вихідний сигнал 4-20мА, час реакції не більше 4 мс, приєднання по тиску G <sup>1/4</sup> А EN 837 або G <sup>1/2</sup> А EN 837.	MBS1700	Danfoss, Данія

## РОЗДІЛ 10 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

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

Технологічна схема біосинтезу еритритолу включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, приготування і стерилізація поживних середовищ, запасного розчину мікроелементів та розчину глюкози для підживлення, підготовка смол та активованого вугілля для колонок) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту), а також післяферментаційні стадії (виділення та очищення: відділення біомаси, очищення супернатанту, концентрування та кристалізація, виділення кристалів та їх сушіння).

**1) Санітарна підготовка виробництва.** На цій стадії, при генеральних та щоденних прибираннях, використовуються дезінфекційний засіб «Деканаль» для мийки ферментерів, реакторів-змішувачів та ємностей і засіб дезінфекційний з мийною здатністю «ПроСаніТексп» для мийки поверхонь, обладнання та підлоги. Даний засіб не потребує змивання, а отже після обробки підлоги, поверхонь та обладнання, промивних вод спостерігатись не буде. Після миття ферментерів, реакторів змішувачів та ємностей за допомогою СІР-мийки засобом «Деканаль» промивна вода надходить до каналізації, а миючий засіб повторно використовують при наступній обробці. Для заключної дезінфекції використовують засіб «Біопагdez» та «Даноксин» (якщо спостерігається явище утворення дезрезистентних форм мікроорганізмів). Тому на цій стадії будуть утворюватися тверді відходи у вигляді упаковки від мийних та дезінфікуючих розчинів. Отже, дана стадія є місцем емісії рідких та твердих відходів.

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Лозіна В.Є.				РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля	Літера	Аркуш	Аркушів
Перевір.	Красінко В.О.						99	121
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

**2) Приготування та стерилізація розчину для підживлення.** На даному етапі відбувається приготування та стерилізація розчину глюкози для підживлення, який подають у ферментер кожні 12 год по 494 л в ході виробничого біосинтезу. У випадку невідповідності даного розчину показникам мікробіологічної чистоти він відбраковується, і за таких умов утворюють рідкі відходи. Також на даному етапі будуть утворюватися тверді відходи у вигляді упаковки від глюкози. Тому, *даний етап є місцем емісії твердих відходів, а відходи підживлюючого розчину не враховуються у загальному об'ємі рідких відходів.*

**3) Приготування і стерилізація поживних середовищ та запасного розчину мікроелементів.** На цих стадіях можливе утворення рідких та твердих відходів, у випадку невідповідності сировини нормативним вимогам та показникам, або невідповідності поживних середовищ рівню асептики. Тверді відходи, що будуть утворюватися на постійній основі – упаковка від сировини для приготування поживних середовищ. Отже, *дані стадії є місцем емісії твердих відходів.*

**4) Підготовка смол та активованого вугілля для колонок.** На цій стадії відбувається підготовка смол та активованого вугілля шлях замочування у розчинах хлориду натрію, гідроксиду натрію та хлоридної кислоти. Тому будуть утворюватися рідкі відходи, а також тверді відходи у вигляді тари/упаковки від сировини. Отже, *дана стадія є місцем емісії рідких та твердих відходів.*

**5) Підготовка посівного матеріалу.** На даному етапі отримується та збільшується в об'ємі посівний матеріал за рахунок культивування в посівних апаратах різного об'єму. Оскільки посівний матеріал використовується для засіву виробничого ферментера, відходи від отримання посівного матеріалу не враховуються у загальному об'ємі рідких відходів.

Варто також зауважити, що продуцент еритритолу осмофільні дріжджі *Pseudozyma tsukubaensis* KN 75 є аеробами. І важливим етапом їх культивування є аерація, а, отже, у процесі утворюється великий об'єм

відпрацьованого повітря. Тому, *даний етап є місцем емісії великого об'єму газоповітряних відходів.*

**6) Виробничий біосинтез.** На цій стадії передбачається утворення великого об'єму культуральної рідини у якій накопичується еритритол. Але, зважаючи на те, що після біосинтезу культуральну рідину спрямовують до збірника, звідки вона надходить на стадії виділення та очищення, рідкі відходи на даній стадії не враховуються. Також на даній стадії утворюються великі об'єми відпрацьованого повітря. Тому, *дана стадія є місцем емісії великого об'єму газоповітряних відходів.*

**7) Відділення біомаси.** На даному етапі відбувається відділення фільтрату від дріжджових клітин за допомогою сепаратора. Утворений супернатант, який містить еритрит спрямовується на подальші стадії виділення та очищення. Відходом даного етапу є відсепарована дріжджова маса. Отже, *даний етап є місцем емісії твердих відходів.*

**8) Виділення і очищення еритритолу.** На даних стадіях спочатку відбувається демінералізація супернатанту, а потім додаткове очищення від побічних відходів ферментації, такі як ацетоїн, або інші домішки. Фільтрат утворений на цих стадіях спрямовується на наступну стадію виділення та очищення. Після закінчення роботи колонок, крізь них пропускають знесолену воду для видалення сорбованих іонів. Отже, *дані стадії є місцем емісії рідких відходів.*

**9) Концентрування та кристалізація.** На цьому етапі відбувається нагрівання фільтрату до 90°C у роторно-плівковому випарному апараті та його поступове охолодження до 4-8°C впродовж 8 год в охолоджуючому кристалізаторі. Утворений матковий розчин спрямовується на наступну стадію виділення кристалів. Тому, *відходи на цих стадіях не враховуються.*

**10) Виділення кристалів.** На цій стадії утворені кристали збираються за допомогою автоматичного фільтр-преса, а фільтрат відводиться у збірник і повертається на попередні стадії (очищення супернатанту). Тому, *відходи даного етапу не враховуються у загальному об'ємі рідких відходів.*

**11) Сушіння кристалів еритритолу.** На цій стадії відбувається сушіння кристалів еритритолу при 80°C у конвеєрній стрічковій сушарці до остаточного вмісту вологи в готовому продукті - 3-5%. Даний процес супроводжується відведенням відпрацьованого повітря, яке містить механічні часточки від висушеного еритриту. Отже, *даний етап є місцем емісії газоподібних відходів.*

## **10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва**

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

Миття ферментаційного обладнання здійснюють розчином «Деканаль» концентрацією 0,5%. Оскільки, при мийці, обладнання заповнюється на 1/2, тоді, загальний об'єм обладнання, що потребує миття і, як наслідок, об'єм відходів за один цикл  $63\,780 / 2 = 31\,890$  л. Оскільки, мийні засоби є безпечними для навколишнього середовища, то мають IV клас небезпеки.

Під час підготовки смол та активованого вугілля для колонок використовують розчини гідроксиду натрію, натрій хлориду та хлоридну кислоту. Оскільки серед цих розчинів є і кислота і луг, то вони будуть нейтралізувати один одного з утворенням натрій хлориду та води, а, отже, додаткового знешкодження не потребують і можуть утилізуватися разом з усіма рідкими відходами. Після закінчення стадії виділення і очищення еритритолу, колонки промивають знесолею водою. Оскільки, хімічні речовини для підготовки смол та активованого вугілля містять луги та кислоти, то мають II-III клас небезпеки, а знесолена вода є безпечною для навколишнього середовища і має IV клас небезпеки.

Узагальнена характеристика рідких відходів наведена у таблиці 10.1.

## Характеристика рідких відходів у виробництві еритриту

Назва складової рідких відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (л)	Клас небезпеки
0,5% розчин «Деканаль»	глутаровий альдегід у межах 18,0-22,0 %, алкілдиметилбензиламоніум хлорид у межах 8,0-12,0 %	<b>31 890</b>	<b>IV</b>
Хімічні речовини	натрій гідроксид, натрій хлорид, хлоридна кислота	<b>2 000</b>	<b>II-III</b>
Знесолена вода	Залишки поживного середовища – глюкози і кукурудзяного борошна, катіони $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , аніони $\text{SO}_4^{2-}$	<b>4 000</b>	<b>IV</b>
<b>Усього:</b>		<b>37 890</b>	

**Утилізація рідких відходів**

Оскільки миючий розчин «Деканаль» містить у своєму складі ПАР та альдегід, необхідно забезпечити глибоку очистку стічних вод, щоб зменшити концентрацію цих речовин. Тому біологічне очищення стічних вод виробництва еритриту здійснюється в установці «BIOTAL-T», що складається з трьох SBR-реакторів. Процес очищення стічних вод відбувається за наступною схемою (рис. 10.1).

Стічні води надходять в приймальну сітку (1), під якою встановлено аератор (2). Він одночасно з аерацією реактора SBR-1 проводить аерацію сітки, розбиваючи грубі нечистоти, що знаходяться в ній, і перешкоджає їй забиванню. Вода, позбавлена від грубих нечистот, стікає в реактор SBR-1, куди також подається ерліфтами (3) зворотний активний мул з реакторів SBR-2 і SBR-3. В SBR-1 стічні води частково біологічно очищуються, піддаючись багаторазовим, циклічно повторюваним процесам аерації і перемішування при дефіциті повітря, завдяки чому тут також відбувається процес денітрифікації при наявності нітритів і нітратів, які надійшли зі зворотним активним мулом з

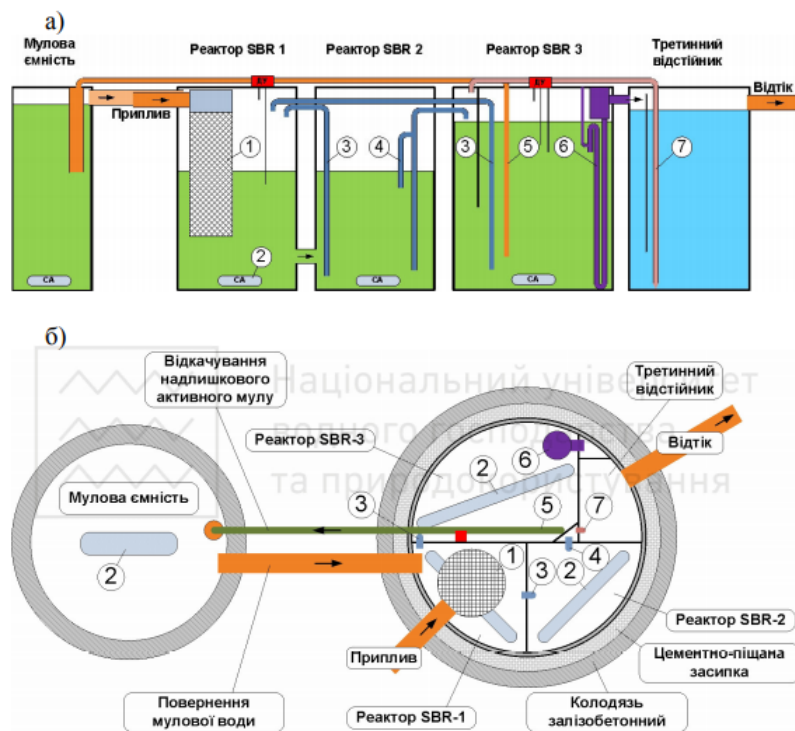
SBR-2 і SBR-3, і легкоокислюваної органіки, що надходить із свіжими стічними водами [57].

Стічні води, що пройшли обробку в SBR-1, перетікають самопливом в SBR-2, куди також віддувається реверсними ерліфтами (4) при перекачуванні мулової суміші в SBR-3 піна (при утилізації ПАР, головна проблема – велике утворення піни, яке при використанні відкритих установок може розноситися повітрям та забруднювати навколишнє середовище), яка захищає SBR-3 від негативного впливу сапонатів. В SBR-2, аналогічно до SBR-1, мулова суміш піддається багаторазовим, що циклічно повторюються, процесам аерації і перемішування [57].

Частково стічні води з SBR-2 перекачуються реверсними ерліфтами (4) в SBR-3, створюючи при цьому акумулюючий об'єм для прийняття залпових скидів в SBR-1 і SBR-2. В SBR-3 відбувається окислення органіки, що важко окислюється, і нітрифікація. Тут мулова суміш піддається аерації з наступним відстоюванням [57].

Перед відкачуванням очищених стічних вод відбувається відкачування надлишкового активного мулу з SBR-3 в муловий колодязь і відкачування осаду з третинного відстійника в SBR-3. Мулова вода з мулового колодязя повертається в SBR-1 [57].

Після завершення циклу відстоювання в SBR-3 і відкачки надлишкового активного мулу, проводиться відкачка очищених стічних вод з SBR-3 в третинний відстійник сифонним ерліфтом (6), а чиста вода з третинного відстійника надходить в каналізаційну мережу або може бути використана в технічних цілях [57].



**Рис. 10.1. Принципова технологічна (а) і планова (б) схема установки «BIOTAL-T»**

1 – приймальна сітка; 2 – система аерації; 3 – ерліфт рециркуляційний; 4 – ерліфт реверсний; 5 – ерліфт відкачки надлишкового активного мулу; 6 – ерліфт сифонний; 7 – ерліфт відкачки осаду з третинного відстійника [57].

### 10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Тверді відходи, що утворюються на стадіях санітарної підготовки виробництва, приготування поживних середовищ, підживлюючого розчину та підготовки компонентів для колонок представлені пакувальною тарою для миючих, дезінфікуючих засобів, хімічних реагентів і компонентів поживного середовища. Пляшки для миючих, дезінфікуючих розчинів та хлоридної кислоти виготовлені з поліетилену високої щільності (HDPE), вони: дешеві, безпечні, стійкі до агресивних речовин і високих температур, міцні та легкі в переробці (HDPE-сміття дробиться на спеціальних установках, після чого гранули знову переплавляються в різні вироби) [58]. Компоненти поживного середовища та хімічні реагенти поставляються в мішках з поліпропілену (PP), який є стійким і може перероблятися за допомогою методів лиття під тиском, пресування та екструзії [58].

Після відділення біомаси в сепараторі за цикл утворюється 193 кг дріжджової маси. Оскільки продуцент еритриту - дріжджі *P. tsukubaensis* KN 75 є безпечними для навколишнього середовища та життя людей і тварин, їх відносять до IV класу небезпеки. Узагальнена характеристика твердих відходів наведена у таблиці 10.2.

Таблиця 10.2

**Характеристика твердих відходів у виробництві еритриту**

Назва складової твердих відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (кг)	Клас небезпеки
Пластикова тара для миючих засобів і хлоридної кислоти	HDPE-2 – Поліетилен високої щільності	<b>10,5</b>	<b>IV</b>
Упаковка для компонентів поживного середовища	PP-5 – поліпропілен	<b>0,58</b>	<b>IV</b>
Упаковка для компонентів розчину для підживлення	PP-5 – поліпропілен	<b>1,7</b>	<b>IV</b>
Упаковка для натрій гідроксиду та натрій хлориду	PP-5 – поліпропілен	<b>0,18</b>	<b>IV</b>
Дріжджова маса	Біомаса культури <i>P. tsukubaensis</i> KN 75	<b>193</b>	<b>IV</b>
<b>Усього:</b>		<b>205,96</b>	

**Утилізація твердих відходів**

Для утилізації пляшок від миючих засобів і хлоридної кислоти, мішків від компонентів поживного середовища, розчину для підживлення та хімічних реагентів, їх попередньо сортують та відправляють до пунктів переробки.

Відділена біомаса містить залишки поживного середовища та цільового продукту – еритриту, але всі ці компоненти не становлять загрози для життя

тварин, а навпаки, наприклад, залишки кукурудзяного борошна є джерелом амінокислот.

При виробництві кормових дріжджів використовують аспорогенні дріжджі родів *Candida* і *Torulopsis*, які належать до класу недосконалих грибів *Fungi imperfecti* (*Deuteromycetes*) [59]. Синонімом штаму *P. tsukubaensis* є *Candida tsukubaensis* [60], тому, дріжджову масу, яка залишилася як твердий відхід в технології одержання еритритолу після сепарування можна використовувати в якості кормового білка. Процес виробництва кормових дріжджів відбувається за наступною схемою (рис.10.2).



