

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма « Біотехнології: фармацевтична
промислова, харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 04 ” квітня 20 22 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СВГРАШИНА Антона Сергійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез аубазидану *Aureobasidium pullulans*

керівник роботи ТЕТЕРІНА Світлана Миколаївна,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи *Aureobasidium pullulans*, біосинтез аубазидану

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
характеристика аубазидану, обґрунтування вибору біологічного агента,
техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору стадій
виробництва, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль
виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема формату А1 – 1 аркуш

Технологічна схема формату А1 – 1 аркуш

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячено розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу аубазидану штамом *Aureobasidium pullulans* 82 Л, який порівняно з іншими характеризується вищою здатністю до накопичення аубазидану (концентрація аубазидану становить 15,3 г/л). Аубазидан – це позаклітинний β -глюкан, який має високі емульгувальні та плівкотвірні властивості, і відрізняється від синтетичних речовин високою біологічною безпекою.

Технологічний процес складається з допоміжних (приготування мийних засобів, підготовка аераційного повітря, підготовка розчину соляної кислоти та лугу для підтримання рН середовища, стерилізацію поживних середовищ) та основних робіт (п'ять стадій вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 63 м³)

Дипломна робота складається з вступу, семи розділів, списку використаних джерел, апаратурної та технологічної схеми (формат А1 та А2 відповідно). Загальний обсяг роботи – 79 сторінок, 7 рисунків та 14 таблиць.

Ключові слова: аубазидан, *Aureobasidium pullulans*, полісахарид, біосинтез.

					НУХТ БТЕК 04.02.28 КР ПЗ			
<i>Змн</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РЕФЕРАТ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		Свєрашин А.С.					3	77
<i>Керівник</i>		Тетеріна С.М.						3
<i>Рецензент</i>								
<i>Н.контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		

ЗМІСТ

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА АУБАЗИДАНУ	6
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	9
2.1 Морфолого-культуральні ознаки	14
2.2 Фізіолого-біохімічні ознаки.....	17
2.2. Таксономічний статус біологічного агента.....	18
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	19
3.1 Потреба у цільовому продукті.....	19
3.1.1 Розрахунок потреби цільового продукту	19
3.2 Розрахунок потужності виробництва.....	21
3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів	22
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	23
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА.....	27
4.1. Вибір способу культивування і типу ферментера	27
4.2 Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій.....	30
4.3 Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря для одержання аубазидану	31
4.4 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища	32
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	34
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ <i>AUREOBASIDIUM PULLULANS</i> 82 Л	42
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	61
7.1. Мікробіологічний контроль	61
7.2. Показники росту	72
7.2.1. Концентрація аубазидану.....	72
7.2.2. В'язкість культуральної рідини.....	75
7.2.3. Концентрація джерел Карбону і Нітрогену.....	76
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	79

ВСТУП

Деякі полісахариди вже давно зайняли своє місце в господарчій діяльності людини. В основному це полімери рослинного походження: крохмал, целюлоза, альгінова кислота, агар та інші. Але сезонність їх виробництва, ціни, які залежать від урожаю, виборчість регіонів культивування призводить до заміни природних полімерів на синтетичні, які можна отримувати безперервно і надійно. Таким синтетичним полісахаридом є аубазидан. Даний полісахарид можуть синтезувати лише деякі штами дріждюподібного гриба *Aureobasidium pullulans*.

Гриби роду *Aureobasidium* відносять до дріждюподібних організмів, для яких характерне існування в двох різних життєвих формах. Залежно від умов навколишнього середовища вони розвиваються або в формі міцелію, що складається з довгих розгалужених септованих або несептованих ниток, або в формі дріжджових клітин, овальної або сферичної форми, розмноження яких здійснюється за допомогою брунькування. Гриб, в залежності від умов навколишнього середовища, може існувати в міцеліальній або дріжджовій формі. Розвиток *A. pullulans* в тій чи іншій морфологічній формі регулюється різними факторами, такими як поживні речовини, температура, рН та концентрація кисню. Даний гриб вважають безпечним для біотехнологічних та екологічних застосувань. Їх штами є унікальними організмами, оскільки вони виробляють широкий спектр природних продуктів, які широко вивчені з урахуванням декількох різнобічних застосувань у біотехнології. [13, 14]

Новизною дипломного проекту є реалізація аубазидану у складі м'ясного фаршу, він сприяє збереженню нативної, не денатурованої структури білків, збільшенню водоутримуючої здатності, ніжності, зменшенню втрат розморожених фаршів після теплової обробки. [16]

					НУХТ БТЕК 04.02.28 КР ПЗ			
Змн	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Свєрашин А.С.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Керівник		Тетєрина С.М.					5	77
Рецензент						5		
Н.контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА АУБАЗИДАНУ

Екзополісахариди — це високомолекулярні екзогенні продукти метаболізму мікроорганізмів, вони об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень. Здатність розчинів мікробних екзополісахаридів до гелеутворення, емульгування, суспендування, змінення реологічних характеристик водних систем обумовила широке використання цих біополімерів в нафто- і гірничовидобувній, текстильній, харчовій, фармацевтичній та хімічній промисловості, сільському господарстві і медицині. Мікробні екзополісахариди мають ряд переваг порівняно з полісахаридами рослинного походження. Так, ці біополімери можна отримувати в потрібних об'ємах незалежно від пори року і кліматичних умов. Економічна доцільність використання мікробних екзополісахаридів визначається їхньою позаклітинною природою і високою продуктивністю синтезу на дешевих субстратах. На відміну від хімічних полімерів, мікробні екзополісахариди стійкі до температурної, окисної, механічної деструкції, але піддаються біологічній деградації і є нетоксичними, що робить екологічно безпечним їхнє застосування, наприклад, в нафтовидобуванні. Рівень біосинтезу екзополісахаридів, в значній мірі залежить від зовнішніх факторів. Тому при розробці технології одержання мікробних екзополісахаридів, важливим і необхідним етапом є підбір оптимальних комбінацій різних параметрів культивування продуцентів. Більшість мікробних синтетиків екзополісахаридів використовують вуглеводи як джерело вуглецю та енергії.

					НУХТ БТЕК 04.02.28 КР ПЗ		
<i>Змн</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробив</i>		<i>Свєрашин А.С.</i>			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>		<i>Тетеріна С.М.</i>				6	77
<i>Рецензент</i>					Кафедра БТМ		
<i>Н.контр.</i>							
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>					
РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА АУБАЗИДАНУ					6		

При промисловому виробництві екзополісахаридів, як субстрати звичайно використовують продукти, отримані з цукрових буряків: мелясу, цукровий сироп, сахарозу, або з кукурудзи: крохмаль, гідролізований крохмаль, глюкозний сироп, глюкозу. [1]

Аубазидан – це позаклітинний β -глюкан (гомополісахарид), який виділяється лише деякими штамми дріждьоподібного гриба *Aureobasidium pullulans*. Глюкани відносяться до полісахаридів з довгим ланцюгом, структурною ланкою якого виступає D-глюкоза, зв'язана глікозидними зв'язками.

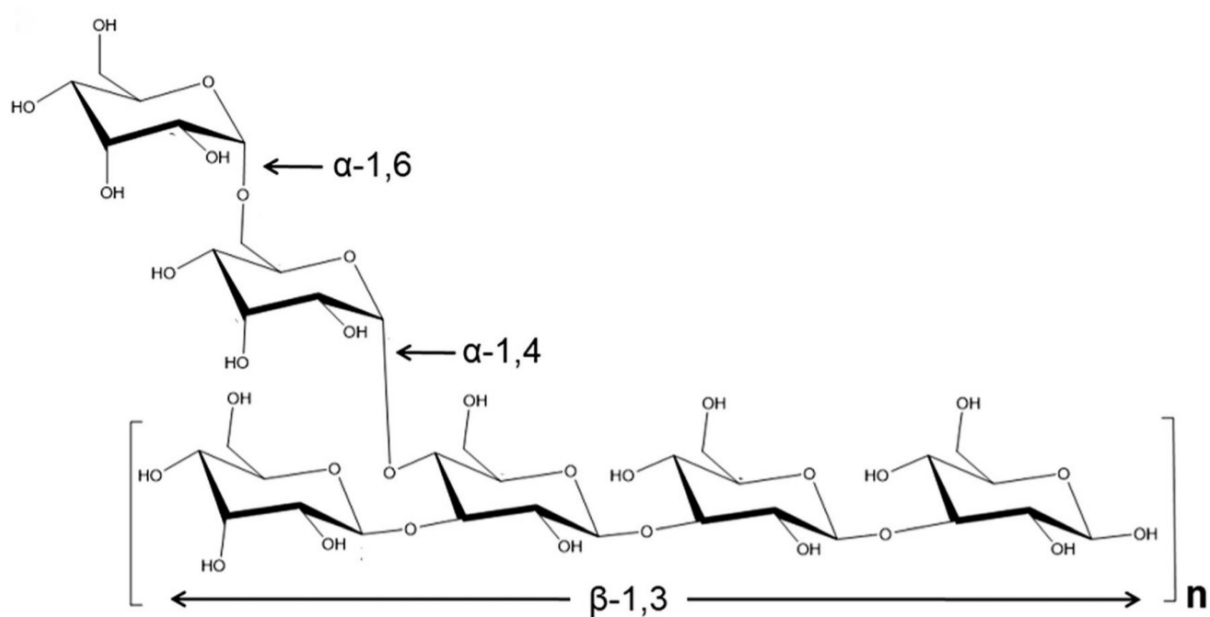


Рис. 1.1 Структурна формула аубазидану

Аубазидан має високі емульгувальні та плівкотвірні властивості, забезпечує лікарським препаратам м'якість, дисперсність, високі адсорбційні властивості, легку віддачу лікарських речовин та відрізняється від синтетичних речовин високою біологічною безпекою. Однак, незважаючи на перелічені вище властивості, має ряд недоліків – перш за все, схильність до мікробної контамінації. [2, 3, 4]

Також, аубазидан має потенційне застосування в косметичному, медичному та промисловому виробництві, як флокулянт, основа для мазей та емульсій. Аубазидан може утворювати біорозкладні плівки та волокна із

властивостями, подібними до синтетичних полімерів, наприклад спеціальні ранові накладки, що прискорюють процеси загоєння виразкового дефекту. В продуктах харчування, даний полісахарид може бути використаний як загусник, вологоутримуючий агент і сорбент. Серійно випускається на заводі препаратів мікробного синтезу "Ензим" у місті Ладижин. Має властивості ефективного протектора радіоактивних елементів для організму людини, оскільки має здатність сорбувати іони важких металів і радіоізоотопів.

Аубазидан, як харчова добавка у складі сметани, був вивчений на здатність зв'язування важких металів. Експертиза сорбційної здатності досліджуваного продукту показала сорбційну ємність аубазидану по відношенню до важких металів:

- В чистому вигляді 3310 мкг Pb^{2+} на 1г п/с; 189 мкг Hg^{2+} на 1г п/с; 0 мкг Ca^{2+} на 1 г п/с.