**Рис 10.2. Технологічна схема отримання кормових дріжджів**

*Сепарування та промивання.* Після сепарування для відділення супернатанту, що містить еритрит, дріжджову масу, для поліпшення якості кормових дріжджів, промивають водою [59].

*Упарювання та плазмоліз.* Упарювання дріжджового концентрату проводять в одно- або двухкорпусних вакуум-випарних установках. Перед подачею в випарний апарат дріжджову суспензію піддають плазмолізу (термоліз), для чого її нагрівають до 75-80°C в теплообміннику-плазмолізаторі глухою парою, яка подається в міжтрубний простір, і витримують в ємності протягом 30-40 хв. В результаті плазмолізу суспензія дріжджів гомогенізується, що позитивно впливає на подальший процес упарювання [59].

Випарний апарат складається з виносного трубчастого підігрівача і випарника (сепаратора). Для випарювання можуть використовуватися апарати з висхідним і низхідним потоком [59].

Щоб зберегти вітаміни в біомасі дріжджів, температура при упарюванні не повинна перевищувати 85°C, тому упарювання проводять під вакуумом. Рекомендовані температури кипіння в двухкорпусних випарних апаратах складають 80-83°C в першому і 58-60°C у другому корпусі [59].

Продуктивність вакуум-випарної установки в процесі експлуатації падає внаслідок утворення накипу на стінках трубок випарника. Періодична хімічне очищення установки проводиться через кожні 24 год роботи 5% розчином NaOH і через кожні 72 год - 3% розчином HNO<sub>3</sub> [59].

*Сушка дріжджового концентрату.* Після випарної установки дріжджовий концентрат піддається сушінню до отримання товарного продукту з вологістю 8-10%. На заводах великої потужності застосовують розпилювальні сушарки. Дріжджовий концентрат перед подачею в розпилювальну сушарку пропускається через фільтри, щоб відокремити рідкі дріжджі від механічних. При обертанні розпилювача дріжджовий концентрат розбризкується на найдрібніші краплі, які контактують з гарячим теплоносієм і втрачають воду. Утворюється сухий дріжджовий порошок, який падає на кінцеве дно сушильної камери, звідки безперервно видаляється пневмотранспортом. Відпрацьований газ-теплоносій, насичений водою, виходить з камери і проходить батарею циклонів, де вловлюється віднесений порошок дріжджів. Зазвичай 80-85% висушених дріжджів осідає в сушильній камері, а 15-20% несеться з відпрацьованим теплоносієм і вловлюється в циклонах [59].

Варто зауважити, що вторинні газоподібні, рідкі та тверді відходи від виробництва кормового концентрату дріжджів утилізуються разом з відходами від виробництва еритритолу.

### **10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів**

Газоподібні відходи утворюються на етапах вирощування посівного матеріалу, виробничого біосинтезу та сушіння кристалів еритриту. У складі газоповітряних відходів містяться продукти обміну – вуглекислий газ та механічні часточки висушеного еритриту.

Тривалість процесу отримання посівного матеріалу складає – 156 год, а виробничого біосинтезу – 85 год. Для аерації поживного середовища використовують стиснене аераційне повітря зі швидкістю аерації – 1 л/хв. У виробничому цеху встановлюють 4 ферментери, тому приблизний об'єм відпрацьованого повітря становить  $3 \times (60 \times 156) + 1 \times (60 \times 85) = 33\,180$  л (33,18 м<sup>3</sup>).

Для розрахунку об'єму відпрацьованого повітря під час сушіння кристалів еритриту в конвеєрній стрічковій сушарці, приймаємо, що продуктивність сушарки становить  $G=1200$  кг/год з витратою сушильного агенту - 20 000 м<sup>3</sup>/год. Тривалість сушіння 1436,1 кг еритриту складе 1,2 год (71,8 хв). Отже, розрахунковий об'єм сушильного агенту і відповідно об'єм відпрацьованого повітря становить:  $1,2 \times 20\,000 = 24\,000$  м<sup>3</sup>.

Оскільки еритритол та його продуцент *P. tsukubaensis* KN 75 має клас небезпеки IV, то і газоповітряні відходи матимуть клас небезпеки IV. Узагальнена характеристика газоповітряних відходів наведена у таблиці 10.3.

Таблиця 10.3

#### Характеристика газоповітряних відходів у виробництві еритриту

Назва складової газоподібних відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (м <sup>3</sup> )	Клас небезпеки
Відпрацьоване повітря після ферментації	Вуглекислий газ	<b>33,18</b>	<b>IV</b>
Відпрацьоване повітря після сушіння кристалів	Механічні часточки висушеного еритриту	<b>24 000</b>	<b>IV</b>
<b>Усього:</b>		<b>24 033,18</b>	

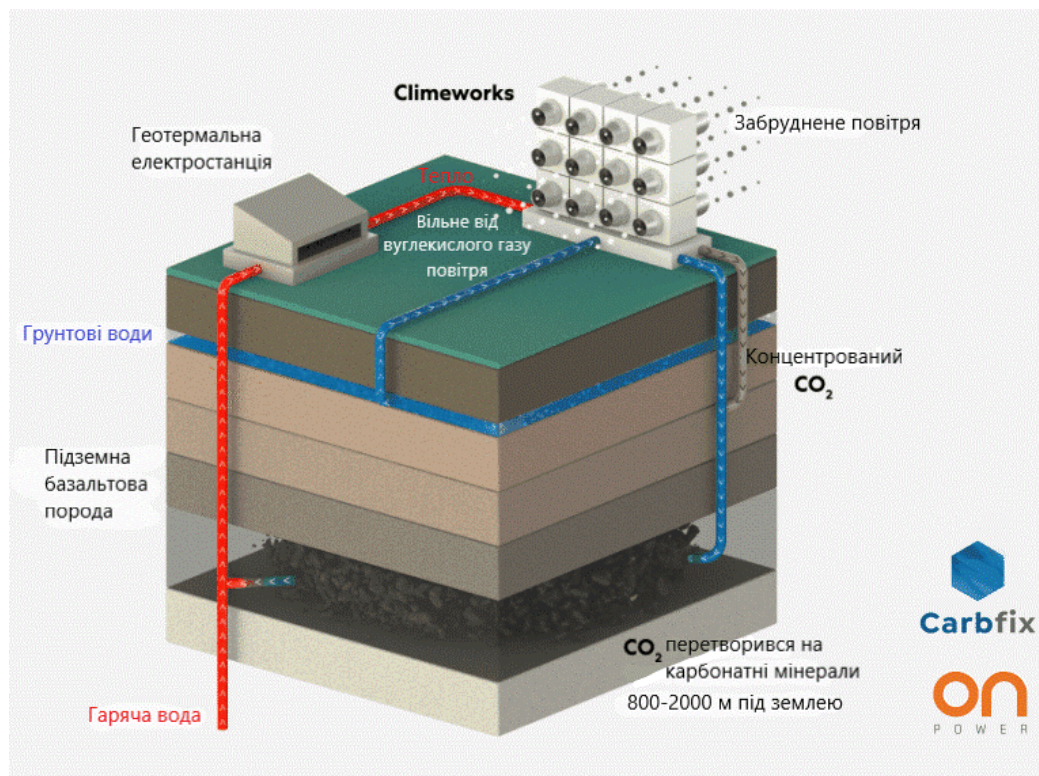
#### Утилізація газоподібних відходів

Утилізацію газоповітряних відходів після ферментації, які містять  $\text{CO}_2$ , можна провести за допомогою прямого уловлювання повітря - це форма видалення вуглекислого газу в поєднанні зі зберіганням. Пряме уловлювання здійснюється в машинах Climeworks, що складаються з модульних колекторів  $\text{CO}_2$ , які можна об'єднувати для створення машин будь-якого розміру. Машини прямого захоплення повітря Climeworks працюють виключно на поновлюваних джерелах енергії або енергії з відходів. Повторні викиди діоксиду вуглецю складають менше 10%. Процес очищення відпрацьованого повітря, що містить  $\text{CO}_2$  відбувається за наступною схемою (рис. 10.3) [6].

Вуглекислий газ вибірково вловлюється в двоступінчастому процесі. Спочатку, в колектор, за допомогою вентилятора, втягується повітря, діоксид вуглецю вловлюється на поверхні високоселективного фільтруючого матеріалу, який знаходиться всередині колекторів. Після заповнення фільтруючого матеріалу колектор закривається і температура підвищується до  $80-100^\circ\text{C}$  - при цьому виділяється вуглекислий газ. Таким чином можна зібрати діоксид вуглецю високої чистоти і концентрації [61].

Потім, за допомогою технології Carbfix, яка забезпечує процес зберігання, вуглекислий газ змішується з водою і закачується глибоко під землю. В результаті природної мінералізації діоксид вуглецю вступає в реакцію з базальтовою породою і через кілька років перетворюється в камінь.

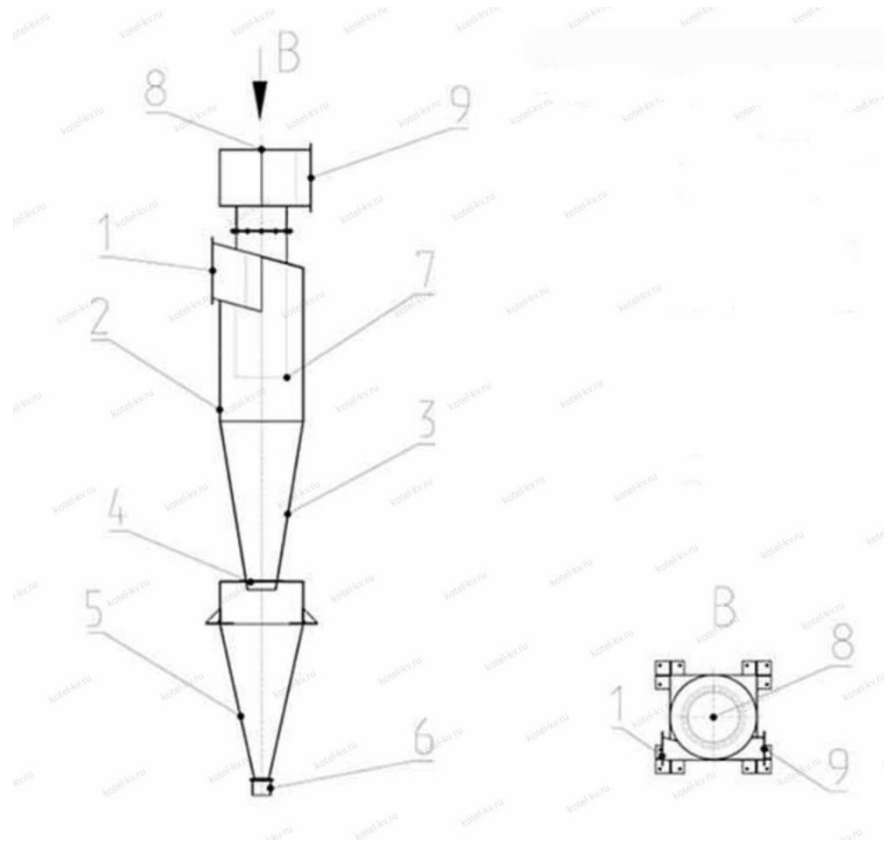
Таким чином,  $\text{CO}_2$  видаляється з повітря і повертається в землю. За допомогою такого машинного рішення можна, також, точно виміряти, скільки вуглекислого газу було видалено і перетворено на камінь [61].



**Рис 10.3. Утилізація відпрацьованого повітря, що містить вуглекислий газ**

Утилізація газоповітряних відходів після сушіння кристалів еритритолу можна здійснити в циклонах. Процес очищення відпрацьованого повітря від часточок еритриту відбувається за наступною схемою (рис. 10.4) [62].

Циклон, під впливом відцентрової сили, що виникає при обертанні повітряного потоку в корпусі апарату відокремлює завислі частинки еритритолу з газового середовища. Повітряний потік вводиться в пиловловлювач через патрубок. Обертальний рух змушує частинки притискатись до стінок циклону, втрачаючи швидкість вони скочуються вниз і через відвідний отвір потрапляють до бункера, де відбувається їх осадження і накопичення. Очищений повітряний потік з центральної зони гвинтоподібно піднімається вгору і через вихлопну трубу виходить назовні. Бункер при його накопиченні розвантажується від дрібнокристалічного еритриту та подається на етап фасування де змішується з еритритолом нормального розміру [62].



**Рис. 10.4. Процес очищення газоповітряних відходів після сушіння кристалів еритриту**

1 – вхідний патрубок; 2 – корпус циклона; 3 – конус; 4 – відвідний отвір; 5 – бункер; 6 – спускний патрубок; 7 – вихлопна труба; 8 – збірник «равлик»; 9 – вихідний патрубок.

#### **10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів**

##### ***Заходи для зменшення об'ємів рідких відходів***

Для зменшення об'єму відпрацьованого миючого засобу «Деканаль» пропоную використовувати СІР-мийку, яка забезпечує економію води і миючого засобу, та дає можливість повторно використовувати мийний засіб після його фільтрування.

##### ***Заходи для зменшення об'ємів твердих відходів***

Для зменшення об'єму твердих відходів можна закуповувати необхідну сировину у більших за об'ємом упаковках та обирати максимально екологічну тару для того, щоб її можна було повторно переробити.

##### ***Заходи для зменшення об'ємів газоподібних відходів***

Відпрацьоване очищене повітря, яке містить вуглекислий газ можна засмоктувати вентиляторами, (машин Climeworks), які фільтрують CO<sub>2</sub>, а тепло, що виділяється, поставляється в теплиці по підземному трубопроводу. І теплиці - не єдине застосування для CO<sub>2</sub>, його також можна використовувати, щоб робити газовані напої або створювати паливо [63]. Для зменшення газоповітряних викидів підчас сушіння цільового продукту можна використовувати більш економічні, по витраті сушильного агенту, конвеєрні стрічкові сушарки.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Власенко І., Власенко В. Виробництво продуктів спеціального призначення для хворих на цукровий діабет. *Товари і ринки*. 2018, 4: 47-56. doi: 10.31617/tr.knute.2018(28)04.
2. Jeya M., Lee K.-M., Tiwari M. K., Kim J.-S., Gunasekaran P., Kim S.-Y., et al. Isolation of a novel high erythritol-producing *Pseudozyma tsukubaensis* and scale-up of erythritol fermentation to industrial level. *Microbiol Biotechnol.* 2009, 83: 225-231. doi: 10.1007/s00253-009-1871-5.
3. Moon H.-J., Jeya M., Kim I.-W., Lee J.-K. Biotechnological production of erythritol and its applications. *Microbiol Biotechnol.* 2010, 86: 1017-1025. doi: 10.1007/s00253-010-2496-4.
4. Regnat K., Mach R.L., Mach-Aigner A.R. Erythritol as sweetener – wherefrom and whereto? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, 102: 587-595. doi:10.1007/s00253-017-8654-1.
5. Savergave L. S. Microbial production of erythritol and mannitol: strain improvement and process optimization. Thesis for the degree of doctor of philosophy in biotechnology. India, 2011. 283 p. [Електронний ресурс] Режим доступу:  
[https://www.academia.edu/26074149/MICROBIAL\\_PRODUCTION\\_OF\\_ERYTHRITOL\\_AND\\_MANNITOL\\_STRAIN\\_IMPROVEMENT\\_AND\\_PROCESS\\_OPTIMIZATION\\_DOCTOR\\_OF\\_PHILOSOPHY\\_IN\\_BIOTECHNOLOGY](https://www.academia.edu/26074149/MICROBIAL_PRODUCTION_OF_ERYTHRITOL_AND_MANNITOL_STRAIN_IMPROVEMENT_AND_PROCESS_OPTIMIZATION_DOCTOR_OF_PHILOSOPHY_IN_BIOTECHNOLOGY)
6. Carly F., Fickers P. Erythritol production by yeasts: a snapshot of current knowledge. *Wiley Yeast*. 2018, 35: 455-463. doi:10.1002/yea.3306.
7. Rzechonek D.A., Dobrowolski A., Rymowicz W., Mironczuk A.M. Recent advances in biological production of erythritol. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2018, 38 (4): 620-633. doi: 10.1080/07388551.2017.1380598.
8. Інтернет-магазин Indiamart [Електронний ресурс] Режим доступу:  
<https://www.indiamart.com/proddetail/erythritol-6850946797.html>
9. Інтернет-магазин NKD Living [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.nkdliving.com/>

10. Інтернет-магазин NOW Food [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.nowfoods.com/natural-foods/by-brand/now-real-food/sweeteners>
11. Lin S.-J., Wen C.-Y., Wang P.-M., Huang J.-C., Wei C.-L., Chang J.-W., Chu W.-S. High-level production of erythritol by mutants of osmophilic *Moniliella* sp. *Process Biochemistry*. 2010, 45: 973-979. doi: 10.1016/j.procbio.2010.03.003.
12. Rywinska A., Tomaszewska L., Rymowicz W. Erythritol biosynthesis by *Yarrowia lipolytica* yeast under various culture conditions. *African Journal of Microbiology Research*. 2013, 7 (27): 3511-3516. doi: 10.5897/12.2272.
13. Lee J.-K., Ha S.-J., Kim S.-Y., Oh D.-K. Increased erythritol production in *Torula* sp. with inositol and phytic acid. *Biotechnology Letters*. 2001, 23: 497-500. doi: 10.1023/A:1010386500326.
14. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.: 2004. 239 с.
15. *Taxonomy browser – Pseudozyma tsukubaensis* [Електронний ресурс] // BOLD: Barcode of Life Data System. – 2019. – Режим доступу: [http://boldsystems.org/index.php/Public\\_RecordView?processid=GBSO11920-13](http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=GBSO11920-13)
16. Прокопенко О.М. Баланси та споживання основних продуктів харчування населенням України. – Київ: Державна служба статистики України, 2019. – 31 с. [Електронний ресурс] Режим доступу: [http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat\\_u/2019/zb/07/zb\\_bsoph2018\\_pdf.pdf](http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2019/zb/07/zb_bsoph2018_pdf.pdf)
17. Pat. EP 0525659 B1 Process for preparing erythritol crystals / Toshihiro M., Makoto S., Yoshikazu O., Tetsuo Y., Kouji F. – Publ. 02.04.1997. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://patents.google.com/patent/EP0525659B1/en>
18. *Pentose phosphate pathway – Yarrowia lipolytica* [Електронний ресурс] // KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. – 2019. – Режим доступу: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?yli00030](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?yli00030)

19. *Glycolysis / Gluconeogenesis – Yarrowia lipolytica* [Електронний ресурс] // KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. – 2019. – Режим доступу: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?yli00010](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?yli00010)
20. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 252 с.
21. Данилов І. П., Самійленко С. І. Апарати мікробіологічної промисловості: навч. посібник. – Харків: НТУ «ХП», 2008 – 272 с.
22. Промсервис [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://lazerps.ru/uslugi/filtry/filtry-fyas/>
23. Air-Part [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://air-part.ru/product/filtr-dlja-gazov-bio-x-ii/>
24. Антисептика & Дезинфекция [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://antiseptika.prom.ua/p807818-dezsredstvo-dekanal-dlya.html>
25. ЛАГОС ГРУП [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://lagos.com.ua/bionol\\_ua](https://lagos.com.ua/bionol_ua)
26. ТС Альянс [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://tc-aliance.com.ua/p1152278027-antiseptik-desover-sa4f3.html>
27. ProSanit<sup>EX</sup> [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://pro-sanit.com/>
28. ДАНА МЕДІКАЛ [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://danamedikal.com/gallery/%D0%86%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F%20%D0%91%D1%96%D0%BE%D0%BF%D0%B0%D0%B3%D0%B4%D0%B5%D0%B7.pdf>
29. ДАНА МЕДІКАЛ [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://danamedikal.com/gallery/%D0%86%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F%20%D0%94%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D0%BD.pdf>

30. Яковлев С.В., Карели Я.А., Жуков А.И., Колобанов С.К. Канализация. Учебник для вузов. Изд. 5-е, перераб. в доп. – Москва: «Стройиздат», 1975, - 632 с.

31. Сидоров Ю. И., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основи проектування: Навчальний посібник. – Львів: «Інтелект-Захід», 2008, - 736 с.

32. Касаткин А.Г. Основные процессы и аппараты химической технологии. Часть II. Тепловые и диффузионные процессы. Учебное пособие для химических ВТУЗов. 2-е изд., испр. и доп. – Москва: ГОНТИ «НКТП», 1938. – 680 с.

33. Плановский А.Н., Рамм В.М., Каган С.З. Процессы и аппараты химической технологии. – Москва: «Госхимиздат», 1962. – 841 с.

34. Дытнерский Ю.И. Процессы и аппараты химической технологии. Часть 2. Массообменные процессы и аппараты. Учебник для вузов. Изд. 2-е. В 2-х кн. М.: Химия, 1995. – 368 с.

35. Product line brochure Diaion™ [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.lenntech.com/Data-sheets/Mitsubishi-DIAION-Catalogue.pdf>

36. Product Data Sheet Diaion™ RCP160M [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://www.diaion.com/en/products/ion\\_exchange\\_resins/strongly\\_acidic\\_cation/data\\_sheet\\_rcp/pdf/rcp160m.pdf](https://www.diaion.com/en/products/ion_exchange_resins/strongly_acidic_cation/data_sheet_rcp/pdf/rcp160m.pdf)

37. Product Data Sheet Diaion™ WA30 [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.lenntech.com/Data-sheets/Mitsubishi-WA30-L.pdf>

38. Product Data Sheet Diaion™ PA408 [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://www.diaion.com/en/products/ion\\_exchange\\_resins/strongly\\_basic\\_anion/data\\_sheet\\_pa/pdf/pa408.pdf](https://www.diaion.com/en/products/ion_exchange_resins/strongly_basic_anion/data_sheet_pa/pdf/pa408.pdf)

39. Цитович И.К. Курс аналитической химии. Учебник, 8.-е изд., стер. – СПб.: Издательство «Лань». 2004. – 496 с.: ил. – (Учебник для вузов. Специальная литература).

40. ПНД Ф 14.1:2.107-97. Методика выполнения измерений массовых концентраций сульфатов в пробах природных и очищенных сточных вод титрованием солью бария в присутствии ортанилового К. – М., 1997 (изд. 2004 г.). [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293832/4293832505.htm>

41. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.

42. Красінько В. О., Белемець Т. О. Біологія клітин [Електронний ресурс]. Лабораторний практикум для студ. напрямку підготовки 6.051410 «Біотехнологія» ден. та заоч.. форм навчання / уклад.: В. О. Красінько, Т. О. Белемець. – К.: НУХТ, 2018. – 147 с.

43. Rywinska A., Marcinkiewicz M., Cibis E., Rymowicz W. Optimization of medium composition for erythritol production from glycerol by *Yarrowia lipolytica* using response surface methodology // *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 45 (6), 2014, p. 515-529. doi: 10.1080/10826068.2014.940966.

44. Parpinello G. P., Versari A. A simple high-performance liquid chromatography method for the analysis of glucose, glycerol, and methanol in a bioprocess // *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 38, 2000, p. 259-261. doi: 10.1093/chromsci/38.6.259. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10890750/>

45. Takle S. P., Vohra M. H., Patil S. V. HPLC method for quantitative estimation of polyhydric alcohols and sugars in bio-glycerol production. 2010. doi: 10.13140/2.1.1531.9846 [Электронный ресурс] Режим доступа:

[https://www.researchgate.net/publication/272182299\\_HPLC\\_method\\_for\\_quantitative\\_estimation\\_of\\_polyhydric\\_alcohols\\_and\\_sugars\\_in\\_bio-glycerol\\_production](https://www.researchgate.net/publication/272182299_HPLC_method_for_quantitative_estimation_of_polyhydric_alcohols_and_sugars_in_bio-glycerol_production)

46. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 67 с. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://docplan.ru/Data2/1/4293831/4293831170.htm#i166811>

47. Erythritol monograph [Электронный ресурс] Режим доступа: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/jecfa\\_additives/docs/Monograph1/Additive-173.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/Additive-173.pdf)

48. EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0 Erythritol [Электронный ресурс] Режим доступа: [http://202.195.214.45/yaodian/ep/EP5.0/16\\_monographs/monographs\\_d-k/Erythritol.pdf](http://202.195.214.45/yaodian/ep/EP5.0/16_monographs/monographs_d-k/Erythritol.pdf)

49. EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0 2.6.12. Microbiological examination of non-sterile products (total viable aerobic count) [Электронный ресурс] Режим доступа: [http://uspbpep.com/ep50/2.6.12.%20Microbiological%20examination%20of%20non-sterile%20products%20\(total%20viable%20aerobic%20count\).pdf](http://uspbpep.com/ep50/2.6.12.%20Microbiological%20examination%20of%20non-sterile%20products%20(total%20viable%20aerobic%20count).pdf)

50. EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.4 2.6.13. Microbiological examination of non-sterile products: test for specified micro-organisms [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://uk.vwr-cmd.com/ex/downloads/datasheets/pheur/dok3.pdf>

51. Свидетельство об утверждении типа средств измерений DE.C.31.005.A № 48277 Влагомеры термогравиметрические инфракрасные МА-150 [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjvpM-DkfTWAhXmtYsKHWGgCPUQFjAEegQICBAD&url=http%3A%2F%2Fwww.al-l-pribors.ru%2Fdocs%2F35148-12.pdf&usg=AOvVaw3upb1Zgr5nNkDc2y8m-3tg>

52. Стандарт-М [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://standart-m.com.ua/kipia/termopreobrazovатели/termopreobrazovатели-soprotivleniya/termopreobrazovатели-soprotivleniya--tspm-1288?mova=uk>
53. КТТО [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.ktto.com.ua/water/krf/36#cal>
54. РусАвтоматизация [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://rusautomation.ru/datchiki\\_urovnya/cleverlevel-lffs/harakteristiki-cleverlevel-lffs](https://rusautomation.ru/datchiki_urovnya/cleverlevel-lffs/harakteristiki-cleverlevel-lffs)
55. Debem [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/nasosy\\_s\\_magnitnoj\\_muftoj/dm06/](https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/nasosy_s_magnitnoj_muftoj/dm06/)
56. ООО «Сервис-Автоматика» [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://s-a.in.ua/p54095242-datchik-davleniya-bar.html>
57. Тетеря О. І., Мартинов С. Ю., Назаров С.М. Методичні вказівки до виконання лабораторної роботи «Ознайомлення з технологією очищення господарсько-побутових стічних вод на прикладі роботи установок «ВІОТАЛ-Т» (Стандарт)» для студентів спеціальності 192 «Будівництво та цивільна інженерія» всіх форм навчання / Тетеря О. І., Мартинов С. Ю., Назаров С.М. – Рівне: НУВГП, 2017 – 21 с. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://ep3.nuwm.edu.ua/6086/1/03-06-70.pdf>
58. Українська макулатурна компанія [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://umktrade.com.ua/plyashkove-nashestyа/>
59. Производство кормового белка [Електронний ресурс] Режим доступу: [http://chemanalytica.com/book/novyj\\_spravochnik\\_khimika\\_i\\_tekhnologa/06\\_syre\\_i\\_produkty\\_promyshlennosti\\_organicheskikh\\_i\\_neorganicheskikh\\_veshchestv\\_c\\_hast\\_II/5415](http://chemanalytica.com/book/novyj_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/06_syre_i_produkty_promyshlennosti_organicheskikh_i_neorganicheskikh_veshchestv_c_hast_II/5415)
60. National Institute of Technology and Evaluation [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.nite.go.jp/nbrc/catalogue/NBRCCatalogueDetailServlet?ID=IFO&CAT=1940>

61. Climeworks [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.climeworks.com/co2-removal>
62. КОТЕЛ-КВ [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://kotel-kv.ru/ciklony-dlya-ochistki-vozduha.html>
63. Экономическая правда [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.epravda.com.ua/rus/news/2017/06/2/625610/>

## Скан-копія основного наукового джерела, використуваного під час роботи

Appl Microbiol Biotechnol (2009) 83:225–231  
DOI 10.1007/s00253-009-1871-5

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS AND PROCESS ENGINEERING

### Isolation of a novel high erythritol-producing *Pseudozyma tsukubaensis* and scale-up of erythritol fermentation to industrial level

Marimuthu Jeya · Kyoung-Mi Lee ·  
Manish Kumar Tiwari · Jung-Soo Kim ·  
Paramasamy Gunasekaran · Sang-Yong Kim ·  
In-Won Kim · Jung-Kul Lee

Received: 13 August 2008 / Revised: 10 January 2009 / Accepted: 11 January 2009 / Published online: 24 January 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** This study isolated a novel erythritol-producing yeast strain, which is capable of growth at high osmolarity. Characteristics of the strain include asexual reproduction by multilateral budding, absence of extracellular starch-like compounds, and a negative Diazonium blue B color reaction. Phylogenetic analysis based on the 26S rDNA sequence and physiological analysis indicated that the strain belongs to the species *Pseudozyma tsukubaensis* and has been named *P. tsukubaensis* KN75. When *P. tsukubaensis* KN75 was cultured aerobically in a fed-batch culture with glucose as a carbon source, it produced 245 g/L of erythritol, corresponding to 2.86 g/L/h productivity and 61% yield, the highest erythritol yield ever reported by an erythritol-producing microorganism. Erythritol production was scaled up from a laboratory scale (7 L fermenter) to

pilot (300 L) and plant (50,000 L) scales using the dissolved oxygen as a scale-up parameter. Erythritol production at the pilot and plant scales was similar to that at the laboratory scale, indicating that the production of erythritol by *P. tsukubaensis* KN75 holds commercial potential.

**Keywords** Dissolved oxygen · Erythritol · Fed-batch culture · *Pseudozyma tsukubaensis* · Scale-up production

#### Introduction

Polyols are a class of natural compounds that living things require for growth, carbon storage, reductant recycling, and efficient carbon fixation (Pharr et al. 1995). Erythritol, a four-carbon polyol, is a naturally occurring substance and is widely distributed in nature (Goossen and Röper 1994). Like most other polyols, it is a metabolite or storage compound in seaweed, mushrooms, and fruits. It is a noncaloric and noncariogenic sweetener that is safe for diabetics (Munro et al. 1998), and it occurs frequently in fermented food including wines, beers, and processed vegetables such as soy sauce and oriental miso bean paste (Shindoh et al. 1988a, b, 1989; Yoshida et al. 1984). Erythritol has the sweetness of 60–70% of sucrose in a 10% (w/v) solution, and many countries have safely used it in foods as a noncariogenic sweetener because of the inability of the bacteria that cause dental caries to use erythritol as a substrate (Kim et al. 2000). Because erythritol tastes sweet but leaves no bitter aftertaste, its use improves the taste of food in combination with intense sweeteners with a bitter aftertaste, such as aspartame.

M. Jeya · M. K. Tiwari · J.-S. Kim · I.-W. Kim · J.-K. Lee (✉)  
Department of Chemical Engineering, Konkuk University,  
1 Hwayang-Dong, Gwangjin-Gu,  
Seoul 143-701, South Korea  
e-mail: jkrhee@konkuk.ac.kr

K.-M. Lee · J.-K. Lee  
Institute of Biomedical Science and Technology,  
Konkuk University,  
1 Hwayang-Dong, Gwangjin-Gu,  
Seoul 143-701, South Korea

P. Gunasekaran  
Department of Genetics, School of Biological Sciences,  
Madurai Kamaraj University,  
Madurai 625021, India

S.-Y. Kim  
BioNgene Co., Ltd.,  
10-1, 1Ka Myungryun-Dong, Chongro-Ku,  
Seoul 110-521, South Korea

Chemical and fermentative processes have been introduced for large-scale production of erythritol. Erythritol can be synthesized from dialdehyde starch by chemical reaction at high temperatures in the presence of a nickel catalyst (Pfeifer et al. 1960). However, this process has not been industrialized because of its low efficiency. Erythritol also can be produced by microbial fermentation using osmophilic yeasts and some bacteria (Cunha et al. 1992; Ryu et al. 2000; Seo et al. 2001; Lee et al. 2002). Erythritol was found to be synthesized from erythrose-4-phosphate, an intermediate of the pentose phosphate cycle, by dephosphorylation followed by reduction of the resultant erythrose. Erythrose reductase, catalyzing this last step, is well known as a key enzyme for the biosynthesis of erythritol (Tokuoka et al. 1992; Lee et al. 2003).