- в сметані 2990 мкг Pb^{2+} на 1г п/с; 30 мкг Hg^{2+} на 1г п/с; 0 мкг Ca^{2+} на 1 г п/с.

Як видно з наведених даних, аубазидан найбільш ефективно зв'язує свинець. По відношенню до ртуті, чистий полісахарид володіє низькою сорбційною ємністю. Важливо відмітити те, що даний полісахарид не зв'язує кальцій, який є необхідним мікроелементом для організму. [4, 5, 6]

Крім того, у аубазидану присутні детоксикуючі, імуномодулюючі, антивірусні властивості. Він специфічно зв'язує та виводить із організму атерогенні ліпопротеїди низької щільності (53 мг/г), прискорює загоєння ерозій і виразки шлунку. [6]

РОЗДІЛ 2

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

Для синтезу аубазидану використовують гриби *A. pullulans*. У вітчизняній літературі наявні роботи щодо одержання аубазидану за допомогою штамів *A. pullulans* [7, 8, 9]. Так, одержання аубазидану за допомогою *A. pullulans* ВКПМ F-371 відбувається на середовищі з сахарозою протягом 90-120 годин з виходом чистого полісахариду 15,74 (+0,5) г/л, що є довготривалим і не вигідним для промислового виробництва [7].

В наступні роки технологія одержання аубазидану була вдосконалена, що дозволило одержувати вищі концентрації полісахариду за меншої тривалості культивування. Так, Олійничук та ін. розробили технологію культивування *A. pullulans* [8] на середовищі з сахарозою протягом 72 годин з виходом чистого полісахариду 19,4 г/л, використовуючи молочну кислоту для доведення потрібного значення рН. У цьому способі вдалось скоротити тривалість культивування на 20-50 годин, однак він не дає позитивного результату в умовах промислового використання.

Третій спосіб одержання аубазидану [9] – один з самих досконалих, так як процес культивування становить 68 годин, а вихід чистого полісахариду в промислових умовах 15,3 г/л. В даному патенті використовують удосконалений штам *A. pullulans* 82 л, який є стабільний при зберіганні, має швидший цикл росту та підвищену здатність синтезувати полісахарид. Також, важливо зазначити, що даний спосіб культивування зменшує матеріальні витрати у зв'язку зі зменшенням витрат кислоти та скороченням циклу виробництва.

					НУХТ БТЕК 04.02.28 КР ПЗ			
<i>Змн</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		Свєрашин А.С.			РОЗДІЛ 2 ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>		Тетеріна С.М.					9	77
<i>Рецензент</i>						9		
<i>Н.контр.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Затверд.</i>		Стабніков В.П.						

Спосіб культивування розроблений Олійничуком та ін., має найбільший вихід цільового продукту, але він є нестабільним у промисловому виробництві. У штаму *A. pullulans* 82 л в порівнянні з *A. pullulans* ВКПМ F-371 тривалість культивування майже в 2 рази менша, що є значно ефективнішим; різниця у виході чистого аубазидану 4,1 г/л. Тому для отримання аубазидану будемо використовувати найбільш досконалий штам *A. pullulans* 82 л.

Порівняльна характеристика продуцентів аубазидану

Продуцент	Склад поживного середовища г/л	Тривалість культивування год	Концентрація продукту г/л	Умови культивування	Література
<i>Aureobasidium pullulans</i> 82 Л	Сахароза – 30,0 Екстракт кукурудзяний – 15,0 NaNO ₃ – 4,0 KH ₂ PO ₄ – 1,5 KCl – 0,8 MgSO ₄ * 7 H ₂ O – 0,8 FeSO ₄ – 0,015	68	15,3	Культивування ведуть при температурі 22°C, аерації і постійній роботі мішалки рН 7,0 – корегують ортофосфорною кислотою	Пат. №32055 Спосіб одержання біополімеру – гомополісахариду / Болоховський В.В., Болоховська В.А., Нагорна О.В. 12.05.2008
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Цукор-рафінад – 50 NaNO ₃ – 3,0 K ₂ HPO ₄ – 1,0 KCl – 0,5	120	15,74	Культивування ведуть при температурі 24°C рН 6,0-6,5	Пат. №1559718 Штамм гриба <i>A.pullulans</i> продуцент екзополісахарида

ВКПМ F-371	MgSO ₄ * 7 H ₂ O – 0,5 FeSO ₄ – 0,01				Юрлова Н. А, Елинов Н. П, Байко Т. В, Зен Б. Г., 08.01.1989
------------	---	--	--	--	--

Дані, наведені у табл. 2.1, свідчать, що приблизно однакову кількість екзополісахариду синтезують *A. pullulans* ВКПМ F-371 та *A. pullulans* 82 Л, проте тривалість культивування штамів, як і склад поживних середовищ є різним. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента розрахуємо вартість поживних середовищ для культивування вибраних мікроорганізмів.

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування *A. pullulans*

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Aureobasidium pullulans</i> ВКПМ F-371	Цукор-рафінад – 50	74	3,7	2
	NaNO ₃ – 3,0	60	0,18	2
	K ₂ HPO ₄ – 1,0	289	0,289	3
	KCl – 0,5	90	0,045	2
	MgSO ₄ * 7 H ₂ O – 0,5	12	0,006	2
	FeSO ₄ – 0,01	38	0,0038	2
	Вартість 1 л середовища – 4,22 грн			
<i>Aureobasidium pullulans</i> 82 Л	Сахароза – 30	90	2,7	1
	Екстракт кукурудзяний – 15,0	60	0,9	2
	NaNO ₃ – 4,0	60	0,24	2
	KH ₂ PO ₄ – 1,5	120	0,18	2
	KCl – 0,8	90	0,072	2
	MgSO ₄ * 7 H ₂ O – 0,8	12	0,0096	2
	FeSO ₄ – 0,015	38	0,00057	2
	Вартість 1 л середовища – 4,1 грн			

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

1 - <https://www.systopt.com.ua>, 2 - <https://prom.ua>, 3 - <http://www.arowana-im.com.ua>

Як видно з даних, наведених у табл. 2.2, середовище для культивування *A. pullulans* 82 Л є трішки дешевшим, ніж для *A. pullulans* ВКПМ F-371. Проте тривалість культивування штаму *A. pullulans* 82 Л є нижчою майже у 2 рази,

ніж *A. pullulans* ВКПМ F-371. Тому для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту. Дані, наведені у табл. 2.3, засвідчують, що кількість цільового продукту синтезованого за годину, штамом *A. pullulans* 82 Л, становить 0,23 , що є у два рази вищим ніж у іншого штаму.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г аубазидану при культивуванні штамів *A. Pullulans*

Біологічний агент	Концентрація цільового продукту г/л	Тривалість культивування, год	Кількість цільового продукту, синтезованого за год	Вартість 1 л середовища грн./л	Умовна вартість 1 г цільового продукту грн/г
<i>Aureobasidium pullulans</i> ВКПМ F-371	15,74	120	0,13	4,22	0,269
<i>Aureobasidium pullulans</i> 82 Л	15,3	68	0,23	4,1	0,266

Узагальнивши дані можна зробити висновок, що доцільнішим буде використання *A. pullulans* 82 Л, оскільки умовна вартість 1 г аубазидану є нижчою ніж у штама *A. pullulans* ВКПМ F-371.

2.1. Морфолого-культуральні ознаки

Гриби роду *Aureobasidium* відносять до дріжджоподібних організмів, для яких характерне існування в двох різних життєвих формах. Залежно від умов навколишнього середовища вони розвиваються або в формі міцелію, що складається з довгих розгалужених септованих або несептованих ниток, або в формі дріжджових клітин, овальної або сферичної форми, розмноження яких здійснюється за допомогою брунькування. Гриб, в залежності від умов навколишнього середовища, може існувати в міцеліальній або дріжджовій формі. У природних місцях проживання він

найчастіше зустрічається у вигляді міцелію. Розвиток *Aureobasidium pullulans* в тій чи іншій морфологічній формі регулюється різними факторами, такими як поживні речовини, температура, рН та концентрація кисню.

Клітини в культурі поліморфні, як показано на рис 2.1, що підтверджує типову картину міцеліально-дріжджового диморфізму. Дріжджові клітини овальні, еліпсоїдні, витягнуті. Пучки рідко з'являються в екваторіальній зоні, частіше на полюсах клітини. Наряду з дріжджовими клітинами відзначена наявність гіалінових, рівних, нерегулярно розгалужених і з поперечними септами гіфів (2-10 мкм). [10, 11]



Рис. 2.1. Мікроморфологія *A.pullulans* (збільшення 10×100)

Конідії досягають $10-16 \times 3-6$ мкм, дрібніші - $7-10 \times 4-5$ мкм., вони не диференційовані, поодинокі або зібрані пучками, гіалінові, овальні. Бластоконідії формуються синхронно, поодинокі або групами (рис 2.2). Іноді старі конідії збільшуються, перетворюючись в темні двоклітинні артроспори. Деякі конідії утворюються ендогенно.

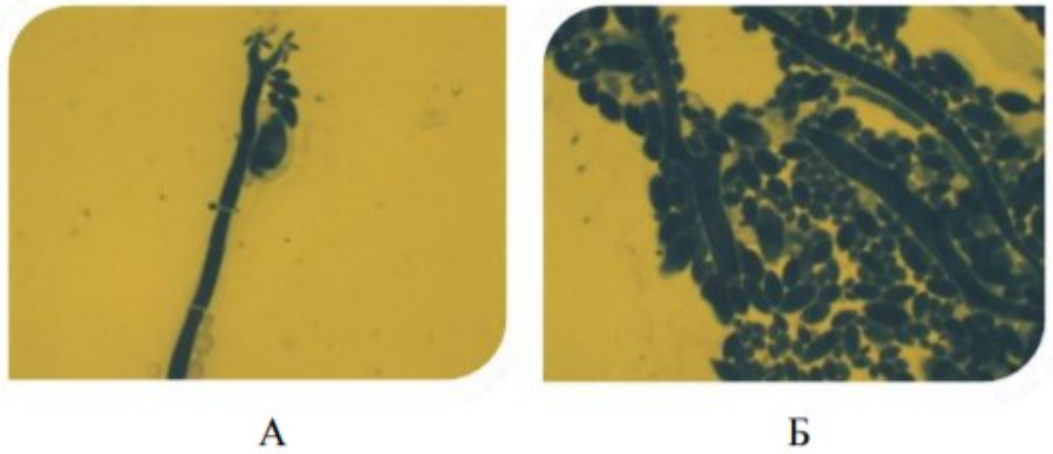


Рис. 2.2. Метод slide-культур:

А – 8-ми годинна культура (збільшення 10×100)

Б – 24-х годинна культура (збільшення 10×100)

Характер формування гігантської колонії вивчений на щільному живильному середовищі після тижневого зростання культури (рис 2.3) показав швидкий ріст колоній на 5 добу, їх діаметр досягає 60 мм. Молоді колонії були блідо-рожевого кольору, потім ставали світло-коричневими. З віком спостерігалася зміна кольору від коричневого до бархатно-чорного через велику кількість хламідоспор.