Erythritol has been produced commercially using a mutant of *Aureobasidium* sp. that produced erythritol with a high yield of 44% (g/g) in a medium containing 40% glucose (Ishizuka et al. 1989). Subsequently, much attention has focused on screening for erythritol-producing microbes. A *Torula* sp. was isolated from a 40% sucrose solution (Kim et al. 2000), and supplemental  $Mn^{+2}$  and  $Cu^{+2}$  (Lee et al. 2000) improved the erythritol production of this strain to a 48.9% yield. This is the highest reported erythritol productivity and yield among erythritol-producing microorganisms.

Recently, we isolated a high erythritol-producing *Pseudozyma tsukubaensis* strain and deposited it as *P. tsukubaensis* KCCM 10356 in the Korean Culture Collection of Microorganisms (KCCM). We report here the characteristics of this novel yeast strain, which produces a high yield of erythritol (61% g/g) without producing by-products such as glycerol and ribitol. Further, we successfully scaled up the fermentation from 7 to 50,000 L fermenters for the industrial production of erythritol.

## Materials and methods

### Isolation of microorganism

Screening of erythritol-producing microorganisms was performed as follows: The samples collected from a sludge (Sorak Mountain, Korea) by the capillary tube method were diluted in 0.9% (w/v) saline, plated on potato dextrose agar, and the plates were incubated for 3 days. Morphologically different colonies were inoculated into a 3 mL of the growth medium containing 400 g/L glucose (Bioshop, Canada) and 10 g/L yeast extract (Bioshop, Canada) and incubated for 5 days with agitation (200 rpm) at 30°C. Initial screening of erythritol-producing strains was performed by paper chromatography to give 312 candidate strains. The concentration of erythritol in the culture of

screened erythritol producers was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC; Waters 510, Milford, MA, USA) and the strain that produced the highest concentration of erythritol was selected.

### 26S rDNA sequence and phylogenetic analysis

The D1/D2 domain of nuclear 26S rDNA was amplified and sequenced using the forward primer ACCCG CTGAA YTAA GCAT AT and reverse primer CTCCT TGGTC CGTGT TCAA GACGG (Van der Auwera et al. 1994). The amplified 26S rDNAs were purified using Wizard PCR prep (Promega, USA). The nucleotide sequences were determined with BigDye terminator cycle sequencing kits (PE Applied Biosystems, USA) following the manufacturer's instructions. The gel electrophoresis and data collection were performed on an ABI 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems). The sequences were proofread, edited, and merged into composite sequences using the PHYDIT program (version 3.1). The 26S rDNA D1/D2 sequence of the strain was aligned with other 26S rDNA sequences from the monophyletic group including *P. tsukubaensis* and *Ustilago trichophora* using the Clustal X program.

### Culture conditions

The growth medium consisted of 200 g/L glucose, 10 g/L yeast extract, 10 mg/L  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , and 2 g/L  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ . A single colony of *P. tsukubaensis* KN75 was inoculated in to 5 mL of growth medium in a test tube and incubated at 30°C, 250 rpm for 48 h. Five milliliters of this seed culture was transferred into a 500-mL baffled flask containing 100 mL growth medium and incubated at 30°C, 250 rpm for 24 h. This seed culture was then transferred into a baffled flask or a fermenter. Flask experiments were performed using 500-mL baffled flasks containing 100 mL production medium at 34°C, 250 rpm for 120 h. The initial pH of the production medium was adjusted to 5.5 and the pH of the flask culture was not controlled. In batch and fed-batch culture, the carbon and nitrogen sources were 300 g/L glucose and 15 g/L corn steep powder, respectively. Batch culture in a fermenter was performed with 7 L jar fermenters (KoBiotech Co.) containing 3 L production medium. The working volume in a fed-batch culture was increased from 2.4 to 3.0 L by continuously feeding 0.6 L of 80% glucose solution with a pump. Glucose feeding was performed at 24 to 48 h of fermentation to maintain glucose concentration of 225 g/L. The temperature and pH of the fermenter were controlled at 34°C and 5.5, respectively. The agitation speed was adjusted in the range of 500 to 850 rpm, in order to maintain the dissolved oxygen concentration (DO) above 5%. The aeration rate was kept at 0.5 vvm during fermentation.

### Pilot- and plant-scale culture

For the 300-L fermentation, the seed cultures were prepared as follows: The first seed culture was prepared in a 500-mL baffled flask in the same manner as previously described. For the second seed culture, the first seed of 50 mL was inoculated to a 7-L fermenter containing 4 L of seed medium and cultivated for 60 h at 30°C with 500 rpm and 1.0 vvm. The second seed of 10 L, obtained from two 7-L fermenters, was transferred to the 300-L fermenter (KoBio-Tech Co., Ltd.) containing 200 L of production medium and followed by cultivation for 120 h at 34°C with 260–480 rpm as the same velocity of impeller tip to 7-L fermenter and 1.0 vvm.

For the 20,000-L fermentation, the first and second seed cultures were prepared in the same manner as described previously. For the third seed culture, the second seed of 5 L was added to a 300-L fermenter containing 100 L of seed medium. Then, the culture broth was cultivated for 48 h at 30°C with 200 rpm and of 1.0 vvm. The third seed of 100 L was transferred to the 5,000-L fermenter (KoBioTech Co., Ltd.), containing 1,600 L of seed medium. Then, the culture broth was cultivated for 48 h at 30°C with 120 rpm and of 1.0 vvm. The fourth seed of 1,000 L was transferred to the 50,000-L fermenter containing 20,000 L of production medium and then cultivated for 120 h at 34°C with 110–170 rpm as the same velocity of impeller tip to 7-L fermenter and 1.0 vvm.

### Scanning electron microscopy

Samples were fixed for 2 h in a 2.5% paraformaldehyde–glutaraldehyde mixture buffered with 0.1 M phosphate (pH 7.2), postfixed for 1 h in 1% osmium tetroxide in the same buffer, dehydrated in graded ethanol, and finally substituted by isoamyl acetate. They were then dried under CO<sub>2</sub> using a critical point dryer (E3000, BioRad, Hercules, CA, USA). Finally, the samples were sputtered with gold using a coater (SC502, Polaron, West Sussex, UK) and were observed under a scanning electron microscope (SEM 515, Philips, The Netherlands).

### Analytical methods

The concentration of dissolved oxygen in the liquid phase was monitored with an Ingold polarographic electrode. The dry cell weight (DCW) was estimated from a calibration curve derived from the relationship between absorbance at 600 nm and dry cell weight. An OD<sub>660</sub> of 1.0 was equivalent to 400±21 mg DCW/L. Paper chromatography was run in the descending direction on Whatman filter paper no. 1, using an ethyl acetate/2-propanol/water (6:3:1) solvent system. The concentrations of erythritol, glucose,

and glycerol were determined by HPLC (Waters 510, Milford, MA, USA) on a high performance carbohydrate column coupled to a refractive index detector. The column was eluted with distilled water at 30°C and a flow rate of 1.0 mL/min. The <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum of the product (2%, 1 mL solution) was measured at 400 MHz (In D<sub>2</sub>O, 25°C, internal reference: 1,4-dioxane, 67.4 ppm) using a Jeol JNM-A400 NMR spectrometer. The yields of erythritol and other products were defined as grams of product formed per gram of glucose and were expressed in percentage.

### Statistical analyses of fermentation kinetic profiles

GraphPad Prism 5.0 version (GraphPad Software, Inc.) was used for the modeling and statistical analysis of fermentation profiles. To evaluate the effect of scale on fermentation performance, response profiles of biomass growth and erythritol production were compared between the 7- and 500-L scales and also between the 7- and 50,000-L scales. Assuming no difference (the null hypothesis), one model would adequately describe both sets of data for a given response, and any observed differences would be purely due to chance. However, if fermentation scale did have an effect on performance (the alternative hypothesis), then each set of data for a given response would be discrete and separate models would be required to fit the two data sets. The basis for this approach is described further by Motulsky and Christopoulos (2003). *F* test was performed and the significance of each coefficient was determined using *P* value. The *P* value is the probability of achieving a difference as large as or larger than observed if the null hypotheses (no effect of scale) were true. The *F* ratio was computed from the ratio of the mean sum of squared deviations of each group's mean from the overall mean and the mean sum of the squared deviations of each item from that item's group mean. If the null hypothesis is correct and hence the effect of scale is insignificant, we expect *P* value to be *P*>0.05*F*.

## Results

### Characteristics of the newly isolated yeast strain

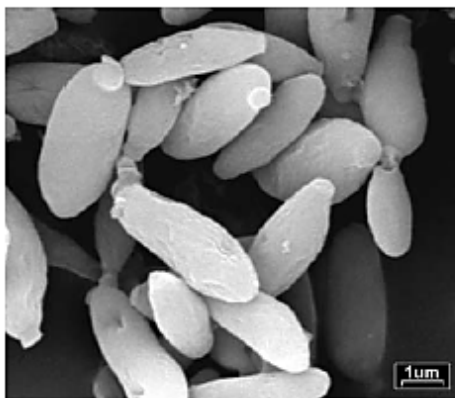
Among the 1,037 strains screened for erythritol production, 21 strains were found to be erythritol producers. One of these strains, KN75, produced erythritol in an exceptionally high concentration. The signals in the <sup>13</sup>C-NMR spectra of the product were identical to those of authentic erythritol (72.7 and 63.4 ppm). The morphological, cultural, and physiological characteristics of the new strain were examined according to the method of Barnett et al. (2000).

Scanning electron microscopy revealed that the morphology and size ( $1.5 \times 5.0 \mu\text{m}$ ) of the cells could best be described as those of typical yeast (Fig. 1). After 3 days growth in Luria–Bertani (LB) agar at  $25^\circ\text{C}$ , the cells were globose to spheroidal, glistening, and white to cream colored. Multilateral budding was observed. No pellicle was formed. Productions of amyloid compounds and the Diazonium blue B reactions were negative. Urea was not hydrolyzed. Sexual reproduction was not observed on 5% malt extract agar, acetate agar, yeast extract–malt extract agar, corn meal agar, potato dextrose agar, or V8 agar. No growth occurred in vitamin-free medium or in the presence of 1% acetic acid. Weak growth occurred on agar medium with 50% glucose, but not with 60% glucose. The culture grew in a medium with 10% (w/v) NaCl plus 5% (w/v) glucose. The optimum temperature and pH for growth in LB broth were  $37^\circ\text{C}$  and 6.0, respectively.

Strain identification was further confirmed by 26S rDNA sequence analysis according to the method of Kurtzman and Robnett (1998). The 26S rDNA sequence of the strain was found to be identical to that of *P. tsukubaensis* (Table 1). The sequence was submitted to the GenBank with accession number FJ265706. This strain exhibited an ability to ferment and assimilate various carbon sources similar to that of *P. tsukubaensis* (Boekhout 1995). Based on phylogenetic and physiological analyses, strain KN75 was identified as *P. tsukubaensis* and was deposited with accession number KCCM 10356 at the culture collection center.

#### Optimization of carbon and nitrogen sources for erythritol production

Various carbon and nitrogen sources were tested for maximum production of erythritol by *P. tsukubaensis* KN75. Among the various carbon sources tested (glucose, fructose, galactose, maltose, sucrose, dextrin, soluble starch, corn starch,



**Fig. 1** Scanning electron micrograph of *P. tsukubaensis* KN75. The scale bar is equal to  $1 \mu\text{m}$  and the total original magnification is  $\times 2,500$

**Table 1** Blast analysis of 26S rDNA of *P. tsukubaensis* KN75

Species	Accession no.	% Identity
<i>Pseudozyma tsukubaensis</i> CBS 6389T	AJ235297	100
<i>Ustilago trichophora</i> MP 1898	AJ236141	98.47
<i>Pseudozyma antarctica</i> CBS 214.83T	AJ235302	98.47
<i>Pseudozyma aphidis</i> CBS 517.83T	AJ235303	98.47
<i>Pseudozyma rugulosa</i> CBS 170.88T	AJ235300	98.3
<i>Ustilago affinis</i> M.P. 692	AF133581	97.63
<i>Pseudozyma fusiformata</i> CBS 6951T	AJ235304	97.62
<i>Ustilago nuda</i> H.U.V. 17782	AJ236139	97.54
<i>Pseudozyma flocculosa</i> CBS 167.88T	AJ235299	97.45
<i>Ustilago avenae</i> GD 1292	AJ236140	97.28
<i>Ustilago maydis</i> NRRL Y-1639	AJ235275	96.6
<i>Ustilago cynodontis</i> MP 1838	AF009881	96.48
<i>Ustilago scitaminea</i> MP 541	AJ236138	96.44
<i>Pseudozyma prolifica</i> CBS 319.87T	A235298	96.26
<i>Ustilago hordei</i> 11.2C	L20286	96.17

glycerol, and soybean oil), erythritol production was the highest when glucose was used as a carbon source (Table 2). Various nitrogen sources such as corn steep powder, soybean flour, potato protein, yeast extract, peptone, malt extract, beef extract, tryptone, and soytone were also tested. Corn steep powder was the best nitrogen source for erythritol production, and the next best was yeast extract (Table 3). In a batch culture in a flask, erythritol production was the highest ( $72 \text{ g/L}$ ) in a fermentation medium with  $300 \text{ g/L}$  of glucose and  $15 \text{ g/L}$  of corn steep powder.