Рис. 2.3. Макроморфологія *A. pullulans*

2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки

Оптимальна температура для росту складає 27°C; при 30°C ріст йде повільно; при 37°C відсутній. Штами можуть рости на середовищі з 60% глюкози, а також на безвітамінному середовищі. Активний ріст спостерігається на середовищі з концентрацією повареної солі до 15%.

Табл. 2.4

Фізіологічні ознаки культур: асиміляція джерел азоту та

Варіант досліджу	Асиміляція азоту			Асиміляція вуглеводів*											
	NaNO ₃	(NH ₄) ₂ SO	пептон	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Штами A.pullulans	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

вуглеводів

* Примітка: 1 – глюкоза, 2 – фруктоза, 3 – сахароза, 4 – галактоза, 5 – крохмал, 6 – лактоза, 7 – ксилоза, 8 – мальтоза, 9 – сорбоза, 10 – рамноза, 11 – маноза, 12 – етанол; «+» - активний ріст

В табл. 2.4 показано, що штами *Aureobasidium pullulans* добре асимілюють глюкозу, фруктозу, сахарозу, галактозу, крохмал, лактозу, ксилозу, мальтозу, сорбозу, рамнозу, манозу та етанол. Характерний ріст на середовищах, які мають нітратну, амонійну форму азоту та пептон. Також важливо те, що штами можуть зберігати життєздатність на середовищі без джерела азоту.

Асиміляція ксилози пояснює приуроченість гриба до рослин і рослинних залишків, завдяки здатності засвоювати компоненти деревини [10, 11]

2.3. Таксономічний статус біологічного агента.

Інформація про таксономічний статус *Aureobasidium pullulans* наведена згідно on-line бази даних MocoBank в таблиці 2.5. [12]

Табл 2.5

Таксономічний статус Aureobasidium pullulans

Царство	Fungi
Відділ	Ascomycota
Підвідділ	Pezizomycotina
Клас	Dothideomycetes
Підклас	Dothideomycetidae
Порядок	Dothideales
Родина	Dothioraceae
Рід	<i>Aureobasidium</i>
Вид	<i>Aureobasidium pullulans</i>

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

Аубазидан – це позаклітинний β -глюкан (гомополісахарид), який виділяється лише деякими штамми дріждьоподібного гриба *Aureobasidium pullulans*.

Аубазидан має високі емульгувальні та плівкотвірні властивості, забезпечує лікарським препаратам м'якість, дисперсність, високі адсорбційні властивості, легку віддачу лікарських речовин та відрізняється від синтетичних речовин високою біологічною безпекою.

Також, аубазидан має потенційне застосування в косметичному, медичному та промисловому виробництві, як флокулянт, основа для мазей та емульсій. Аубазидан може утворювати біорозкладні плівки та волокна. [2, 3, 4]

3.1. Потреба у цільовому продукті

3.1.1 Розрахунок потреби цільового продукту

Щороку збільшується кількість українців, які не знаходять достатньо часу для самостійного готування їжі, тому вони купують заморожені напівфабрикати і доводять їх до готовності протягом декількох хвилин, що значно економить час. [13]

Аубазидан відноситься до нових, маловивчених полімерів. Широкий спектр його властивостей дає великі перспективи для його використання у всіх видах м'ясних продуктів. Аубазидан рекомендується до використання в заморожених продуктах тривалого зберігання (зокрема, для м'ясного фаршу) і сприяє пом'якшенню продуктів цільної структури [5]. Додавання аубазидану сприяє збереженню нативної, не денатурованої структури білків, збільшенню водоутримуючої здатності, ніжності, зменшенню втрат розморожених фаршів після теплової обробки.

НУХТ БТЕК 04.02.28 КР ПЗ

Змн	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Літ.	Арк.	Аркушів
Розробив		Свєрашин А.С.					
Керівник		Тетєрина С.М.				19	77
Рецензент							19
Н.контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

РОЗДІЛ 3
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ
ОБҐРУНТУВАННЯ

Кафедра БТМ

Також присутність аубазидану у топлому жирі збільшує термін зберігання вдвоє.

Майже всі напівфабрикати, представлені на ринку України, виготовляються в нашій країні [14]. Згідно зі статистикою, станом на 2018 рік кожен третій споживач заморожених напівфабрикатів купує дану продукцію з огляду на бренд, зокрема його пізнаваність. Більшість споживачів напівфабрикатів – це покупці віком від 25 до 65 років, вони становлять 48,5% населення. Оскільки у 2018 році населення України становило 42 млн. людей, то можна поррахувати приблизну кількість споживачів[15, 16, 17]:

$$N_{сп} = 42\,000\,000 * 0,485 = 20\,370\,000 \text{ споживачів полуфабрикатів.}$$

У структурі споживання заморожених напівфабрикатів переважають вареники і пельмені – на їх частку припадає близько 70% всіх заморожених напівфабрикатів. Припустимо, що 35% займають вареники з різними начинками, а інші 35% - м'ясні пельмені. Таким чином, кількість споживачів пельменів становить

$$N_{птв} = 20\,370\,000 * 0,35 = 7\,129\,500 \text{ осіб.}$$

Ринок України представлений такими виробниками пельменів: «Геркулес», «Три ведмеді», «Левада», «Дригало», «Ермолино» та «Белая Бяроза» [14].

Виробництво м'ясних напівфабрикатів вище зазначеними виробниками в Україні перевищує позначку 90 тис. тонн на рік, з них близько 70% використовується у виробництві пельменів, тобто 77 тис. тонн/рік. Відомо, що з 1 кг фаршу виходить 2,5 кг пельменів. Розраховуємо, скільки фаршу потрібно для виготовлення 77 тис. тонн пельменів[17]:

$$1 \text{ кг фаршу} = 2,5 \text{ кг пельменів}$$

$$X \text{ кг фаршу} = 77\,000\,000 \text{ кг пельменів}$$

$$X = (77\,000\,000 * 1) : 2,5 = 30\,800\,000 \text{ кг фаршу на рік}$$

Розраховуємо, яку кількість фаршу, в середньому споживає цільовий покупець:

$$N_{\text{спф}} = 30\,800\,000 / 7\,129\,500 = 4,32 \text{ кг/рік}$$

Раціональні режими внесення аубазидану в м'ясні продукти: концентрація аубазидану у м'ясному фарші – 1,0% від загальної маси; оптимальна температура – +10°C; тривалість витримки сформованого виробу перед термічною обробкою – 60 хвилин [5]. Потреба аубазидану для виготовлення 30 800 000 кг фаршу:

$$П = 30\,800\,000 * 0,01 = 308\,000 \text{ кг}$$

Таблиця 3.1

Розрахунок потреби аубазидану для виготовлення фаршу

Категорії споживачів	Кількість споживачів, млн	Кількість фаршу, яку споживає цільовий покупець, кг/рік	Загальна потреба фаршу на рік, кг	Концентрація аубазидану в фарші, %	Загальна потреба аубазидану для виготовлення продукту, кг
Дорослі віком від 25 до 65 років	7,129	4,32	30 800 000	1,0	308 000

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Припустимо, що нашим виробництвом ми можемо покрити 10 % потреби в аубазидані для пельменів. Визначаємо цю отребу:

Отже потужність виробництва складе:

$$G = 308\,000 \times 0,1 = 30800 \text{ кг .}$$

Приймаємо $G = 30800 \text{ кг}$

Даний полісахарид можуть синтезувати лише деякі штами дріжджоподібного гриба *Aureobasidium pullulans*. Використовуватимемо штам *A. pullulans* 82 Л, який має суттєві переваги серед інших штамів – він стабільний, можливе використання в промисловому виробництві, тривалість культивування менша в 2 рази у порівнянні з найближчим по характеристиках штамом *A. pullulans* ВКПМ F-371. Даний штам синтезує

15,3 грами аубазидану на 1 літр культуральної рідини. Кількість культуральної рідини, необхідної для отримання 30800 кг аубазидану становить:

$$0.0153 \text{ кг} - 1 \text{ л};$$

$$30800 \text{ кг} - X;$$

$$X = (30800 * 1) : 0,0153 \approx 2013 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (30 %), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{кр.} = 2013 / (1 - (0,3 + 0,1)) = 3355 \text{ м}^3.$$

3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів

Для розрахунку виробничих циклів або партій продукту необхідно знати тривалість виробничого циклу найбільш довгої технологічної операції. Як, правило, це час виробничого біосинтезу із врахуванням часу на підготовку ферментера. $T_{цф} = 76$ год - цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (68 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год). Підготовка ферментера включає: підігрів апарату (0,5 год), миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (1 год), стерилізація (1 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год). (Додаток 3 № 8484).

Аубазидан отримують сухим з залишковою вологою $W = 5-10 \%$, отже сухої речовини в продукті буде $CP = 0,9-0,95$. Приймаємо кількість робочих трудоднів 300, тоді кількість продукту за добу становитиме:

$$V_d = V_{кр} / T_{рд} = 3355 / 300 = 11,2 \text{ м}^3$$

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

$$V_{пц} = (K_1 * V_d * T_{цф}) / 24 = (1,1 * 11,2 * 76) / 24 = 39 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

Таку кількість (39 м³) культуральної рідини ($V_{цк}$) можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}} / K_{\text{зап}} = 39 / 0,62 = 62,9 \text{ м}^3$, де $K_{\text{зап}} = 0,62$ – коефіцієнт заповнення ферментера. Знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_{\text{ф}} = 63 \text{ м}^3$. Уточнюємо коефіцієнт заповнення $K_{\text{зф}} = V_{\text{цк}}/V_{\text{ф}} = 39 / 63 = 0,62$.

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища .

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}}/(1+X_{\text{ф}}) = 39/(1+0,1) = 35,45 \text{ м}^3$, де $X_{\text{ф}}$ – доза посівного матеріалу, $V_{\text{роб.1}} = 39 \text{ м}^3$.

Кількість посівного матеріалу становить $V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 39 - 35,45 = 3,55 \text{ м}^3$.

Для одержання 3,55 м³ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 %.

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

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}}/1(1 - E_{\text{па}}) = 3,55/(1-0,1) = 4 \text{ м}^3$$

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

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}}/(1+X_{\text{па}}) = 4/(1+0,1) = 3,64 \text{ м}^3$, де $X_{\text{па}}$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб2}} - V_{\text{пс2}} = 4 - 3,64 = 0,36 \text{ м}^3 \text{ або } 360 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.2}} = 4$ можна одержати під час культивування дріжджів у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{па2}} = V_{\text{роб.2}}/K_{\text{зап}} = 4/0,62 = 6,45 \text{ м}^3 .$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 6,3$ м³ уточнюємо раніше прийнятий коефіцієнт заповнення

$$K_3 = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф}} = 4 / 6,3 = 0,64$$

Для одержання 360 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 360 / (1 - 0,10) = 400 \text{ л}$$

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

$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 400 / (1 + 0,1) = 364 \text{ л}$, де $X_{\text{ін}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 400 - 364 = 36 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.3}} = 400$ л можна одержати під час культивування дріжджів в інокуляторі геометричним об'ємом

$$V_{\text{ін3}} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап}} = 400 / 0,62 = 646 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 630$ л (див. додаток 4), уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{31} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сф}} = 400 / 630 = 0,64.$$

Для одержання 36 л посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в малому інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 36 / (1 - 0,10) = 40 \text{ л}$$

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

$V_{пс4} = V_{роб.4}/(1+X_{ін}) = 40/(1+0,1) = 36,4$ л , де $X_{ін} = 0,10$ –доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 40 - 36,4 = 3,6 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.4} = 40$ л можна одержати під час культивування дріжджів в малому інокуляторі геометричним об'ємом

$$V_{ін4} = V_{роб.4}/K_{зап} = 40/0,62 = 64,6 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{сф} = 63$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.4}/V_{сф} = 40/63 = 0,64.$$

Для одержання 3,6 л посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в малому інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.5} = V_{пм3}/(1-E_{ін}) = 3,6/(1-0,10) = 4 \text{ л}$$

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

$V_{пс5} = V_{роб.4}/(1+X_{ін}) = 4/(1+0,1) = 3,64$ л , де $X_{ін} = 0,10$ –доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм5} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 4 - 3,64 = 0,36 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.4} = 4$ л можна одержати під час культивування дріжджів в малому інокуляторі геометричним об'ємом

$$V_{ін5} = V_{роб.4}/K_{зап} = 4/0,62 = 6,46 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{сф} = 6,3$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.4}/V_{сф} = 4/6,3 = 0,64.$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{пм5}} = 0,36$ л можна одержати культивуванням дріжджів у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}}=0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме $N_{\text{колб}} = V_{\text{пм5}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 360 / (750 \cdot 0,2) = 2,4 \approx 3$.

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

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу аубазидану у ферментері об'ємом 63 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,62 буде проходити у чотири етапи:

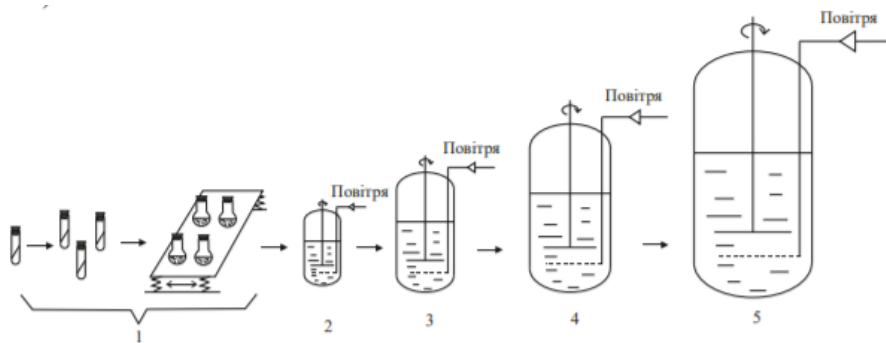


Рис. 3.1. Схема приготування посівного матеріалу *A. Pullulans* 82 л: 1 – вирощування в лабораторії в колбах на качалках; 2 – вирощування в інокуляторі об'ємом 6,3 л, 3 – вирощування в інокуляторі об'ємом 63 л, 4 – вирощування в інокуляторі об'ємом 0,63 м³, 5 – вирощування в інокуляторі об'ємом 6,3 м³

РОЗДІЛ 4

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

4.1 Вибір способу культивування і типу ферментера.

Біосинтез аубазидану відбувається одночасно з ростом продуцента, максимальна швидкість його утворення досягається у стаціонарній фазі росту, тому у разі безперервного культивування продуктивність біосинтезу буде знижуватися.

A. pullulans продукує аубазидан при культивуванні на середовищі, що містить глюкозу, сахарозу, крохмаль в якості джерел вуглецю. Культивування будемо здійснювати при постійнійному перемішуванні та аерації. Оптимальна температура для росту складає від 21°C до 23°C, при відхиленні від цих температур ріст йде повільно. Ризик контамінації високий, тому культивування проводитимемо в асептичних умовах, тобто необхідна стерилізація обладнання, комунікації і поживного середовища. Посівний матеріал асептично вносимо в посівний апарат зі стерильним поживним середовищем для вирощування посівного матеріалу для ферментеру, із посівного апарату посівний матеріал стерильно передаємо у ферментер зі стерильним поживним середовищем.[9]

Можна підвести підсумок, культивування *A.pullulans* будемо проводити глибинно та періодично, оскільки мікроорганізм розвивається в формі дріжджових клітин. Обов'язкова постійна аерація та забезпечення асептичних умов.

Глибинне культивування зазвичай проводять у вертикальних ємностях різного розміру, що називаються ферментаторами. Основною вимогою до ферментатора є – можливість проведення процесу культивування продуцента в асептичних умовах при інтенсивній аерації середовища.

НУХТ БТЕК 04.02.28 КР ПЗ

Змн	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Лім.	Арк.	Аркушів
Розробив		Євграшин А.С.					
Керівник		Тетеріна С.М.				27	77
Рецензент							27
Н.контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

РОЗДІЛ 4
ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ
СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

Кафедра БТМ

Для підтримання стерильних умов ферментатори мають бути абсолютно герметичними, а всі лінії трубопроводів мають бути доступні до обробки гарячою парою.[18]

Мішалки радіального типу забезпечують добре диспергування повітря (подрібнення бульбашок) і добре перемішування безпосередньо в зоні мішалки. Осьові мішалки мають більш низьке значення локальної дисипації енергії і забезпечують більш рівномірне вкладення енергії за обсягом апарату. Використання тільки радіального потоку мішалок в багатоярусній конструкції перемішуючого пристрою призводить розмикання загального контуру циркуляції рідини на окремі зони з різною інтенсивністю перемішування і слабкого перемішування на периферії. Як правило, кількість лопатей застосовуваних турбінних мішалок становить 6. Збільшення кількості лопатей до 8 дає ефект для нижнього ярусу, але помітно збільшує витрату потужності на перемішування. Збільшення кількості лопатей на диску турбінної мішалки знижує значення швидкості аерації, при якій відбувається зниження споживаної потужності, і відсуває межу нормальної роботи мішалки, після якого відбувається захлинання. Відстань від нижньої мішалки до дна апарату рекомендується приймати рівним $1/4$ від діаметра апарату. Більша відстань ускладнює диспергування повітря в нижній частині апарату, а менша відстань залишає занадто великий простір у верхній частині апарату, який починає працювати в цьому випадку як барботажна колона.

При великій ємності ферментера і висоти стовпа рідини, збільшується число ярусів мішалки. Однак одним з недоліків ферментерів, у яких встановленні багатоярусні пристрої, є нерівномірний розподіл біомаси та інших інгредієнтів по висоті апарату.

Отже, всередині ферментера повинно бути встановлена багатоярусна турбінна мішалка з відкритими лопатями, яка обертається зі швидкістю 250 об / хв. Для запобігання утворення воронки в апараті обов'язково повинні бути відбивні перегородки, які також сприяють виникненню

вихорів і збільшенню турбулентності системи. Повітря надходить у ферментер через барботер, що встановлюється під нижнім ярусом мішалки. За своїми розмірами барботер повинен бути трохи менше діаметру мішалки, щоб повітря, яке виходить з нього потрапляло під диск мішалки і дробилося лопатками нижньої мішалки. Для контролю рівня рН (7.0) культуральної рідини ферментер оснащується датчиком рН. Оскільки температура повинна бути в межах від 21°C до 23°C, ферментер повинен датчик температури. [19,20]

З замовленням щодо виробництва ферментера з такими параметрами, об'ємом 63 м³ та коефіцієнтом заповнення 0.62, можна звернутися до фірми « zeta Holding GmbH» (Австрія) [<https://www.zeta.com/>]. Компанія ZETA розробляє біореактори і системи ферментації за технічними умовами замовника для виробництва активних фармацевтичних інгредієнтів з клітинних, дріжджових і бактеріальних культур. Процес культивування може бути періодичним, періодичним з підживленням або безперервним. ZETA пропонує своїм клієнтам повний спектр послуг: проектування (концептуальне, базисне, деталізоване) біореакторів і систем ферментації, їх виготовлення і установку, кваліфікацію і автоматизацію, введення в експлуатацію, технічне обслуговування.

При цьому ZETA справляється з найскладнішими технічними завданнями такими, як:

- усуненням застійних зон
- належною якістю перемішування
- повним очищенням внутрішніх поверхонь
- підбором необхідних матеріалів
- забезпеченням стерильності на всьому протязі процесу
- точністю управління технологічним процесом
- розробкою дизайну ферментаційної системи

– необхідним гігієнічним виконанням

4.2 Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій.

Для підготовки обладнання та комунікацій використовують СІР-мийку каустичною содою.

Після миття та ополіскування обладнання потрібно провести його огляд з метою виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. Для цього на апараті закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску $P = 0,1 - 0,2$ МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують покази манометра на кришці апарату та час витримки (60 хв). Якщо падіння тиску перевищує 0,01 МПа, здійснюють пошук неущільнень на апараті та у місцях з'єднання запірної арматури з комунікаціями. У разі їх знаходження замінюють прокладки та проводять підтягування різьбових з'єднань.

Для стерилізації обладнання та комунікацій використовують термічну стерилізацію водяною насиченою парою з тиском $P = 0,28 - 0,3$ МПа.

Спочатку апарати прогрівають до температури 80–90 °С. Потім віркивають всю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарату комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через барботер, що встановлюється під нижнім ярусом мішалки, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації 130–135 °С закривають усю запірну арматуру на апараті, крім парової, і витримують заданий час стерилізації.

Після стерилізації потрібно провести охолодження. Закриваються уся запірна арматура подачі пари в апарат. У сорочку подається холодна вода. Для компенсації падіння тиску в апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури до 30–40 °С і надлишкового тиску $P = 0,003 - 0,005$ МП.

4.3 Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря для одержання аубазидану.

Для стерилізації повітря в боксах та лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом, використовують УФ-лампи.

Очищення повітря буде проводитись за допомогою волокнистих і пористих матеріалів. Саме таким способом можна одержати повітря зі ступенем чистоти 99,99%. Завислі в повітрі частки затримуються волокнистим матеріалом завдяки інерційному і дифузійному механізму осадження. Оскільки механізми осадження мають різну природу і зазвичай один із них переважає над іншим, необхідно застосувати фільтрувальний матеріал різної структури. Для очищення повітря застосовуються фільтри головні та індивідуальні фільтри [21].