#### Optimization of cultivation temperature, pH, and DO for erythritol production

Fed-batch culture was performed with an initial glucose concentration of  $300 \text{ g/L}$ , because the batch culture at this concentration exhibited the maximum volumetric productivity

**Table 2** Effect of various carbon sources on cell growth and erythritol production

Carbon source (300 g/L)	DCW (g/L)	Erythritol concentration (g/L)	Erythritol yield (g/g, %)	Erythritol productivity (g/L/h)
Glucose	$13.5 \pm 2.1$	$134 \pm 12$	$44.7 \pm 4.8$	$1.49 \pm 0.13$
Fructose	$15.2 \pm 1.7$	$60.7 \pm 7.2$	$20.2 \pm 1.5$	$0.67 \pm 0.08$
Galactose	$13.5 \pm 1.2$	$77.8 \pm 6.7$	$25.9 \pm 3.0$	$0.86 \pm 0.07$
Mannose	$14.7 \pm 2.0$	$93.3 \pm 9.1$	$31.1 \pm 4.1$	$1.04 \pm 0.08$
Sucrose	$11.4 \pm 1.6$	$101 \pm 9.3$	$33.8 \pm 3.5$	$1.13 \pm 0.12$
Sorbose	$9.0 \pm 1.3$	$39.9 \pm 4.9$	$13.3 \pm 1.5$	$0.44 \pm 0.05$
Glycerol	$8.2 \pm 1.0$	$11.3 \pm 1.4$	$3.8 \pm 0.4$	$0.13 \pm 0.01$
Lactose	$2.5 \pm 0.6$	$9.1 \pm 1.0$	$3.0 \pm 0.4$	$0.10 \pm 0.01$

All baffled flasks containing  $100 \text{ mL}$  of production medium were incubated at  $34^\circ\text{C}$  and  $250 \text{ rpm}$  for  $120 \text{ h}$ . Yeast extract ( $25.0 \text{ g/L}$ ) was used as a nitrogen source. Each value represents the mean of triplicate measurements and varied from the mean by not more than 15%

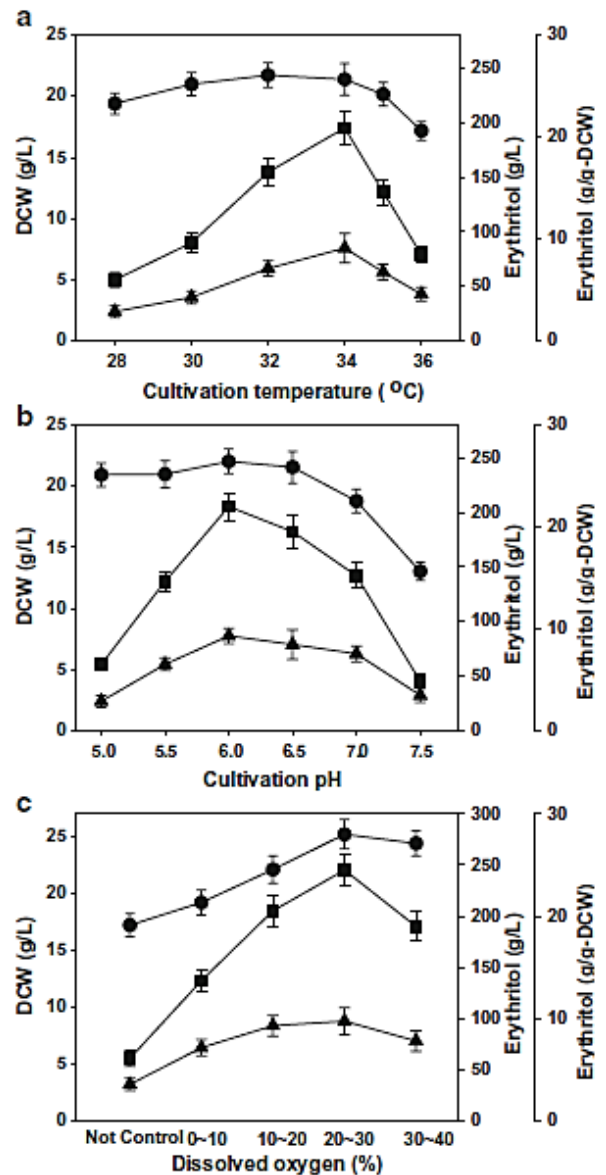
**Table 3** Effect of various nitrogen sources on cell growth and erythritol production

Nitrogen source (g/L)	DCW (g/L)	Erythritol concentration (g/L)	Erythritol yield (g/g, %)	Erythritol productivity (g/L/h)
Yeast extract (25.0)	13.5±2.1	134±12	44.7±4.8	1.49±0.13
Com steep powder (15.0)	12.8±1.1	149±16	49.7±5.3	1.65±0.18
Casamino acid (20.0)	6.7±1.3	75.4±6.6	25.1±2.8	0.84±0.09
Malt extract (24.3)	10.4±1.2	85.5±9.2	28.5±3.2	0.95±0.11
Beef extract (19.5)	9.7±1.3	76.1±8.4	25.4±2.9	0.84±0.10
Peptone (17.4)	6.3±1.0	50.4±6.7	16.8±1.8	0.56±0.06
Tryptone (20.0)	7.2±1.1	65.8±7.5	21.9±2.4	0.73±0.09

All flasks were incubated at 34°C and 200 rpm for 120 h. Glucose (300 g/L) was used as a carbon source. The quantity of used nitrogen source corresponds to nitrogen content of 25.0 g/L yeast extract. Each value represents the mean of triplicate measurements and varied from the mean by not more than 15%

of erythritol (2.98 g/L/h). Fermentation was carried out between 28°C and 36°C at pH 6.0, to maximize erythritol production in a 7-L fermenter. Although DCW produced was similar at temperatures of 30°C and 34°C (pH 6.0), erythritol concentration was the highest (197 g/L) at 34°C (Fig. 2a). From 28°C to 34°C, erythritol production improved gradually, but decreased significantly at 36°C. Fermentation was carried out at pH levels from 5.0 to 7.5 and at a temperature of 34°C, and the maximum erythritol concentration (205 g/L) was obtained at pH 6.0 (Fig. 2b). Based on these results, the fermentation medium's pH and temperature were kept at 34°C and 6.0, respectively, in all subsequent experiments.

We investigated the effect of DO on growth and maximum erythritol concentration was investigated in a 7-L fermenter (Fig. 2c). Initially, DO was not controlled, but after 36 h of culture, DO was limited to 0–10%, 10–20%, 20–30%, and 30–40% by adjusting the agitation speed. The DCW from fermentation without DO control was 17.2 g/L after 36 h and did not increase further. As DO increased to 30%, DCW (25.2 g/L) and erythritol concentration (245 g/L) increased significantly. When DO increased to 40%, however, erythritol concentration (190 g/L) decreased despite a similar DCW (24.4 g/L). Erythritol production was the highest at a DO between 20% and 30%.



**Fig. 2** a Effect of cultivation temperature on cell growth and erythritol production. Fermentation was performed in a 7-L fermenter containing 3 L production medium for 120 h at pH 6.0. DO was controlled between 10% and 20%. b Effect of fermentation pH on cell growth and erythritol production. Fermentation was performed for 120 h at 34°C. DO was controlled between 10% and 20%. c Effect of DO on cell growth and erythritol production. Fermentation was performed for 120 h at 34°C. DCW (circle), erythritol concentration (square), specific erythritol content (triangle)

#### Scale-up of erythritol production from a laboratory scale to pilot and plant scales

Production of erythritol was scaled up from laboratory scale (7-L fermenter) to pilot (300 L) and plant (50,000 L) scales.

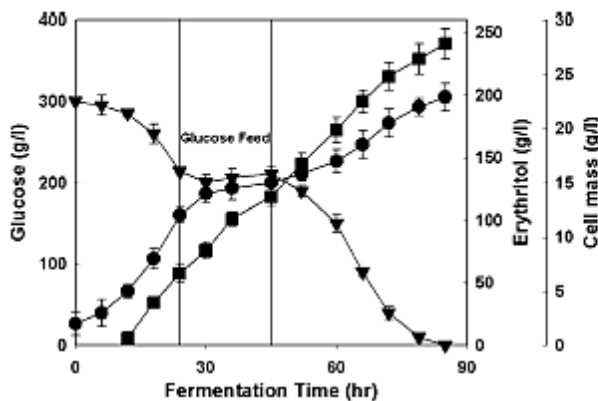


Fig. 3 Profiles of DCW and erythritol production at plant scale (50,000 L fermenter) culture with *P. tsukubaensis*. DCW (circle), erythritol concentration (square), glucose concentration (triangle)

DO was used as a scale-up parameter. During upscaling, the DO value was maintained between 20% and 30% air saturation without high shear forces. Based on the tip speed of bench scale fermentation, all fermentation studies employed a constant tip speed of less than 5.02 m/s. At the pilot scale of fed-batch fermentation, the DCW and erythritol concentration reached 23.5 and 237 g/L, respectively, after 85 h. At the plant scale (Fig. 3), the level of glucose in the medium started to decline significantly after 18–24 h. Hence, to maintain a glucose concentration of 225 g/L, glucose was fed at 24 to 48 h of fermentation, which increased erythritol production. The DCW and erythritol concentration reached 22.8 and 241 g/L, respectively, after 85 h, corresponding to a volumetric production rate of 2.84 g/L/h (Table 4). The concentration of erythritol produced in the pilot and plant scales was similar.

Table 5 lists the *P* values resulting from statistical analyses of the effect of scale on biomass concentration and erythritol production profiles. All profiles were statistically similar at a significance level of 0.05, indicating excellent agreement between all growth and erythritol production.

Table 5 Comparison of jar fermentation kinetic profiles to those from pilot and plant scale fermentation at matched  $V_{sp}$  conditions

Kinetic profile	P values	
	7 vs. 300 L	7 vs. 50,000 L
Biomass growth	0.52	0.38
Erythritol production	0.14	0.45

*P* values shown are from *F* tests on pairs of profiles for biomass and erythritol concentration. The null hypothesis, which states that there is no overall difference between each pair of profiles, is accepted if  $P > 0.05$

## Discussion

Erythritol is of industrial interest as an alternative sweetener because it has low calorie, insulin independent, and noncarcinogenic (Roepers and Goossens 1993). The present study identified a novel erythritol-producing yeast strain, KN75, as *P. tsukubaensis* on the basis of physiological and phylogenetic analysis. Erythritol productivity of *P. tsukubaensis* KN75 was compared to that of other microorganisms that have been reported to produce high levels of erythritol (Table 4). *P. tsukubaensis* KN75 exhibited the highest erythritol yield (61%) from glucose and the highest volumetric productivity of erythritol (2.86 g/L/h) yet reported.

Previous researches (Hirata et al. 1999; Lin et al. 2001) were focused mainly on erythritol-producing microorganisms and on optimizing fermentation conditions in batch culture. Hanjny et al. (1964) found that the yeast-like fungus *Moniliella tomentosa* var. *pollinis* produced erythritol in a medium containing 36% glucose, resulting in a conversion yield of 46%. *Aureobasidium* sp. SN-124A mutant and osmophilic yeast *Trichosporonoides* sp. converted glucose to erythritol with 48% and 43% yields, respectively (Ishizuka et al. 1989; Marina et al. 1993). In this study, maximum erythritol production (245 g/L) with a 61% conversion yield from glucose was observed. Compared to other reported erythritol-producing strains, *P.*

Table 4 Erythritol productions from various microorganisms

Microorganism	Glucose (g/L)	Erythritol (g/L)	$Q_p$ (g/L/h)	$Y_{P/S}$ (g-erythritol/g-glucose)	Working vol. (L)	Reference
<i>Aureobasidium</i> sp.	400	175	1.82	0.44	5	Ishizuka et al. 1989
<i>Moniliella tomentosa</i> var. <i>pollinis</i>	357	133	0.79	0.37	5	Hanjny et al. 1964
<i>Trichosporon</i> sp.	300	138	1.23	0.46	5	Park et al. 1998
Fed-batch culture	333	150	1.50	0.45		
<i>Torula</i> sp. (fed-batch culture)	400	192	2.26	0.48	5	Oh et al. 2001
<i>P. tsukubaensis</i> (batch culture)	400	243	1.65	0.61	50,000	This study
<i>P. tsukubaensis</i> (fed-batch culture)	400	241	2.84	0.60	50,000	This study

$Q_p$  volumetric productivity of erythritol,  $Y_{P/S}$  erythritol yield from glucose

*tsukubaensis* KN75 can be a potential candidate for the industrial production of erythritol.

At the pilot (300 L) and plant (50,000 L) scales, the values for DCW and final erythritol production were similar to those obtained at the laboratory scale (7 L). A statistical comparison of the fermentation data obtained at different scales was also performed with regard to kinetic profiles for cell growth and erythritol production. This analysis examines the similarity of data sets over the entire course of cell growth and clearly indicates how well the jar fermentation results are reproduced at large scales. In summary, we describe the isolation of a novel erythritol-producing *P. tsukubaensis* and the optimization of culture conditions for *P. tsukubaensis* KN75, which produces the highest concentration of erythritol. Among the culture conditions tested for erythritol production, DO was the key factor affecting not only cell growth but also erythritol production. Erythritol production was successfully increased from the laboratory scale to the pilot and plant scales. Our results indicate that the production of erythritol by *P. tsukubaensis* KN75 holds commercial potential. Further, optimization of the culture conditions, along with the selection of mutants that show increased productivity, should allow even higher levels of erythritol production and contribute to improving the industrial production of erythritol using biological processes.

**Acknowledgments** This work was supported by the 21C Frontier Microbial Genomics and Applications Center Program, Ministry of Education, Science & Technology, Republic of Korea.

## References

- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (2000) Yeasts: characteristics and identification, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 1139–1142
- Boekhout T (1995) *Pseudozyma* Bandoni emend. Boekhout, a genus for yeast-like anamorphs of Ustilaginales. J Gen Appl Microbiol 41:359–366
- Cunha M, Firme P, San Romao MV, Santos H (1992) Application of nuclear magnetic resonance to elucidate the unexpected biosynthesis of erythritol by *Leuconostoc oenos*. Appl Environ Microbiol 58:2271–2279
- Goossen J, Röper H (1994) Erythritol, a new sweetener. Confect Prod 24:182–188
- Hanjny GJ, Smith JH, Garver JC (1964) Erythritol production by a yeast like fungus. Appl Microbiol 12:240–246
- Hirata Y, Igarashi K, Ezaki S, Atomi H, Imanaka T (1999) High-level production of erythritol by strain 618A-01 isolated from pollen. J Biosci Bioeng 87:630–635
- Ishizuka H, Wako H, Kasumi T, Sasaki T (1989) Breeding of a mutant of *Aureobasidium* sp. with high erythritol production. J Ferment Bioeng 68:310–314
- Kim KA, Lee JK, Kim SY, Oh DK (2000) Optimization of culture conditions for erythritol production by *Torula* sp. J Microbiol Biotechnol 10:69–74
- Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie Van Leeuwenhoek 73:331–371
- Lee JK, Ha SJ, Kim SY, Oh DK (2000) Increased erythritol production in *Torula* sp by Mn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>. Biotechnol Lett 22:983–986
- Lee JK, Koo BS, Kim SY (2002) Fumarate-mediated inhibition of erythrose reductase, a key enzyme for erythritol production by *Torula corallina*. Appl Environ Microbiol 68:4534–4538
- Lee JK, Jung HM, Kim SY (2003) 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin biosynthesis inhibitors increase erythritol production in *Torula corallina*, and DHN-melanin inhibits erythrose reductase. Appl Environ Microbiol 69:3427–3434
- Lin SJ, Wen CY, Liao JC, Chu WS (2001) Screening and production of erythritol by newly isolated osmophilic yeast-like fungi. Process Biochem 36:1249–1258
- Marina AYA, Glauca MP, Park YK (1993) Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol. Biotechnol Lett 15:383–388
- Motulsky HJ, Christopoulos A (2003) Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. Graphpad Software Inc., San Diego, CA
- Munro IC, Bernt WO, Borzelleca JF, Flamm G, Lynch BS, Kennepohl E, Bar EA, Modderman J (1998) Erythritol: an interpretive summary of biochemical, metabolic, toxicological and clinical data. Food Chem Toxicol 36:1139–1174
- Oh DK, Cho CH, Lee JK, Kim SY (2001) Increased erythritol production in fed-batch cultures of *Torula* sp. by controlling glucose concentration. J Ind Microbiol Biotech 26:248–252
- Park JB, Seo BC, Kim JR, Park YK (1998) Production of erythritol in fed-batch cultures of *Trichosporon* sp. J Ferment Bioeng 86:577–580
- Pfeifer VF, Sohns VE, Conway HE, Lancaster EB, Dabic S, Griffin EL Jr (1960) Two-stage process for dialdehyde starch using electrolytic regeneration of periodic acid. Ind Eng Chem 52:201–205
- Pharr DM, Stoop JMH, Studer-Feusi ME, Williamson JD, Massel MO, Cokling MA (1995) Carbon partitioning and source-sink interactions in plants. In: Madore MA, Lucas WJ (eds) Current topics in plant physiology. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA, pp 180–185
- Roeper H, Goossens J (1993) Erythritol, a new raw material for food and non-food applications. Starch/Staerke 45:400–405
- Ryu YW, Park CY, Park JB, Kim SY, Seo JH (2000) Optimization of erythritol production by *Candida magnoliae* in fed-batch culture. J Ind Microbiol Biotech 25:100–103
- Seo JH, Ryu YW, Jung SR, Kim SY (2001) Fermentation processes for preparing erythritol by a high salt tolerant mutant of *Candida* sp. Patent US 6, 287,830 B1
- Shindoh T, Sasaki Y, Miki H, Eguchi T, Hagiwara K, Ichikawa T (1988a) Determination of erythritol in fermented foods by high performance liquid chromatography. Shokuhin Eiseigaku Zasshi 29:419–422
- Shindoh T, Sasaki Y, Miki H, Hagiwara K, Ichikawa T (1988b) Determination of erythritol in fruits and fermented foods by high performance liquid chromatography. Nippon Nogeikagaku Kaishi 62:623–626
- Shindoh T, Sasaki Y, Miki H, Eguchi T, Hagiwara K, Ichikawa T (1989) Identification of erythritol by HPLC and GC-MS and quantitative measurement in pulps of various fruits. Agric Food Chem 37:1474–1476
- Tokuoka K, Ishizuka H, Wako K, Taniguchi H (1992) Comparison of three forms of erythrose reductase from an *Aureobasidium* sp. mutant. J Gen Appl Microbiol 38:145–155
- Van der Auwera G, Chapelle S, De Wachter R (1994) Structure of the large ribosomal subunit RNA of *Phytophthora megasperma*, and phylogeny of the oomycetes. FEBS Lett 338:133–136
- Yoshida H, Sugawara T, Hayashi J (1984) Studies in free sugars and free sugar alcohols of mushrooms. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 31:765–771

## Скан-копії наукових джерел, використаних для порівняння БА

974

S.-J. Lin et al. / Process Biochemistry 45 (2010) 973–979

As reported in the previous paper, we screened 658 strains grown on various sources, such as pollen, honey, and high sugar foods, and were able to isolate 6 high erythritol-producing microorganisms [17]. One of these, *Montillella* sp. 440, produces erythritol with a 38.8% yield on media containing 30% glucose. In this study, we mutated this strain and obtained a mutant with significantly higher erythritol productivity. We also investigated the optimal culture conditions for erythritol production in the mutant strains.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Yeast extract was purchased from DIFCO (Detroit, MI, USA). Corn steep liquor was obtained from Fon Nien Co., Ltd. (TaoYuan, Taiwan). All carbohydrates used for substrates and other chemicals used were reagent grade.