Головні фільтри заповнюються набивним волокном і встановлюються в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На цих фільтрах видаляється близько 98 % мікроорганізмів-контамінантів. Індивідуальні фільтри заповнюються надтонкими мембранами або волокнами, це дає змогу отримати повітря зі ступенем очистки 99,9%

4.4 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.

Поживне середовище для вирощування *A.pullulans* 82 Л з метою одержання цільового продукту – аубазидану, має наступний склад, г/л:

Сахароза – 30,0

Екстракт кукурудзяний – 15,0

NaNO₃ – 4,0

KH₂PO₄ – 1,5

KCl – 0,8

MgSO₄ * 7 H₂O – 0,8

FeSO₄ – 0,015

Виробничий процес здійснюється у ферментері об'ємом 63 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,62. Підготовка посівного матеріалу відбувається у чотири етапи (в колбах на качалці та інокуляторах об'ємом: 0,063; 0,63; 6,3 м³).

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках потрібно здійснювати в автоклаві, так як об'єм невеликий. Для вирощування в інокуляторі та виробничого біосинтезу – безпосередньо в самих апаратах при рН 4-4,5.

Оскільки стерилізацію поживного середовища для вирощування *A.pullulans* 82 Л в колбах на качалках потрібно проводити в автоклаві, то його склад можна поділити на такі композиції:

Композиція А: сахароза, кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112°C, 0,05 МПа, 30 хв).

Композиція Б: KH₂PO₄ (режим стерилізації: 130°C, 0,15МПа, 50 хв).

Композиція В: NaNO_3 , KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, FeSO_4 (режим стерилізації: 130°C , $0,15\text{МПа}$, 50 хв).

Сахароза та кукурудзяний екстракт (композиція А) є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації. Фосфати (композиція Б) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію. Солі композиції В стерилізують при стандартній для солей температурі.

Стерилізацію поживного середовища для вирощування *A.pullulans* 82 Л в інокуляторах та для виробничого біосинтезу у ферментері проводять безпосередньо в самих апаратах, тому його склад можна поділити на такі композиції:

Композиція А: сахароза, кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112°C , $0,05 \text{ МПа}$, 30 хв).

Композиція Б: KH_2PO_4 , NaNO_3 , KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, FeSO_4 (режим стерилізації: 131°C , $0,15\text{МПа}$, 50 хв).

Солі композиції Б змішуються у збірниках, які знаходяться перед інокуляторами. В них за температури 40°C та перемішування розчиняються солі, після чого потрапляють в інокулятор. Тут середовище підкислюється $6\% \text{ HCl}$ (до рН 4,0-4,5), для унеможливлення утворення осадів.

РОЗДІЛ 5
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу аубазидану

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевією сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр попередньої очистки	1	Фільтруючий матеріал – скловолокно, швидкість фільтрування 0,5 м/с, Е = 95 % [1]
К-3	Компресор	1	Гвинтовий повітряний компресор COMPRAG A-9010, потужність – 90кВт, тиск – 1 мПа, продуктивність 12,53 м ³ /хв [2]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Повітроохолоджувач фреоновий КФО 40-20 1150 м3/год [3]
Р-5	Ресивер-вологовідділювач	1	Ресивер серії РВ-1500 фірми «Укргазкомплект»

НУХТ БТЕК 04.02.28 КР ПЗ

Змн	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
					РОЗДІЛ 5 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розробив		Євграшин А.С.					34	77
Керівник		Тетеріна С.М.						34
Рецензент						Кафедра БТМ		
Н.контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

			(Україна), об'єм 1,5 м3, робочий тиск 1 МПа [4]
T-6	Теплообмінник-нагрівач		Теплообмінник КС 1750. Кількість повітря 4500 м3/год [5]
Ф-7	Фільтр головний		Фільтруючий матеріал – скловолокно, швидкість фільтрування 0,42 м/с, E = 99,995 % [1]
P-8	Реактор-змішувач для приготування розчинів хлорантоїну та дезактіну	1	Реактор-змішувач «STS» з харчової нержавіючої сталі AISI 304 об'ємом 10 л з паровою сорочкою та перемішувачим пристроєм [6] Орієнтовні розміри: Висота – 1 м Діаметр – 0,8 м
P-10	Реактор-змішувач для приготування розчину 6% HCl	1	Реактор-змішувач «STS» з харчової нержавіючої сталі AISI 304 об'ємом 25 л з паровою сорочкою та перемішувачим пристроєм [6] Орієнтовні розміри: Висота – Висота – 0,7 м Діаметр – 0,5 м

P-11	Реактор-змішувач для приготування композиції Б (KH_2PO_4 , NaNO_3 , KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeSO_4)	1	Реактор-змішувач «STS» з харчової нержавіючої сталі AISI 304 об'ємом 6 л з паровою сорочкою та перемішувачим пристроєм [6] Орієнтовні розміри: Висота – 0,8 м Діаметр – 0,5 м
ФІ-12 ФІ-14 ФІ-17 ФІ-20 ФІ-23 ФІ-26 ФІ-33 ФІ-39	Фільтри індивідуальної очистки	8	Фільтруючий матеріал – скловолокно, $E = 99,99999999\%$ [7]
ПА-13	Посівний апарат об'ємом 6,3 л		Біореактор BIOSTAT® B-DCU II [8], виготовлений з нержавіючої сталі AISI 304, обладнаний паровою сорочкою та турбінною мішалкою (220 – 240 об/хв) Орієнтовні розміри: Висота – 0,8 м Діаметр – 0,5 м
P-15	Реактор-змішувач для приготування композиції А (сахароза,	1	Реактор-змішувач «STS» з харчової нержавіючої сталі

	кукурудзяний екстракт)		AISI 304 об'ємом 20 л з паровою сорочкою та перемішувачим пристроєм [6] Орієнтовні розміри: Висота – 1,7 м Діаметр – 0,9 м
P-16	Реактор-змішувач для приготування композиції Б (KH_2PO_4 , NaNO_3 , KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeSO_4)	1	Реактор-змішувач «STS» з харчової нержавіючої сталі AISI 304 об'ємом 10 л з паровою сорочкою та перемішувачим пристроєм [6] Орієнтовні розміри: Висота – 1,5 м Діаметр – 0,7 м
ПА-18	Посівний апарат об'ємом 63 л	1	Біореактор з нержавіючої сталі під замовлення «Sartorius», обладнаний паровою сорочкою та турбінною мішалкою (220 – 240 об/хв) [9] Орієнтовні розміри: Висота – 2 м Діаметр – 2 м
P-21	Реактор-змішувач для приготування композиції А (сахароза, кукурудзяний екстракт)	1	Реактор-змішувач «STS» з харчової нержавіючої сталі AISI 304 об'ємом 200 л з паровою сорочкою та

			перемішуючим пристроєм [6] Орієнтовні розміри: Висота – 3 м Діаметр – 2,5 м
P-22	Реактор-змішувач для приготування композиції Б (KH_2PO_4 , NaNO_3 , KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeSO_4)	1	Реактор-змішувач «STS» з харчової нержавіючої сталі AISI 304 об'ємом 300 л з паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм [6] Орієнтовні розміри: Висота – 3 м Діаметр – 2,5 м
ПА-24	Посівний апарат об'ємом 630 л	1	Біореактор з нержавіючої сталі під замовлення «Sartorius», обладнаний паровою сорочкою та турбінною мішалкою (220 – 240 об/хв) [9] Орієнтовні розміри: Висота – 3,5 м Діаметр – 2,5 м
P-27	Реактор-змішувач для приготування композиції А (сахароза, кукурудзяний екстракт)	1	Реактор-змішувач «STS» з харчової нержавіючої сталі AISI 304 об'ємом 2000 л з паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм [6] Орієнтовні розміри:

			Висота – 4 м Діаметр – 4 м
Н-28 Н-31	Кулачковий насос	2	Харчовий кулачковий насос серії НМ, продуктивність від 2м ³ /год до 10м ³ /год [10]
Р-30	Реактор-змішувач для приготування композиції Б (КН ₂ РО ₄ , NaNO ₃ , KCl, MgSO ₄ * 7 H ₂ O, FeSO ₄)	1	Реактор-змішувач «STS» з харчової нержавіючої сталі AISI 304 об'ємом 3000 л з паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм [6] Орієнтовні розміри: Висота – 4 м Діаметр – 4 м
Р-32	Реактор-змішувач для приготування 6% NaOH	1	Реактор-змішувач «STS» з харчової нержавіючої сталі AISI 304 об'ємом 16 л з паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм [6] Орієнтовні розміри: Висота – 1,5 м Діаметр – 0,7 м
ПА-34	Посівний апарат об'ємом 6,3 м ³	1	Біореактор з нержавіючої сталі під замовлення «Sartorius», обладнаний паровою сорочкою та турбінною

			мішалкою (220 – 240 об/хв) [9] Орієнтовні розміри: Висота – 5 м Діаметр – 3 м
Р-36	Реактор-змішувач для приготування поживного середовища	1	Реактор-змішувач «STS» з харчової нержавіючої сталі AISI 304 об'ємом 63м ³ з паровою сорочкою та перемішувачим пристроєм [6] Орієнтовні розміри: Висота – 6 м Діаметр – 4 м
Н-37	Кулачковий насос	1	Харчовий роторний кулачковий насос JesPumps продуктивність до 100м ³ /год [11]
ФР-39	Ферментер об'ємом 63 м ³	1	Ферментер під замовлення «zeta Holding GmbH», обладнаний паровою сорочкою та турбінною мішалкою (220 – 240 об/хв) (Австрія) [12] Орієнтовні розміри: Висота – 6 м Діаметр – 4 м

1 – <https://www.camfil.com/product/documents/dam/42225/Product-Documentation-Absolute-VGXL-VGXXL-ProSafe.pdf>, 2 – <https://airgroup.com.ua/ua/p538372801-vozdushnyj-vintovoj-kompressor.html>, 3 – <http://grand-kiev.com.ua/ua/kanalne-obladnannya/>, 4 – <https://prom.ua/ua/p1434175400-resiver-vozduhosbornik-500.html>, 5 –

https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system, 6 –
<https://stprom.com.ua/ua/p1016443350-reaktor-himicheskij-meshalkoj.html>, 7 –
<https://www.camfil.com/product/documents/dam/35922/>, 8 –
https://www.sartogsm.ru/biostat_b_dcu_ii.html, 9 – <http://sartorius-sd.com.ua/index.php>, 10 –
<https://www.board.com.ua/m0419-2008677526-pischevoj-kulachkovyj-nasos-2m3-chas-do-10m3.html>, 11 – <https://www.avprom.su/nasosnoe-oborudovanie/pishchevye-nasosy/kulachkovye-rotornye.html>. 12 – <https://www.zeta.com/>

РОЗДІЛ 6
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ
***AEROBASIDIUM PULLULANS* 82 Л**

Технологічна схема накопичення біомаси включає в себе допоміжні роботи такі як санітарна підготовка виробництва, підготовка аераційного повітря, підготовка і стерилізація титрувальних розчинів, поживного середовища; та технологічний процес: підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту. Технологічну схему накопичення біомаси наведено в графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка мийних та дезінфікувальних засобів

Для запобігання контамінації та дотримання чистоти на підприємстві використовують мийні засоби. Розчини готують в реакторах. Приготовані мийні та дезінфікуючі засоби використовують для санітарної обробки (миття та дезінфекції) приміщень, технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю, санітарно-технічного обладнання тощо.

ДР 1.1.1. Приготування розчину Дезактіну та Хлорантоїну. Для приготування 0,2% розчинів використовуємо збірник об'ємом 10 л. Засоби варто змінювати з інтервалом в 3 місяці для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів. Готовий розчин до ДР 1.2

ДР 1.1.2. Приготування розчину каустичної соди. 2% розчини каустичної соди готують поступово під час миття обладнання.

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання виробничих приміщень

Один раз на зміну проводять миття підлоги, використовуючи розчин мийно-дезінфікувального засобу Хлорантоїну або Дезактіну (від ДР 1.1.1).

					НУХТ БТЕК 04.02.28 КР ПЗ			
<i>Змн</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 6 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ <i>AEROBASIDIUM PULLULANS</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>	<i>Євграшин А.С.</i>						42	77
<i>Керівник</i>	<i>Тетеріна С.М.</i>					42		
<i>Рецензент</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н.контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

Цим же розчином протирають ззовні апаратуру і комунікації; змочують килимки при вході у всі приміщення.

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень

Раз на місяць проводять миття стін, вікон та дверей, використовуючи розчин мийно-дезінфікувального засобу Хлорантоїну аб Дезактіну (від ДР 1.1.1). Протирають ззовні апаратуру і комунікації.

Для перевірки мікробіологічної чистоти проводять мікробіологічний контроль ($KУО < 500/см^2$).

ДР 1.3. Підготовка технологічного обладнання

ДР 1.3.1. Миття

Обробку технологічного обладнання та комунікацій проводять 2% розчином каустичної соди протягом 60-90 хв. Після дезінфекції проводять мікробіологічний контроль. Ополіскування прододиться очищеною водою.

ДР 1.3.2. Ополіскування

Ополіскування прододиться очищеною водою.

ДР 1.3.3. Технічний огляд

Після миття та ополіскування проводять технічний огляд обладнання з метою виявлення можливих неущільнень. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.3.4. Перевірка на герметичність

Для перевірки на герметичність подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску $P = 0,1 - 0,2$ МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують покази манометра на кришці апарату та час витримки (60 хв).

ДР 1.3.5. Стерилізація

Для стерилізації обладнання та комунікацій використовують термічну стерилізацію водяною насиченою парою з тиском $P = 0,28-0,3$ МПа за температури $130-135$ °С.

ДР 1.3.6. Охолодження

Процес охолодження здійснюють до досягнення температури до $30-40$ °С і надлишкового тиску $P = 0,003-0,005$ МПа

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря

Необхідний об'єм атмосферного повітря забирають на висоті $15-20$ м (ПЗ-2).

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення повітря

Повітря пропускають через набивний фільтр (Ф-3), де відбувається затримка пилу та інших крупних часточок бруду до ступеня очищення $E = 90\%$. Фільтруючий матеріал – плетена алюмінієва проволка.

ДР 2.3. Компресування повітря

Відбувається стиснення повітря у компресорі (К-4) до температури $120-250$ °С і тиску $0,4$ МПа.

ДР 2.4. Охолодження повітря

У теплообміннику (Т-5) температура повітря знижується до $25-30$ °С.

ДР 2.5. Видалення зайвої вологи

У ресивері-вологівідділювачі (Р-6) відбувається видалення зайвої вологи до вмісту $W = 60\%$.

ДР 2.6. Нагрівання повітря

Для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів охолоджене повітря у теплообміннику (Т-7) нагрівають до температури 35 °С.

ДР 2.7. Головне тонке очищення повітря

Повітря пропускають через головний фільтр (Ф-8), в якому фільтрувальним матеріалом є нержавіюча сталеві сітка. Ступінь очищення становить $E = 98 \%$.

ДР 2.8. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом встановлюють індивідуальний фільтр (Ф-10, Ф-17, Ф-27, Ф-29). Фільтрувальним матеріалом є фторопласт. Ступінь очищення становить $E = 99,999 \%$.

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних розчинів

ДР 3.1. Приготування титрувального агенту 6% HCl.

Для створення рН розчину солей в межах 4,0-4,5 перед стерилізацією, у посівні апарати додають 6% HCl в кількості 0,2 % від об'єму культуральної рідини.

ДР 3.1.1. Приготування титрувального агенту 6% HCl

У реактор об'ємом 25 л через об'ємний дозатор подають 15 л питної води. Потім додають 3,1 л 36% розчину HCl. В сорочку апарата подають холодну воду та вмикають перемішувальний пристрій (50 об/хв).

ДР 3.2. Приготування та стерилізація титрувального агенту 6% NaOH.

Для доведення рН середовища до оптимального, після стерилізації при рН 4,0-4,5, додають 6% NaOH (контроль рН) з розрахунком в кількості 0,2 % від об'єму культуральної рідини. Розчин лугу додають в охолоджене поживне середовище.

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація титрувального агенту 6% NaOH для посівного апарату об'ємом 6,3 л.

На технічних вагах зважують 0,55 г NaOH і вносять у колбу об'ємом 20 мл, доливають 9,45 мл дистильованої води. Після змішування колбу закривають ватномарлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С, 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація титрувального агенту 6% NaOH для посівного апарату об'ємом 63 л.

На технічних вагах зважують 5,5 г NaOH і вносять у колбу об'ємом 200 мл, доливають 95 мл дистильованої води. Після змішування колбу закривають ватномарлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С, 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР 3.2.3. Приготування та стерилізація титрувального агенту 6% NaOH для посівного апарату об'ємом 0,63 м³.

На технічних вагах зважують 55 г NaOH і вносять у колбу об'ємом 2 л, доливають 945 мл дистильованої води. Після змішування колбу закривають ватномарлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С, 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР 3.2.4. Приготування та стерилізація титрувального агенту 6% NaOH посівного апарату об'ємом 6,3 м³.

На технічних вагах зважують 550 г NaOH і вносять у реактор об'ємом 16 л та через об'ємний дозатор подають 9,45 л питної води. Потім стерилізують при 131 °С, 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ.

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках.

Для вирощування посівного матеріалу необхідно приготувати 364 мл поживного середовища (10% від об'єму середовища). Джерелом вуглецю є сахароза, джерелом азоту – нітрат натрію і кукурудзяний екстракт.

Вміст компонентів для приготування 364 мл середовища наведений в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 364 мл середовища, мг (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Сахароза	30,0	11	А	100
Кукурудзяний екстракт	15,0	5,5		
Вода		100 (мл)		
КН ₂ РО ₄	1,5	0,55	Б	115
Вода		115 (мл)		
NaN O ₃	4,0	1,5	В	115
KCl	0,8	0,3		

MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,8	0,3		
FeSO ₄	0,015	0,005		
Вода		115 (мл)		

ДР 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 11 г сахарози і 5,5 г кукурудзяного екстракту. Наважку переносять у колбу об'ємом 250 мл, додають 100 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, 0,05 МПа, протягом 30 хв.

ДР 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б.

На технічних вагах зважують 0,55 г КН₂РО₄. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 115 мл дистильованої води, перемішують, закривають ватномарлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131°С, 0,15МПа, 50 хв.

ДР 4.1.3 Приготування і стерилізація композиції В.

На технічних вагах зважують усі солі: NaNO₃ – 1,5 г, КСl – 0,3 г, MgSO₄ * 7 H₂O – 0,3 г, FeSO₄ – 0,005 г. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 115 мл дистильованої води, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131°С, 0,15 МПа, 50 хв

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 6,3 л.

Для культивування в посівному апараті(ПА-12) необхідно приготувати 3,64 л поживного середовища.

Для засіву посівного апарату використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 360 мл (10% від загального об'єму середовища), загальну кількість води, яку необхідно додати для приготування поживного середовища становить 3,3 л. Для приготування поживного середовища використовуємо водопровідну воду, так як у середовищі немає кальцію, джерелом якого є саме така вода. Оскільки композиція Б стерилізується в посівному апараті, тоді враховуємо 10% конденсату. Вміст компонентів для приготування 3,64 л середовища наведено в табл. 6.2.

ДР 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 110 г сахарози і 55 г кукурудзяного екстракту. Наважку переносять у колбу об'ємом 3 л, додають 1,2 л питної води, перемішують, закривають і стерилізують в при температурі 112 °С, 0,05 МПА, протягом 30 хв.

Таблиця 6.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3,64 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 3,64 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	30,0	110	А	1,2
Кукурудзяний екстракт	15,0	55		
Вода		1,2 (л)		
КН ₂ РО ₄	1,5	5,5		2,1

NaNO ₃	4,0	15	Б	
KCl	0,8	3		
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,8	3		
FeSO ₄	0,015	0,05		
Вода		2,1 (л)		

ДР 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б.

На технічних вагах зважують усі солі: KH₂PO₄ – 5,5 г, NaNO₃ – 14,6 г, KCl – 3 г, MgSO₄ * 7 H₂O – 3 г, FeSO₄ – 0,05 г. Наважку поміщають у збірник об'ємом 6 л, додають 2,1 л водопровідної води. Отриманий розчин підкислюють до рН 4 - 4.5 розчином соляної кислоти від ДР 3.1.1 (для унеможливлення утворення осадів). Середовище стерилізують при 131°C, 0,15 МПа, 50 хв.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 63 л.

Для культивування в посівному апараті(ПА-17) необхідно приготувати 36,4 л поживного середовища.

Для засіву посівного апарату використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 3,64 л (10% від загального об'єму середовища), загальну кількість води, яку необхідно додати для приготування поживного середовища становить 33 л. Також враховуємо 10% конденсату для всіх композицій. Вміст компонентів для приготування 36,4 л середовища наведено в табл. 6.3.

ДР 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 1100 г сахарози і 550 г кукурудзяного екстракту. Наважку переносять у збірник(Р-14) об'ємом 20 л, додають 8,5 л водопровідної води, вмикають перемішувальний пристрій (50 об/хв) до

розчинення компонентів, і стерилізують в при температурі 112 °С, 0,05 МПа, протягом 30 хв.

Таблиця 6.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 36,4 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 36,4 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	30,0	1100	А	10
Кукурудзяний екстракт	15,0	550		
Вода		8,5 (л)		
KH ₂ PO ₄	1,5	55	Б	20
NaNO ₃	4,0	146		
KCl	0,8	30		
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,8	30		
FeSO ₄	0,015	0,5		
Вода		20 (л)		

ДР 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б.