### 2.2. Microorganism and cultivation

*Montillella* sp. 440 was isolated from honey obtained from the Institute of Bee Breeding in Taiwan [17]. The standard cultivation was done by transferring single colonies of the strain from plates to 10 mL of media consisting of 30–50% glucose and 1.0% yeast extract (pH 5.5) in 50-mL flasks. The flasks were shaken (180 rpm) at 30 °C for 5–6 days.

had the same profiles, with a maximal yield occurring at 30 °C. Higher temperature (37 °C) resulted in sharp decrease, not only in erythritol yield, but also in growth. In the case of 440, the erythritol yield decreased from 34.5% to 17.3% at 30 °C and 37 °C. N61188-12 showed a similar tendency with an even more sensitive response to high temperature. Less than 6% erythritol was produced at 37 °C.

To study the effect of pH on erythritol production, 440 and N61188-12 were cultured in 35% glucose media with pH values ranging from 3.0 to 7.0 (Table 3). Strain 440 produced comparable amounts of erythritol in the pH range of 4.0–7.0. Both the maximal growth ( $A_{660}$ , 74.0) and erythritol yield (39.3%) were achieved at pH 4.0. However, the erythritol yield tended to decline as the pH reached 3.0. On the other hand, erythritol yield from N61188-12 was not affected by pH, and ranged between 56.6% and 60.3%.

### 3.4. Production of erythritol in jar fermentors

#### 3.4.1. Batch fermentation

In addition to the experiments performed in shake flasks, the mutant strains, N42208-2 or N61188-12, were cultured in 35% glucose in jar fermentors. Batch cultures in 5-L and 20-L jar fermentors were carried out with strain 42208-2 at 35 °C. The fermentation took 120 h with a maximal erythritol production of 142 g/L at the 5-L scale, and 160 h with erythritol production of 160 g/L at the 20-L scale. Pilot plant scales of batch culture in jar fermentors at scales of 250 L and 2000 L were carried out with strain N61188-12 (Fig. 2). Because the conversion of erythritol from glucose by N61188-12 is sensitive to external high temperatures, the cultural temperature was decreased from 35 °C to 30 °C. The fermentation took 205 h with a maximal erythritol production of 151.4 g/L at the 250-L scale, and 234 h with erythritol production of 152.4 g/L at the 2000-L scale.

### 2.5. Hydrophobic degree (HD)

HD measurements were performed in an assay modified from Iimura et al. [19]. The strains were incubated in GY medium at 175 rpm and 30 °C for 5–6 days. After centrifugation, the cells were washed twice in 10 mL of distilled water, and resuspended in distilled water to  $A_{660}$  of about 0.6. Equal volumes of toluene were added to the suspension, and then mixed to homogeneity. The  $A_{660}$  values were then measured after standing for 30 min. The HD value was calculated by the following formula:  $HD = 100 \times (1 - R/I)$ , where  $I$  is the  $A_{660}$  absorbance of the sample before toluene treatment and  $R$  is the  $A_{660}$  absorbance of the sample after toluene treatment.

### 2.6. Microscopy

Morphological observations were made, as described below: strains 440 and N61188-12 were cultivated in a medium containing 40% glucose and 1% yeast extract at 30 °C for 5 days and observed on a DAS Mikroskop LEICA DM RXA light microscope (Leica Microsystems, Germany).

### 2.7. Fermentation and erythritol production

Fermentation media contained 20–50% glucose and 1% yeast extract with a pH of about 6.5. A flask containing 50 mL of the culture medium was sterilized and inoculated at 1% with an overnight culture. The cultures were incubated at 30 °C and 200 rpm for 6 days. After centrifugation, the supernatant was analyzed by HPLC.

### 2.8. Production of erythritol in fermentors of various scales

#### 3.4.2. Fed-batch cultures

To maximize total erythritol productivity, the initial conditions for the batch culture stage were investigated. We selected 1% yeast extract as the nitrogen source and 35% glucose as the carbon source. A simple fed-batch fermentation of N61188-12 was conducted in an attempt to increase the production of erythritol. At this point, 48% of the glucose had been converted to erythritol. A solution of 70% glucose, 1% yeast extract was pulse-fed at 137 h as shown in Fig. 3. After the glucose feeding, the biomass increased slightly, and the concentration of glycerol increased gradually in parallel with the cell growth (data not shown). In this experiment, the concentration of glucose was not maintained at a constant level; however, the erythritol productivity (0.8 g/L/h) and conversion yield (48%) remained at constant levels after glucose feeding. During the fermentation, the pH of the medium generally decreased from 4.4 to 2.5 and stabilized at pH 2.5 from the middle stationary phase of the fermentation. It is notable that the growth of the culture was not affected by low pH, and these results imply that the growth of N61188-12 is acid-resistant during fermentation. In this study, DO was not controlled. Initially, DO was down to 45% after 15 h of cultivation, and decreased to 13% after 21 h further, but the culture growth ( $A_{660}$ ) increased significantly from 13.5 to 28.4. DO had increased by 63% at 39 h and then leveled off, as was detected by the DO reading climbing to 43.0 and then remaining in the range of 60.0–70.0 until the end of experiment. Moreover, erythritol production increased exponentially with a productivity of 1.44 g/L/h between 39 h and 91 h of cultivation. Glucose was completely consumed and the erythritol concentration in the medium reached 189.4 g/L by 249 h.

In other experiments, 4% corn steep liquor had been found to be comparable to 1% Difco yeast extract as nitrogen source. In experiments performed in a 250-L fed-batch fermentor, we replaced the 1% yeast extract with 1–4% corn steep liquid or 2% yeast power,

## Increased erythritol production in *Torula* sp. with inositol and phytic acid

Jung-Kul Lee<sup>1</sup>, Suk-Jin Ha<sup>1</sup>, Sang-Yong Kim<sup>1</sup> & Deok-Kun Oh<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Dongcheon Consulting, Kyonggi-Do 445-930, Korea

<sup>2</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Sejong University, Seoul 143-747, Korea

\*Author for correspondence (Fax: +82-2-3408-3569; E-mail: deokkun@sejong.ac.kr)

Received 13 December 2000; Revisions requested 3 January 2001; Revisions received 30 January 2001; Accepted 30 January 2001

**Key words:** erythritol, inositol, phytic acid, *Torula* sp., vitamins

### Abstract

Of the vitamins tested, inositol was the most effective for erythritol production. To increase erythritol production by *Torula* sp., inositol and a related compound, phytic acid (myo-inositol hexaphosphate), were added to the culture media. Erythritol production in the presence of phytic acid was greater than that in the presence of inositol, due to the synergistic effects of phosphate and inositol. Supplementation with phosphate and inositol increased cell growth, erythritol production, and the activity of erythrose reductase in cells. Inositol was a more effective stimulator of cell growth and erythritol production than was phosphate.

### Introduction

Erythritol is a four-carbon polyol used as a food ingredient. Other polyols with similar properties include xylitol, sorbitol, mannitol, maltitol, lactitol, and isomaltitol (Bilanx *et al.* 1991). Erythritol is a naturally occurring substance that is widely distributed in nature. It is a metabolite or storage compounds in seaweed and fungi, and is also found in fruits, such as melons, grapes, and pears. It occurs frequently in fermented foods, including wines and beers, and in processed vegetables, such as soy sauce and oriental miso bean paste (Goossen & Röper 1994).

Erythritol can be produced by microbial methods using osmophilic yeasts and some bacteria (Onishi 1967, Cunha *et al.* 1992, Aoki *et al.* 1993). It has also been produced commercially using a mutant of *Aureobasidium* (Ishizuka *et al.* 1989), which was isolated and developed in cooperative studies involving Nikken Chemical and the National Research Institute of Japan. The mutant produces erythritol at a rate of 1.8 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> with a 44% yield in a medium containing 40% glucose.

In this study, *Torula* sp. was isolated from a 40% sucrose solution (Kim *et al.* 1999), and erythritol production of the strain was improved with supplemented

Mn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> (Lee *et al.* 2000). The effect of vitamins on erythritol production has not previously been studied; therefore, this study investigated the effects of selected vitamin and related compound on erythritol production.

### Materials and methods

#### *Microorganism and media*

*Torula* sp. was isolated from a 40% sucrose solution at Bolak Co., Osan, Korea (Kim *et al.* 1999). The growth medium consisted of 200 g glucose l<sup>-1</sup> and 10 g yeast extract l<sup>-1</sup>. For flask cultures, the production medium contained 200 g glucose l<sup>-1</sup>, 10 g yeast extract l<sup>-1</sup>, and either vitamins or 3.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and/or 0.5 mM inositol or 0.5 mM phytic acid (myo-inositol hexaphosphate). For fermenter experiments, the production medium contained 400 g glucose l<sup>-1</sup>, 20 g yeast extract l<sup>-1</sup>, and either 3.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, or both 0.5 mM inositol and 3.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, or 0.5 mM phytic acid. See Table 1 for the vitamin concentrations (mg l<sup>-1</sup>) used.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  and inositol, and a culture with phytic acid. Glucose consumption and cell growth of the four cultures are shown in Figure 1. The glucose consumption rate of the control was slower than that of cultures containing phosphate and inositol. The glucose consumption rates of cultures containing either phosphate and inositol, or phytic acid were faster than those of cultures containing phosphate alone. These results suggest that inositol is a more effective stimulator of glucose consumption rate than is phosphate. Glucose was completely consumed in the culture containing phytic acid first, and then at approximately the same times in cultures containing phosphate, and both phosphate and inositol. There were distinct differences in cell growth between cultures containing inositol and those without inositol. The cultures with inositol had higher cell concentrations, suggesting that inositol stimulated the growth of *Torula* sp.

The presence of inositol and phytic acid markedly enhanced erythritol production (Figure 2). The differences in erythritol production between cultures with and without inositol were not large in the first 70 h, but became more marked after 70 h. The final concentration of erythritol produced from  $400 \text{ g glucose l}^{-1}$  in the control culture was  $155 \text{ g l}^{-1}$  after 144 h. The concentration increased to  $158 \text{ g l}^{-1}$  at 144 h with supplemental  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $178 \text{ g l}^{-1}$  at 135 h with supplemental  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and inositol, and  $182 \text{ g l}^{-1}$  at 135 h with supplemental phytic acid. The volumetric rate of erythritol production and the erythritol yield from glucose were  $1.08 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and 38.7% in the control culture, respectively. The respective values increased to  $1.21 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and 39.5% with  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1.32 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and 44.5% with  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and inositol,

and  $1.35 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and 45.5% with phytic acid. These results suggest that inositol and phosphate stimulate cell growth and erythritol production. Furthermore, inositol is a more effective stimulator of cell growth and erythritol production than is phosphate.

## References

- Aoki MAY, Pastore GM, Park YK (1993) Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol. *Biotechnol. Lett.* 15: 383–388.
- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1995) *Short Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons, pp. 13–51.
- Bilanz MS, Flourie B, Jaquemmin C, Messing B (1991) Sugar alcohols. In: Marie S, Pogolt FR, eds. *Handbook of Sweeteners*. Glasgow: Blackie Academic & Professional, p. 72.
- Chang C, Knight SG (1966) D-Xylose reductase and xylitol dehydrogenase from *Penicillium chrysogenum*. *Meth. Enzymol.* 9: 188–193.
- Cunha M, Firme P, San Romao MV, Santos H (1992) Application of nuclear magnetic resonance to elucidate the unexpected biosynthesis of erythritol by *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2271–2279.
- Goossen J, Röper H (1994) Erythritol, a new sweetener. *Confect. Prod.* 24: 182–188.
- Ishizuka H, Wako H, Kasumi T, Sasaki T (1989) Breeding of a mutant of *Aureobasidium* sp. with high erythritol production. *J. Ferment. Bioeng.* 68: 310–314.
- Kim KA, Noh BS, Kim SY, Oh DK (1999) Effect of osmotic pressure of salts on growth of *Torula* sp. and erythritol production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 91–95.
- Kim KA, Noh BS, Lee JK, Park YC, Kim SY, Oh DK (2000) Optimization of culture conditions for erythritol production by *Torula* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 69–74.
- Lee JK, Ha SJ, Kim SY, Oh DK (2000) Increased erythritol production in *Torula* sp. by  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ . *Biotechnol. Lett.* 22: 983–986.
- Onishi H (1967) Production of polyalcohols by yeasts. *Japan Ferment. Technol.* 25: 495–506.

Full Length Research Paper

## Erythritol biosynthesis by *Yarrowia lipolytica* yeast under various culture conditions

Anita Rywińska\*, Ludwika Tomaszewska and Waldemar Rymowicz

Department of Biotechnology and Food Microbiology Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Chelmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław, Poland.

Accepted 12 June, 2013

Erythritol is a natural compound of great interest in food production because of its very low caloric value, lack of off-taste and lack of side-effects from the gastric system even when consumed with in excess. In the present study, the effect of agitation rates from 500 to 1100 rev/min on biomass and erythritol production on glycerol media by an acetate-negative mutant of *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 in batch culture was studied. At a constant aeration rate of 0.36 vvm, the agitation rate between 500 and 900 rev/min was found suitable for efficient erythritol production. In the pure glycerol-containing media the erythritol production of 40.7 g/l, corresponding to a 0.28 g/g yield, was achieved at 800 rev/min. The application of crude glycerol at 800 rev/min and 0.6 vvm elicited an increase in erythritol concentration to 58.2 g/l corresponding to a 0.38 g/g yield and a productivity of 0.78 g/lh.

**Key words:** *Yarrowia lipolytica*, erythritol, glycerol, agitation rate, aeration rate.

Wratislavia K1 of *Y. lipolytica*.

Inc.). Statistical differences at  $p < 0.05$  were considered to be significant.

### MATERIALS AND METHODS

#### Microorganism

*Y. lipolytica* Wratislavia K1 used in this study originated from the yeast culture collection of the Department of Biotechnology and Food Microbiology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences in Poland (Rywińska et al., 2010).