На технічних вагах зважують усі солі: KH₂PO₄ – 55 г, NaNO₃ – 146 г, KCl – 30 г, MgSO₄ * 7 H₂O – 30 г, FeSO₄ – 0,5 г. Наважку поміщають спочатку у збірник(Р-15) об'ємом 30 л, а потім подають у посівний апарат об'ємом 63 л через мірник додають 20 л водопровідної води, вмикають перемішувальний пристрій (50 об/хв) до розчинення компонентів. Отриманий розчин підкислюють до рН 4 - 4.5 розчином соляної кислоти від ДР 3.1.1 (для унеможливлення утворення осадів). Середовище стерилізують при 131°С, 0,15 МПа, 50 хв. г

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,63 м³.

Для культивування в посівному апараті(ПА-23) необхідно приготувати 364 л поживного середовища.

Для засіву посівного апарату використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 3,64 л (10% від загального об'єму середовища), загальну кількість води, яку необхідно додати для приготування поживного середовища становить 330 л. Також враховуємо 10% конденсату для всіх композицій. Вміст компонентів для приготування 364 л середовища наведено в табл. 6.4.

ДР 4.4.1 Приготування і стерилізація композиції А.

Через ваговий дозатор в збірник(Р-20) об'ємом 200 л подають 11 кг сахарози і 5,5 кг кукурудзяного екстракту. За допомогою мірника додають 85 л водопровідної води, вмикають перемішувальний пристрій (50 об/хв) до розчинення компонентів, і стерилізують в при температурі 112 °С, 0,05 МПА, протягом 30 хв.

Таблиця 6.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 364 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 364 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	30,0	11000	А	100
Кукурудзяний екстракт	15,0	5500		

Вода		84 (л)		
KH ₂ PO ₄	1,5	550	Б	200
NaNO ₃	4,0	1460		
KCl	0,8	300		
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,8	300		
FeSO ₄	0,015	5		
Вода		198 (л)		

ДР 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б.

На технічних вагах зважують усі солі: KH₂PO₄ – 550 г, NaNO₃ – 1460 г, KCl – 300 г, MgSO₄ * 7 H₂O – 300 г, FeSO₄ – 5 г. Наважку поміщають спочатку у збірник(Р-21) об'ємом 300 л, а потім подають у посівний апарат об'ємом 630 л, через мірник додають 198 л водопровідної води, вмикають перемішувальний пристрій (50 об/хв) до розчинення компонентів. Отриманий розчин підкислюють до рН 4 - 4.5 розчином соляної кислоти від ДР 3.1.1 (для унеможливлення утворення осадів). Середовище стерилізують при 131°C, 0,15 МПа, 50 хв. г

ДР 4.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 6,3 м³.

Для культивування в посівному апараті(ПА-33) необхідно приготувати 3640 л поживного середовища.

Для засіву посівного апарату використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 364 л (10% від загального об'єму середовища), загальну кількість води, яку необхідно додати для приготування поживного середовища становить 3300 л. Також враховуємо

10% конденсату для всіх композицій. Вміст компонентів для приготування 3640 л середовища наведено в табл. 6.5.

Таблиця 6.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3640 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 3640 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	30,0	110	А	1000
Кукурудзяний екстракт	15,0	55		
Вода		840 (л)		
KH_2PO_4	1,5	5,5	Б	2000
NaNO_3	4,0	14,6		
KCl	0,8	3		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,8	3		
FeSO_4	0,015	0,05		
Вода		1980 (л)		

ДР 4.5.1 Приготування і стерилізація композиції А.

Через ваговий дозатор(Д-24) в збірник(Р-26) об'ємом 2000 л подають 110 кг сахарози і 55 кг кукурудзяного екстракту. За допомогою мірника додають 840 л водопровідної води, вмикають перемішувальний пристрій (50 об/хв) до розчинення компонентів, і стерилізують в при температурі 112 °С, 0,05 МПА, протягом 30 хв.

ДР 4.5.2 Приготування і стерилізація композиції Б.

Через ваговий дозатор (Д-28) у посівний апарат (ПА-33) об'ємом 6300 л подають KH_2PO_4 – 5,5 кг, NaNO_3 – 14,6 кг, KCl – 3 кг, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 3 кг, FeSO_4 – 0,05 кг. За допомогою мірника додають 1980 л водопровідної води, вмикають перемішувальний пристрій (50 об/хв) до розчинення компонентів. Отриманий розчин підкислюють до рН 4 - 4.5 розчином соляної кислоти від ДР 3.1.1 (для унеможливлення утворення осадів). Середовище стерилізують при 131°C, 0,15 МПа, 50 хв. г

ДР 4.6. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у ферментері об'ємом 63 м³.

Для культивування у ферментері необхідно приготувати 36400 л поживного середовища.

Для засіву ферментера використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 3640 л (10% від загального об'єму середовища) та кількість конденсату, утвореного під час стерилізації поживного середовища в ферментаторі (10%).

Отже, загальну кількість води, яку необхідно додати для приготування поживного середовища становить 33 м³. Вміст компонентів наведений в табл. 6.6.

Таблиця 6.6

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 36400 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 36400 л середовища, кг (м ³)	Композиція	Об'єм композиції, м ³

Сахароза	30,0	1100	А	30
Кукурудзяний екстракт	15,0	550		
KH ₂ PO ₄	1,5	55		
NaNO ₃	4,0	146		
KCl	0,8	30		
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,8	30		
FeSO ₄	0,015	0,5		
Вода		28,3		

ДР 4.6.1 Приготування композиції А.

Через ваговий дозатор(Д-34) в збірник(Р-35) об'ємом 63 м³ л подають 1100 кг сахарози, 550 кг кукурудзяного екстракту, KH₂PO₄ – 55 кг, NaNO₃ – 146 кг, KCl – 30 кг, MgSO₄ * 7 H₂O – 30 кг, FeSO₄ – 0,5 кг. За допомогою мірника додають 28,3 м³ водопровідної води, вмикають перемішувальний пристрій (50 об/хв) до розчинення компонентів.

ДР 4.6.2. Стерилізація композиції А в УБС

Отриману суспензію (від ДР 4.6.1) подають кулачковим насосом (Н-36) в УБС (УБС-37), де відбувається стерилізація гострою парою за температури 130 °С упродовж 5-7 хвилин.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу.

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури.

Штам *A. pullulans* 82 Л зберігають на сусло-агарі під вазеліновим маслом при температурі (4-8)°С або на регламентованому поживному середовищі (Сахароза – 30,0 г/л, Екстракт кукурудзяний – 15,0 г/л, NaNO₃ – 4,0 г/л, KH₂PO₄ – 1,5 г/л, KCl – 0,8 г/л, MgSO₄ * 7 H₂O – 0,8 г/л, FeSO₄ –

0,015 г/л) при температурі (4-8)°С протягом 1 року, пересіви роблять раз в рік. [9]

ТП 5.2. Вирощування інокуляту на агаризованих середовищах.

A.pullulans 82 Л вирощують на середовищі, яке містить джерело вуглецю, азоту та мікроелементи (сахароза, натрій азотнокислий, калій фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчаноокислий, калій хлористий, залізо сірчаноокисле). В якості вихідного матеріалу використовують 4-7 добову культуру, що виросла на повноцінному середовищі з вищевказаними компонентами при температурі (26±1)°С. [9]

ТП 5.3. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 500 мл в асептичних умовах вносять 120 мл розчину композиції А (від ДР 4.1.1), 120 мл розчину композиції Б (від ДР 4.1.2) та 120 мл розчину композиції В (від ДР 4.1.3), перемішують та охолоджують.

Потім середовище розливають по 180 мл у стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл. У пробірку з робочою культурою *A.pullulans* 82 Л вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і переносять у колбу. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Після вирощування культури у колбах на качалці (220-240 об/хв) протягом 48 год, посівний матеріал асептично вносять в посівний апарат об'ємом 6,3 л зі стерильним поживним середовищем для вирощування посівного матеріалу.

ТП 5.4. Вирощування культури в посівних апаратах

ТП 5.4.1 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 6,3 л.

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у посівному апараті(ПА-12)об'ємом 6,3 л, що містить простерилізовану композицію Б об'ємом 2 л (від ДР 4.2.2), додають 1 л розчину композиції А (від ДР 4.2.1), перемішують.

Кисле середовище доводять до рН 7,0 стерильним розчином лугу (від ДР.3.2.1) за показами датчика рН. Далі вносять посівний матеріал (від ТП 5.3). Для цього в асептичних умовах інокулянт з засівної колби переносять у інокулятор, включають перемішуючий пристрій, вмикають аерацію, в сорочку інокулятора подають пару та холодну воду.

Тривалість культивування становить 48 годин при температурі 26°C та постійному перемішуванні (200 об/хв).

ТП 5.4.2 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 63 л.

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у посівному апараті (ПА-17) об'ємом 63 л, що містить простерилізовану композицію Б об'ємом 20 л (від ДР 4.3.2), додають 10 л розчину композиції А (від ДР 4.3.1), перемішують.

Кисле середовище доводять до рН 7,0 стерильним розчином лугу (від ДР.3.2.2) за показами датчика рН. Далі вносять посівний матеріал (від ТП 5.4.1). Для цього в асептичних умовах інокулянт через трубу перекачування подають в інокулятор, включають перемішуючий пристрій, вмикають аерацію, в сорочку інокулятора подають пару та холодну воду. Тривалість культивування становить 48 годин при температурі 22°C та постійному перемішуванні (200 об/хв).

ТП 5.4.3 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 0,63 м³.

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у посівному апараті (ПА-23) об'ємом 630 л, що містить простерилізовану композицію Б об'ємом 200 л (від ДР 4.4.2), додають 100 л розчину композиції А (від ДР 4.4.1), перемішують.

Кисле середовище доводять до рН 7,0 стерильним розчином лугу (від ДР.3.2.3) за показами датчика рН. Далі вносять посівний матеріал (від ТП 5.4.2). Для цього в асептичних умовах інокулянт через трубу перекачування подають в інокулятор, включають перемішуючий пристрій, вмикають аерацію, в сорочку інокулятора подають пару та холодну воду. Тривалість культивування становить 48 годин при температурі 22°C та постійному перемішуванні (200об/хв).

ТП 5.4.4 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 6,3 м³.

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у посівному апараті(ПА-33) об'ємом 6300 л, що містить простерилізовану композицію Б об'ємом 2000 л (від ДР 4.5.2), додають 1000 л розчину композиції А (від ДР 4.5.1), перемішують.

Кисле середовище доводять до рН 7,0 стерильним розчином лугу (від ДР.3.2.4) за показами датчика рН. Далі вносять посівний матеріал (від ТП 5.4.3). Для цього в асептичних умовах інокулянт через трубу перекачування подають в інокулятор, включають перемішуючий пристрій, вмикають аерацію, в сорочку інокулятора подають пару та холодну воду. Тривалість культивування становить 48 годин при температурі 22°C та постійному перемішуванні (200 об/хв).