#### Culture preparation

The growth culture was prepared as described by Tomaszewska et al. (2012). An inoculum of 0.2 l was introduced into a bioreactor containing 1.8 l of the production medium which consisted of: 150 g of glycerol, 3 g of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 g of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 1 g of a yeast extract per liter of tap water. Unpurified crude glycerol from methyl ester production (SG BODDINS GmbH; Germany)

### RESULTS AND DISCUSSION

The effect of agitation rate in the range of 500 - 1100 rev/min on the growth and erythritol production by *Y. lipolytica* Wratislavia K1 was investigated. The cells were grown in the media containing pure or crude glycerol, while pH was maintained at a constant value of 3.0. Table 1 shows a comparison of total time of erythritol production, biomass concentration and maximum specific growth rate in dependence on the used agitation rate value and kind of glycerol. In Figure 1 as the examples of the time courses of glycerol consumption and biomass production during batch cultivations, the cultures conducted in the media with crude glycerol at 0.36 and 0.6 vvm are presented. Glycerol was completely exhausted within

**Table 1.** Comparison of the total cultivation time, maximal biomass concentration and maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) during erythritol biosynthesis by *Y. lipolytica* Wratislavia K1 strain at various culture conditions

Agitation rate (rev/min)	Time (h)	Biomass* (g/l)	$\mu_{max}$ * (1/h)
<b>Pure glycerol</b>			
500 <sup>1</sup>	77.5	19.8 <sup>ab</sup>	0.149 <sup>f</sup>
600 <sup>1</sup>	73.5	18.8 <sup>a</sup>	0.169 <sup>bc</sup>
700 <sup>1</sup>	74.5	19.1 <sup>a</sup>	0.170 <sup>bc</sup>
800 <sup>1</sup>	78.0	19.3 <sup>ab</sup>	0.177 <sup>ab</sup>
900 <sup>1</sup>	77.0	19.4 <sup>ab</sup>	0.18 <sup>ab</sup>
1000 <sup>1</sup>	79.0	20.2 <sup>ab</sup>	0.22 <sup>e</sup>
1100 <sup>1</sup>	75.5	20.3 <sup>ab</sup>	0.217 <sup>e</sup>
<b>Crude glycerol</b>			
600 <sup>1</sup>	71	24.0 <sup>c</sup>	0.152 <sup>cf</sup>
800 <sup>1</sup>	75.5	25.0 <sup>c</sup>	0.191 <sup>bd</sup>
800 <sup>2</sup>	74.5	24.2 <sup>c</sup>	0.21 <sup>de</sup>
1000 <sup>1</sup>	71.0	21.3 <sup>b</sup>	0.197 <sup>bd</sup>

\*Letters along the same column indicate the results of the Duncans test ( $P < 0.05$ ); values with shared alphabet letters along the same column are not significantly different. <sup>1</sup>0.36 vvm; <sup>2</sup>0.6 vvm.

**Table 2.** Summary of agitation rate effects on erythritol production from glycerol by *Y. lipolytica* Wratislavia K1.

Agitation rate (rev/min)	Concentration (g/l)				$Y_{ER}$ (g/g)	$Q_{ER}$ (g/lh)	$q_{ER}$ (g/gh)
	Erythritol <sup>1</sup>	Mannitol <sup>1</sup>	Arabitol	Citricacid			
<b>Pure glycerol</b>							
500 <sup>1</sup>	39.5 <sup>bc</sup>	11.7 <sup>ab</sup>	7.9	1.2	0.26	0.51	0.026
600 <sup>1</sup>	36.8 <sup>a</sup>	9.6 <sup>bc</sup>	6.0	2.1	0.25	0.50	0.027
700 <sup>1</sup>	38.0 <sup>bc</sup>	14.8 <sup>bc</sup>	5.6	1.8	0.26	0.51	0.027
800 <sup>1</sup>	40.7 <sup>bd</sup>	15.1 <sup>e</sup>	2.9	2.6	0.28	0.52	0.027
900 <sup>1</sup>	40.1 <sup>b</sup>	12.0 <sup>abc</sup>	3.1	0.4	0.27	0.52	0.027
1000 <sup>1</sup>	37.0 <sup>a</sup>	11.6 <sup>ab</sup>	4.8	1.6	0.24	0.47	0.023
1100 <sup>1</sup>	33.1 <sup>e</sup>	11.8 <sup>ab</sup>	3.2	2.1	0.21	0.44	0.022
<b>Crude glycerol</b>							
600 <sup>1</sup>	42.0 <sup>d</sup>	8.1 <sup>c</sup>	2.1	2.7	0.27	0.59	0.025
800 <sup>1</sup>	55.0 <sup>d</sup>	4.3 <sup>d</sup>	1.9	3.1	0.37	0.73	0.029
800 <sup>2</sup>	58.2 <sup>b</sup>	7.1 <sup>cd</sup>	2.2	3.2	0.38	0.78	0.032
1000 <sup>1</sup>	51.0 <sup>f</sup>	7.4 <sup>cd</sup>	2.3	1.9	0.34	0.72	0.034

\*Letters along the same column indicate the results of the Duncans test ( $P < 0.05$ ); values with shared alphabet letters along the same column are not significantly different. <sup>1</sup>0.36 vvm; <sup>2</sup>0.6 vvm

## Скан-копія джерела, використаного для визначення концентрації біомаси

*Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 45:515–529, 2015  
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC  
ISSN: 1082-6068 print/1532-2297 online  
DOI: 10.1080/10826068.2014.940966



### Optimization of Medium Composition for Erythritol Production from Glycerol by *Yarrowia lipolytica* Using Response Surface Methodology

Anita Rywińska and Marta Marcinkiewicz

*Department of Biotechnology and Food Microbiology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland*

Edmund Cibis

*Department of Bioprocess Engineering, Wrocław University of Economics, Wrocław, Poland*

Waldemar Rymowicz

*Department of Biotechnology and Food Microbiology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland*

#### Analytical Methods

To determine concentrations of dry biomass, substrate, and products, 10 mL of the fermentation broth (2 times a day) was taken from the bioreactor. After centrifugation (at 5000 rev min<sup>-1</sup> for 5 min), cells were harvested by filtration on 0.45- $\mu$ m pore-size membranes, washed twice with distilled water, and dried to a constant weight at 105°C. The supernatant was determined for contents of erythritol, mannitol, glycerol, and citric acid.

Concentrations of glycerol, erythritol, mannitol, and citric acid were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC; UltiMate 3000, Dionex, USA) on a carbohydrate column (HyperREZ XP, Thermo Scientific, USA) coupled to an ultraviolet (UV;  $\lambda = 210$  nm) and refractive index (RI) detector. The column was eluted with 25 mM of trifluoroacetic acid at 65°C at a flow rate of 0.6 mL min<sup>-1</sup>. Polyols and citric acid were identified and quantified with reference to authentic standards. The treatment diluted the sample by a factor of 10. The

Скан-копія джерела, використаного для визначення концентрації  
джерела Карбону

# A Simple High-Performance Liquid Chromatography Method for the Analysis of Glucose, Glycerol, and Methanol in a Bioprocess

Giuseppina Paola Parpinello\* and Andrea Versari\*

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie ed Ambientali, Università di Ancona, Via Breccie Bianche, 60130 - Ancona, Italy

## Abstract

A reliable high-performance liquid chromatography–refractive index detection method for the simultaneous analysis of glucose, methanol, and glycerol in a bioprocess fermentation media using direct injection is presented. The validation studies show a satisfactory selectivity, linearity, accuracy, and recovery of the method. The lowest concentration detectable for glucose and methanol is 3.5 and 6.7 mg/100 mL, respectively. This method could be an attractive choice for the analysis of these compounds not only in fermentation media but also in biomedical and environmental samples.

## Introduction

Monitoring bioprocesses is fundamental in characterizing cellular metabolism and controlling microbial performance and productivity. In particular, the screening step for the characterization of microbial performance is time consuming and requires fast, reliable, and inexpensive analysis. For that reason, different chromatographic methods have recently been successfully applied for the analysis of microbial substrates and end-products. Gas chromatography is suitable for the analysis of carbohydrates and sugar alcohols; however, derivatization is always necessary (1). High-performance liquid chromatography (HPLC) is a well established tool for the analysis of these compounds without derivatization (2,3). In particular, cation-exchange resins are suitable for the analysis of carbohydrates and products of carbohydrate metabolism in fermentation mixtures (4).

In the present study, a fast HPLC method with refractive index detection (RI) was developed for the simultaneous analysis of glucose, methanol, and glycerol in complex media during the growth of *Hansenula polymorpha*.

## Experimental

### Standards and sample preparation

Glucose, glycerol, and methanol were used as standards (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Peak identification was based on HPLC retention times compared with those of selected standards and confirmed by a spiking technique. Quantitation was based on the external standard method using calibration curves fitted by linear regression analysis using Statistica 5.0 software (StatSoft, Tulsa, OK). The calibration curves were obtained by plotting peak area (mV/min) versus amount injected (range covered, 0.2–2 g/100 mL).

Samples were centrifuged at  $3000 \times g$  for 15 min, and the supernatant was filtered through a 0.22- $\mu\text{m}$  cellulose–acetate filter (Sigma F-0139); then, the filtrate was diluted two times before direct injection into the HPLC.

### Instrumentation

The HPLC system was a Jasco (Easton, MD) LC-800 series equipped with an 880-PU pump and 830-RI refractive index detector. Data were acquired using the chromatographic integrator DP-700 (Carlo Erba, Milano, Italy). Samples were injected using a 7125 valve equipped with a 20- $\mu\text{L}$  loop (Rheodyne, Cotati, CA) on an Aminex FOA (Bio-Rad, Richmond, CA) cation-exchange ( $\text{H}^+$ ) resin-based column (100  $\times$  7.8-mm i.d.; 9  $\mu\text{m}$ ) protected with a guard column of the same material. The analysis was performed at 60°C with a flow rate of 0.6 mL/min using isocratic elution with 0.01M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  as a mobile phase. The eluent was filtered prior to the analysis using 0.22- $\mu\text{m}$  nylon GV membrane (Millipore, Bedford, MA).

### Cultures and media

Mutant strain AG2 and wild type strain L1 (control) were used for this comparative study. Minimum medium contained 0.2% Yeast Nitrogen Base (YNB) without amino acids (Difco Lab, Detroit, MI), 2% glucose, 1% methanol, 0.002% methionine, and

**Скан-копія джерела, використаного для визначення концентрації  
еритритолу в культуральній рідині**

**HPLC method for quantitative estimation of polyhydric alcohols  
and sugars in bio-glycerol production**

**S. P. Takle<sup>1</sup>, M.H. Vohra<sup>2</sup>, S. V. Patil<sup>3\*</sup>**

**Vasantdada Sugar Institute, Manjari (Bk.), Tal. Haveli, Pune, 412307, India**

---

The analysis was carried out in Waters 515 HPLC pump equipped with isocratic system and Refractive Index (RI) detector. Chromatographic data were collected in Empower-2 software.

**Instrument & chromatographic conditions:**

Instrument	:	Waters - HPLC
Column	:	Ultra Amino column (Restek) (150 mm column length, 4.6 mm inside diameter, 3.0 µm particle size, 100 Å pore size)
Injector	:	Rheodyne (20 µL loop)
Column Oven	:	35°C
Mobile Phase	:	Acetonitrile (75%): Water (25%)
Carrier flow	:	0.8 ml/min
Detector Temperature	:	35°C
Detector	:	RI (Waters 410)
Injection volume	:	20 µL

## Скан-копія джерела, використаного для визначення концентрації Нітрогену

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы  
по надзору в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека,  
Главный государственный санитарный  
врач Российской Федерации

Г.Г. Онищенко

18 января 2008 г.

Дата введения: с момента утверждения

### 4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

#### Методы контроля бактериологических питательных сред

##### Методические указания

МУК 4.2.2316-08

#### 6.9. Определение содержания аминного азота формольным титрованием

Определение содержания аминного азота в питательных средах проводят методом формольного титрования. Принцип метода основан на блокировании формальдегидом при pH 7,0 свободных аминогрупп и титровании щелочью эквивалентного количества карбоксильных групп. Начало и конец титрования определяют потенциометрически.

- Реактивы:* 1) натрия гидроксид (0,1 моль/л) или раствор соляной кислоты (0,1 моль/л);  
2) натрия гидроксид 10 %-й раствор;  
3) раствор формалина (40 %-й раствор формальдегида)\* (ГОСТ 1625-75).

##### Ход определения

В стакан вместимостью 50 мл наливают необходимый объем (*A*) (*подготовка проб см. примечания 1 и 2*) анализируемого раствора препарата, содержащего 1,5 - 5,0 мг аминного азота, и доводят общий объем дистиллированной водой до 20 мл. Электроды потенциометра (*см. определение pH*) погружают в исследуемый раствор, pH которого доводят до значения 7,0 с помощью раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л) или раствора соляной кислоты (0,1 моль/л)\*\*.

К нейтрализованному раствору добавляют 2 мл нейтрального формалина, перемешивают и, не вынимая электроды, титруют содержимое раствором натрия гидроксида (0,1 моль/л) до pH 9,1\*\*\*. Проводят два параллельных измерения.

\*Перед каждым определением pH формалина доводят до pH 7,0 10 %-м раствором натрия гидроксида.

\*\*В ходе определения электроды должны все время оставаться погруженными в раствор.

\*\*\*При титровании следует использовать бюретку, вместимостью 5 мл.

Содержание аминного азота в исследуемом препарате в процентах (*X*) вычисляют по следующим формулам.

Для жидкого образца:

$$X = \frac{V \cdot K \cdot 1,4 \cdot 100}{A \cdot 1000}, \text{ где}$$

*A* - количество жидкого образца (мл), взятого на анализ;

100 - коэффициент пересчета миллиграммов в проценты;

1000 - коэффициент пересчета миллиграммов в граммы.

##### Примечание 2:

- для жидких гидролизатов низкой степени расщепления (0,1 - 0,2 % аминного азота) «*A*» = 3 мл;
- для жидких гидролизатов средней степени расщепления (0,3 - 0,6 % аминного азота) «*A*» = 1 мл;
- для жидких гидролизатов высокой степени расщепления (0,7 - 1,3 % аминного азота) «*A*» = 0,5 мл;
- для жидких питательных сред (0,08 - 0,14 % аминного азота) «*A*» = 10 мл;
- для готовых плотных агаровых сред «*A*» = 3 мл препарата, расплавленного в кипящей водяной бане.

## Скан-копія джерела, використаного для визначення мікробіологічної чистоти та вологості продукту

Determine the amount of ergotamine base in the chloroformic solution as follows: to 25.0 ml of the solution add 50 ml of *anhydrous acetic acid R* and titrate with 0.05 M *perchloric acid*, determining the end-point potentiometrically (2.2.20).

1 ml of 0.05 M *perchloric acid* is equivalent to 29.08 mg of  $C_{33}H_{35}N_5O_5$ .

The specific optical rotation is  $-154$  to  $-165$ , calculated from the angle of rotation and the concentration of ergotamine base.

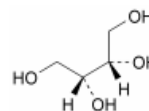
**Related substances.** Examine by thin-layer chromatography (2.2.27), using a *TLC silica gel G plate R*. Prepare the reference solutions and the test solutions immediately before use and in the order indicated below.

**Reference solution (a).** Dissolve 10 mg of *ergotamine tartrate CRS* in a mixture of 1 volume of *methanol R* and 9 volumes of *methylene chloride R* and dilute to 10.0 ml with the same mixture of solvents.

01/2005:1803

### ERYTHRITOL

Erythritolum


 $C_4H_{10}O_4$ 
 $M_r$  122.1

#### DEFINITION

(2*R*,3*S*)-Butane 1,2,3,4-tetrol (*meso*-erythritol).

**Content:** 96.0 per cent to 102.0 per cent (anhydrous substance).

1516

See the information section on general monographs (cover pages)

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0

Erythritol

#### CHARACTERS

**Appearance:** white or almost white, crystalline powder or free-flowing granules.

**Solubility:** freely soluble in water, very slightly soluble in alcohol.

#### IDENTIFICATION

A. Melting point (2.2.14): 119 °C to 122 °C.

B. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

**Comparison:** *erythritol CRS*.

#### TESTS

**Appearance of solution.** The solution is clear (2.2.1) and colourless (2.2.2, *Method II*).

Dissolve 5.0 g in *water R* and dilute to 50 ml with the same solvent.

**Conductivity** (2.2.38): maximum 20  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Dissolve 20.0 g in *carbon dioxide-free water R* prepared

#### Limits:

- **any impurity:** not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (2.0 per cent),
- **total:** not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (2.0 per cent),
- **disregard limit:** area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c) (0.1 per cent).

**Lead** (2.4.10): maximum 0.5 ppm.

**Water** (2.5.12): maximum 0.5 per cent, determined on 1.00 g.

**Microbial contamination.** Total viable aerobic count (2.6.12) not more than  $10^3$  bacteria and  $10^2$  fungi per gram, determined by plate count. It complies with the tests for *Escherichia coli* and *Salmonella* (2.6.13). If intended for use in the manufacture of parenteral dosage forms, the total viable aerobic count (2.6.12) is not more than  $10^2$  bacteria and  $10^2$  fungi per gram, determined by plate count.

**Bacterial endotoxins** (2.6.14). If intended for use in the manufacture of parenteral dosage forms without a

## Скан-копія джерела, використаного для визначення концентрації еритритолу в готовому продукті

### METHOD OF ASSAY

Determine the erythritol content of the sample by liquid chromatography.

#### Mobile phase

Deionized water

#### Standard Solution

Transfer about 2 g of Standard Erythritol, previously dried in a vacuum desiccator at 70° for 6 hr and accurately weighed to the nearest 0.1 mg (*W*), into a 50 ml volumetric flask, dissolve in and dilute to volume with deionized water and mix. Filter the solution through a disposable 0.45 µm filter before use in the 'Procedure'.

(Standard Erythritol may be obtained from Cerestar, EBS Vilvoorde R&D Centre, Centre of Fermentation Expertise, 84 Havenstraat, 1800 Vilvoorde, Belgium; Mitsubishi Chemical Corporation, Speciality Chemicals Company, Intermediate Chemicals Department, 5-2 Marunonchi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0005, Japan; or Nikken Chemicals Co., Ltd., Development Department, Sumitomo-Tsukiji Bldg., No. 4-414, kTsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo, 104-0045, Japan.

#### Assay

Prepare as directed for 'Standard Solution', using about 2 g of the sample, previously dried in a vacuum desiccator at 70° for 6 h and accurately weighed to the nearest 0.1 mg (*w*).

#### Chromatographic System

Use a high-pressure liquid chromatograph equipped with a constant-flow pulseless pump and fitted with a sensitive differential refractive index detector such as the RID-6A or equivalent. The column is packed with a strong cation exchange resin in the hydrogen form, such as MCI Gel-CK08EH, Shodex KC-811 or equivalent, consisting of a macroreticular sulfonated polystyrene-divinylbenzene copolymer, 8% crosslinked, 9 µm particle size. The column temperature is 60°C. The sample injector is preferably of the fixed-loop type (manual or automatic), capable of accurately injecting 30 µl. The integrator can be any modern data acquisition system with recording and processing capabilities. The operating flow rate is about 0.5 ml/min. The maximum pressure of the total system is about 50 kgf/cm<sup>2</sup>.

#### System Start-up

Connect the injector outlet to the column inlet, and connect the column outlet directly to waste. Activate the pump and elute the system at a flow rate of 0.1 ml/min. Set the pressure limit control to about 15 kgf/cm<sup>2</sup> above the normal operating pressure. Increase the flow rate by increments of 0.1 ml/min up to the operating rate, and elute the column for 2 hours. Connect the column outlet to the detector tube, flush both the reference and sample cells for 30 min, and then zero the refractometer and adjust the sensitivity

#### System Suitability Test

The area responses of triplicate 30-µl injections of the *Standard Solution* show a relative standard deviation ( $100 \times \text{standard deviation}/\text{mean peak area}$ ) of not more than 1.0%.

#### Procedure

Chromatograph triplicate 30-µl portions of the *Standard Solution* and record the mean of the erythritol peak areas as *A*. In a similar manner, chromatograph triplicate 30-µl portions of the *Assay Solution* and record the mean of the erythritol peak areas as *a*.

Calculate the percentage of erythritol in the sample by the formula:

$$\% \text{ Erythritol} = 100(W/w)(a/A).$$

## Скан-копія джерела, використаного для визначення мікробіологічної чистоти готового продукту

### 2.6.12. MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NON-STERILE PRODUCTS (TOTAL VIABLE AEROBIC COUNT)

The tests described hereafter will allow quantitative enumeration of mesophilic bacteria and fungi which may grow under aerobic conditions.

The tests are designed primarily to determine whether or not a substance that is the subject of a monograph in the Pharmacopoeia complies with the microbiological requirements specified in the monograph in question. When used for such purposes follow the instructions given below, including the number of samples to be taken and interpret the results as stated below. The tests may also be used for the test for *Efficacy of antimicrobial preservation* (5.1.3) as described in the Pharmacopoeia. They may furthermore be used for monitoring raw material quality and may be used in association with guidelines on *Microbiological quality of pharmaceutical preparations* (5.1.4). When used for such purposes, for example by a manufacturer for raw materials and/or finished product monitoring or for process validation, the conduct of the tests including the number of samples to be taken and the interpretation of the results are matters for agreement between the manufacturer and the competent authority.

... etc.

- (i) acceptable samples, i.e. samples containing less than  $m$  CFU (colony-forming units) per gram or millilitre, where  $m$  is the limit specified in the relevant monograph;
- (ii) marginal samples, i.e. with more than  $m$  CFU, but less than  $10m$  CFU per gram or millilitre;
- (iii) defective samples, i.e. containing more than  $10m$  CFU per gram or millilitre.

**Water-soluble products.** Dissolve or dilute 10 g or 10 ml of the product to be examined in buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0 or in another suitable liquid. In general a one in ten dilution is prepared. However, the characteristics of the product, or the required sensitivity may necessitate the use of other ratios. If the product is known to have antimicrobial activity, an inactivating agent may be added to the diluent. If necessary adjust the pH to about pH 7 and prepare further serial tenfold dilutions using the same diluent.

**Non-fatty products insoluble in water.** Suspend 10 g or 10 ml of the product to be examined in buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0 or in another suitable liquid. In general a one in ten suspension is prepared, but the characteristics of some products may necessitate the use of larger volumes. A suitable surface-active agent such as 1 g/l of polysorbate 80 may be added to assist the suspension of poorly wettable substances. If the product is known to have antimicrobial activity, an inactivating agent

154

See the information section on general monographs (cover pages)

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0

2.6.12. Total viable aerobic count

may be added to the diluent. If necessary adjust the pH to about pH 7 and prepare further serial tenfold dilutions using the same diluent.

**Fatty products.** Homogenise 10 g or 10 ml of the product to be examined with not more than half its weight of sterile polysorbate 80 or another suitable sterile surface-active agent, heated if necessary to not more than 40 °C, in exceptional cases to not more than 45 °C. Mix carefully and if necessary maintain the temperature in a water-bath or in an incubator. Add sufficient pre-warmed buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0 to make a one in ten dilution of the original product. Mix carefully whilst maintaining the temperature for the shortest time necessary for the formation of an emulsion and in any case for not more than 30 min. Further serial tenfold dilutions may be prepared using buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0 containing a suitable concentration of sterile polysorbate 80 or another sterile surface-active agent.

**Transdermal patches.** Remove the protective cover sheets ("release liner") of ten patches of the transdermal preparation by using sterile forceps and place them, the adhesive side upwards, on sterile glass or plastic trays. Cover the adhesive surface with sterile gauze (or woven-filter type

When examining transdermal patches, filter 50 ml of preparation A separately through each of two sterile filter membranes. Place one membrane to agar medium B for total aerobic microbial count, the other membrane to agar medium C for the count of fungi.

#### PLATE-COUNT METHODS

**a. Pour-plate method.** Using Petri dishes 9 cm in diameter, add to each dish 1 ml of the sample prepared as described in the section Preparation of the sample and 15 ml to 20 ml of a liquefied agar medium suitable for the cultivation of bacteria (such as medium B), or 15 ml to 20 ml of a liquefied agar medium suitable for the cultivation of fungi (such as medium C) at not more than 45 °C. If larger Petri dishes are used the amount of agar is increased accordingly. Prepare for each medium at least two Petri dishes for each level of dilution. Incubate the plates at 30 °C to 35 °C (20 °C to 25 °C for fungi) for five days, unless a reliable count is obtained in a shorter time. Select the plates corresponding to one dilution and showing the highest number of colonies less than 300 (100 colonies for fungi). Take the arithmetic average of the counts and calculate the number of colony-forming units per gram or millilitre.

**b. Surface-spread method.** Using Petri dishes 9 cm in

For the determination of TAMC, transfer one of the membrane filters to the surface of casein soya bean digest agar. For the determination of TYMC, transfer the other membrane to the surface of Sabouraud-dextrose agar. Incubate the plate of casein soya bean digest agar at 30-35 °C for 3-5 days and the plate of Sabouraud-dextrose agar at 20-25 °C for 5-7 days. Calculate the number of CFU per gram or per millilitre of product.

When examining transdermal patches, filter 10 per cent of the volume of the preparation described under 4-5-1 separately through each of 2 sterile filter membranes. Transfer one membrane to casein soya bean digest agar for TAMC and the other membrane to Sabouraud-dextrose agar for TYMC.

#### 5-2-2. Plate-count methods

##### 5-2-2-1. Pour-plate method.

Prepare the sample using a method that has been shown to be suitable as described in section 4. Prepare for each medium at least 2 Petri dishes for each level of dilution. Incubate the

#### **Escherichia coli**

Prepare the product to be examined as described in the general method 2.6.12 and use 10 ml or the quantity corresponding to 1 g or 1 ml to inoculate 100 ml of broth medium A, homogenise and incubate at 35-37 °C for 18-48 h. Shake the container, transfer 1 ml to 100 ml of broth medium G and incubate at 43-45 °C for 18-24 h. Subculture on plates of agar medium H at 35-37 °C for 18-72 h. Growth of red, non-mucoid colonies of gram-negative rods indicates the possible presence of *E. coli*. This is confirmed by suitable biochemical tests, such as indole production. The product passes the test if such colonies are not seen or if the confirmatory biochemical tests are negative.

#### **Salmonella**

Prepare the product to be examined as described in the general method 2.6.12, but using broth medium A in place of buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0, homogenise and incubate at 35-37 °C for 18-24 h. Transfer 1 ml of the enrichment culture to 10 ml of broth medium I and incubate at 41-43 °C for 18-24 h. Subculture on at least 2 different agar media chosen from among agar medium J, agar medium K and agar medium L. Incubate at 35-37 °C for 18-72 h. The probable presence of salmonellae is indicated by the growth of cultures having the following appearance:

- agar medium J: well-developed, colourless colonies;
- agar medium K: well-developed, red colonies, with or without black centres;
- agar medium L: small, transparent, colourless or pink or opaque-white colonies, often surrounded by a pink or red zone.

## 2.6.13. MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NON-STERILE PRODUCTS: TEST FOR SPECIFIED MICRO-ORGANISMS

*This general chapter presents 2 sets of tests. The 1<sup>st</sup> set gives the reference methods for determining compliance with monographs. Reference to this chapter in a monograph therefore implies compliance with the 1<sup>st</sup> set of tests, unless use of the 2<sup>nd</sup> set of tests has been authorised. The tests in the 2<sup>nd</sup> set also constitute official methods of the European Pharmacopoeia and may be referred to as such, notably in applications for marketing authorisation. It is intended to replace the 1<sup>st</sup> set by the 2<sup>nd</sup> set once the monographs concerned have been revised. The 2<sup>nd</sup> set presents tests developed in co-operation with the Japanese Pharmacopoeia and the United States Pharmacopoeia to achieve harmonised requirements.*

gram-positive cocci surrounded by a clear zone indicate the presence of *S. aureus*. Confirmation may be effected by suitable biochemical tests such as the coagulase test and the deoxyribonuclease test. The product passes the test if colonies of the type described do not appear on agar medium O or if the confirmatory biochemical tests are negative.

When testing transdermal patches, filter 50 ml of preparation A as described in the general method 2.6.12 through a sterile filter membrane and place in 100 ml of broth medium A and incubate at 35-37 °C for 18-48 h. After incubation, spread on agar medium O.

#### **Nutritive and selective properties of the media and validity of the test**

The tests described hereafter must be performed at least on each lot of dehydrated media.

Proceed as follows. Grow the following test strains separately, in tubes containing suitable media such as those indicated, at 30-35 °C for 18-24 h:

<i>Staphylococcus aureus</i>	such as ATCC 6538 (NCIMB 9518, CIP 4.83): broth medium A;
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	such as ATCC 9027 (NCIMB 8626, CIP 82.118): broth medium A;
<i>Escherichia coli</i>	such as ATCC 8739 (NCIMB 8545, CIP 53.126): broth medium A;
<i>Salmonella typhimurium</i>	no strain number is recommended (a salmonella not pathogenic for man, such as <i>Salmonella abony</i> (NCTC 6017, CIP 80.39), may also be used): broth medium A.

Dilute portions of each of the cultures using buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0 to make test suspensions containing about 1000 viable micro-organisms

## Скан-копія джерела, використаного для визначення вологості в готовому продукті

### ОПИСАНИЕ ТИПА СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

#### Влагомеры термогравиметрические инфракрасные МА-150

##### Назначение средства измерений

Влагомеры термогравиметрические инфракрасные МА-150 (далее – влагомеры) предназначены для экспрессного измерения влажности монолитных, листовых, сыпучих, пастообразных материалов, водных суспензий и неводных жидкостей, а также сухого остатка по специально разработанным методикам измерений, регламентированным нормативными документами.

##### Описание средства измерений

Принцип действия влагомера основан на обезвоживании образца анализируемого вещества – объекта измерений под действием инфракрасного излучения с автоматическим непрерывным взвешиванием его массы в процессе сушки и индикацией результата измерения.

Конструктивно влагомер состоит из: нагревательного элемента – керамического источника инфракрасного излучения, встроенного в крышку сушильной камеры; взвешивающего устройства; блока управления, обработки и отображения с жидкокристаллическим дисплеем и клавиатурой.

Анализ выполняется автоматически под управлением программного обеспечения. Процесс измерения включает следующие операции: оператор размещает пробу анализируемого материала (в диапазоне от 0,1 до 150 г), равномерно распределенную в кювете (диаметром не более 100 мм), в сушильную камеру, после чего происходит взвешивание, а затем автоматическое определение потери массы под действием инфракрасного излучения и пересчет в единицы содержания влаги, с учетом начальной массы пробы. Результаты анализа выводятся на дисплей и могут быть переданы на периферийные устройства.

Во влагомере предусмотрены следующие единицы содержания влаги:

- Массовая доля влаги (влажность) – отношение убыли массы пробы к начальной массе пробы, %;
- Масса пробы, г;
- Сухой остаток – отношение убыли массы пробы к конечной массе пробы, %;
- Массовое отношение влаги – отношение конечной массы пробы к начальной массе пробы, %;
- Объемная доля влаги – отношение убыли массы пробы к начальному объему, г/л.

Влагомер имеет два режима нагрева: стандартный и щадящий. При стандартном режиме нагрева предусмотрены следующие критерии остановки сушки:

- автоматический;
- полуавтоматический (мг, %);
- по времени (0,1 ÷ 99,9 мин);
- ручной.

Влагомер имеет энергонезависимую память на 20 программ сушки, встроенный интерфейс RS232 для протоколирования в соответствии со стандартами GLP и GMP с возможностью предварительной настройки форматов для печати результатов анализов и протоколирования юстировки температуры нагрева и взвешивающего устройства.