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 63 м³

Виробниче культивування здійснюють у ферментері(ФР-39) об'ємом 63 м³, що містить простерилізовану композицію А (від ДР 4.6.2). Через трубу перекачують з посівного апарату інокулят (від ТП. 5.4.4). Вмикають перемішування та аерацію, в сорочку ферментера подають пару та холодну воду.

Параметри культивування: температура 22°C, постійне перемішування (200-250 об/хв), аерація 0,4-1,0 м³ повітря на 1,0 м³ середовища. Тривалість культивування становить 68 год.

У процесі культивування проводиться відбирання проби для мікробіологічного контролю з періодичністю в 8 год.

Процес культивування закінчують тоді, коли вміст полісахариду становить 15,3 г/л, а відносна в'язкість – 3,2 ум. од., що є підтвердженням якісного продукту.

РОЗДІЛ 7

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Упродовж культивування періодично (кожні 8 год) з посівних апаратів та ферментера відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю (визначення загальної кількості клітин і кількості живих клітин; контроль рН культуральної рідини, а також визначення концентрації вуглецю та азоту).

7.1. Мікробіологічний контроль

Культивування *A. pullulans* 82 Л проводиться в асептичних умовах, тому мікробіологічний контроль потрібно проводити на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності контамінації.

Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища.

Відбирають пробу простерилізованого поживного середовища об'ємом 150 мл і здійснюють прямий висів на агаризовані середовища. Контроль здійснюють шляхом розсівання проби на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем і подальшим інкубуванням.

У попередньо простерилізовані в сухожаровій шафі чашки Петрі розливають по 20-30 мл розплавлені на киплячій водній бані агаризовані середовища: СА (сусло-агар) і МПА (м'ясо-пептонний агар). Чашки залишають для застигання агару і витримують протягом 2-3 діб при температурі 30 °С кришками донизу.

Посіви здійснюють шляхом відбору 0,1 мл з об'єма проби стерильною піпеткою і нанесення її на поверхню СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами поміщають у

НУХТ БТЕК 04.02.28 КР ПЗ

Змн	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Лім.	Арк.	Аркушів
Розробив		Євграшин А.С.				61	77
Керівник		Тетеріна С.М.					61
Рецензент							
Н.контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

РОЗДІЛ 7
КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Кафедра БТМ

термостат за температури 30-32°C. Аналіз посівів здійснюють, починаючи з 6-8 год. На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів. [22]

Мікробіологічний контроль здійснюється двома шляхами:

- 1) Прямий висів на агаризовані поживні середовища
- 2) 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 [22].

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі. Для мікроскопіювання використовують препарати «роздавлена крапля». Препарат готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять невелику краплину культуральної рідини і накривають покривним скельцем. Гриби роду *A.pullulans* відносять до дріжджоподібних організмів, для яких характерне існування в двох різних життєвих формах. Залежно від умов навколишнього середовища вони розвиваються або в формі міцелію, що складається з довгих розгалужених септованих або несептованих ниток, або в формі дріжджових клітин, овальної або сферичної форми, розмноження яких здійснюється за допомогою брунькування. Гриб, в залежності від умов навколишнього середовища, може існувати в міцеліальній або дріжджовій формі. У природних місцях проживання він найчастіше зустрічається у вигляді міцелію. Розвиток *A.pullulans* в тій чи іншій морфологічній формі регулюється різними факторами, такими як поживні речовини, температура, рН та концентрація кисню.

Карта постадійного контролю біосинтезу аубазидану

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт 1.3.1 Миття обладнання	Мийний розчин, обладнання, чистота	Годинник	Під час проведення операції	T = 60 – 90 хв
Кт 1.3.4 Перевірка на герметичність	Герметичність обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Під час проведення операції	P = 0,1 – 0,2 МПа T = 60 хв
Кт 1.3.5 Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації,	Манометр технічний, термометр технічний	Під час проведення операції	P = 0,28 – 0,3 МПа t = 130 – 135°C
Кт 1.3.6 Охолодження обладнання	Обладнання, температура	Манометр технічний, термометр технічний	Під час проведення операції	P = 0,003 – 0,005 МПа t = 30 – 40°C
Кт 2.2 Грубе очищення	Повітря на виході з	Манометр, перевірка ступеня	Після очистки повітря у фільтрі	E = 90 % тиск згідно

повітря	фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	очищення згідно паспорту фільтра	грубого очищення	паспорту
Кт 2.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	$P = 0,4 \text{ МПа}$ $t = 120 - 150^\circ\text{C}$
Кт 2.4 Охолодження повітря	Охоложене повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	$t = 25 - 30^\circ\text{C}$
Кт 2.5 Видалення зайвої вологи	Повітря після видалення зайвої вологи	Психрометрични й метод	Після видалення зайвої вологи	$W = 60 \%$
Кт 2.6 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 35^\circ\text{C}$
Кт 2.7 Головне тонке очищення повітря	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в фільтрі тонкого очищення	$E = 98 \%$
Кт 2.8 Очищення повітря на	Очищене повітря, ступінь	Перевірка ступеня очищення згідно	Під час очистки повітря на індивідуальному	$E = 99,999 \%$

індивідуальному фільтрі	очищення	паспорту фільтра	фільтрі	
Кт, Кх 3.1.1 Приготування титрувального агенту 6% HCl	Концентрація розчину HCl, перемішування	Тахометр, Хімічний метод	Під час та після приготування розчину	c = 6%
Кт, Кх 3.2.1 Приготування титрувального агенту 6% NaOH	Концентрація розчину NaOH, перемішування, температура, час, тиск	Манометр, тахометр, манометр технічний, термометр технічний, годинник	Під час та після приготування розчину	c = 6% T = 131 °C P = 0,15 МПа t = 40 хв
Кт, Кх 3.2.2 Приготування титрувального агенту 6% NaOH	Концентрація розчину NaOH, перемішування, температура, час, тиск	Манометр, тахометр, манометр технічний, термометр технічний, годинник	Під час та після приготування розчину	c = 6% T = 131 °C P = 0,15 МПа t = 40 хв
Кт, Кх 3.2.3 Приготування титрувального агенту 6% NaOH	Концентрація розчину NaOH, перемішування, температура, час, тиск	Манометр, тахометр, манометр технічний, термометр технічний, годинник	Під час та після приготування розчину	c = 6% T = 131 °C P = 0,15 МПа t = 40 хв

Кт, Кх 3.2.4 Приготування титрувального агенту 6% NaOH	Концентрація розчину NaOH , перемішування , температура, час, тиск	Манометр, тахометр, манометр технічний, термометр технічний, годинник	Під час та після приготування розчину	c = 6% T = 131 °C P = 0,15 МПа t = 40 хв
Кт, Км 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа t = 30 хв T = 112 °C відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 50 хв T = 131 °C відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після	P = 0,15 МПа t = 50 хв T = 131 °C відсутність мікробіоти

			стерилізації	
Кт, Км 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	Р = 0,05 МПа t = 30 хв Т = 112 °С відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, рН, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН- метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	Р = 0,15 МПа t = 30 хв Т = 112 °С рН = 4-4,5 відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	Р = 0,05 МПа t = 30 хв Т = 112 °С відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, рН, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН- метр, мікробіологічний	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни	Р = 0,15 МПа t = 30 хв Т = 112 °С рН = 4-4,5 відсутність

		контроль	й контроль після стерилізації	мікробіоти
Кт, Км 4.4.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа t = 30 хв T = 112 °C відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, рН, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 30 хв T = 112 °C рН = 4-4,5 відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.5.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа t = 30 хв T = 112 °C відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.5.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, рН, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр,	Тиск визначається безперервно під час стерилізації,	P = 0,15 МПа t = 30 хв T = 112 °C рН = 4-4,5

		мікробіологічний контроль	мікробіологічний контроль після стерилізації	відсутність мікробіоти
Кт, 4.6.1 Приготування композиції А	Композиція А, швидкість перемішування	Тахометр	Під час стерилізації	w = 50 об/хв
Кт, 4.6.2 Стерилізація композиції А в УБС	Композиція А, температура, час	Термометр технічний, годинник	Під час стерилізації	T = 130 °C t = 5-7 хв
Кт, Км 5.1 Підтримання колекційної культури	Інокулят, температура, час	Термометр технічний, годинник	Під час процесу	T = 4-8 °C t = 1 рік відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.2 Вирощування інокуляту на агаризованих середовищах	Інокулят, температура, час	Термометр технічний, годинник	Під час процесу	T = 25-27 °C t = 48 год відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.3 Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	T = 22 °C t = 48 год w = 220 – 240 об/хв

	мікробіологічна чистота культури			
Кт, Км 5.4.1 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 6,3 л	Посівний матеріал, рН, швидкість перемішування, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	T = 22 °C t = 48 год w = 220 – 240 об/хв рН = 7
Кт, Км 5.4.2 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 63 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	T = 22 °C t = 48 год w = 220 – 240 об/хв рН = 7
Кт, Км 5.4.3 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 0,63 м ³	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	T = 22 °C t = 48 год w = 220 – 240 об/хв рН = 7

	а чистота культури			
Кт, Км 5.4.4 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 6,3 м ³	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	T = 22 °C t = 48 год w = 220 – 240 об/хв рН = 7
Кт, Км, Кх 6.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 63 м ³	Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація аубазидану, відосна в'язкість,	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр, віскозиметр, гравіметричний метод	Під час вирощування культури у ферментері і в кінці процесу	T = 22 °C t = 68 год w = 200 об/хв рН = 7 аерація = 0,4 – 1,0 м ³ вміст полісахариду = 15,3 г/л відосна в'язкість = 3,2 ум.од. відсутність мікробіоти

7.2. Показники росту

7.2.1. Концентрація аубазидану

Вихід полісахариду визначають ваговим (гравіметричним) методом в г/л. В'язкість культуральної рідини визначають віскозиметром капілярного типу (ВПЖ-2). [9]

Гравіметричним (ваговим) аналізом називають метод кількісного хімічного аналізу, який базується на точному вимірюванні маси визначуваної речовини або її складових частин, виділених в хімічно чистому стані або у вигляді сполук відомого постійного складу. Гравіметричні методи аналізу засновані на законах збереження маси і сталості складу речовин. Вони характеризуються високою точністю (до 0,01-0,005%) і гарною відтворюваністю. Основна операція гравіметричного аналізу – зважування на аналітичних терезах (вагах). [23]

Процедура осадження гравіметричним методом включає в себе такі дії:

1. 10 мл культуральної рідини поміщають в 50 мл пробірку та додають 96% етанолу до відмітки 50 мл. Перемішують та охолоджують до 4°C протягом 1 год.
2. Пробірки центрифугуєм при 7500 об/хв та 21°C. Осад двічі промиваєм 50 мл 80% етанолу і знову центрифугуєм.
3. Осад поміщаєм в пластикові пробірки об'ємом 15 мл і сушим у вакуумі (поступово до 0 мбар) до постійної маси при 40°C.
4. Осад зважують на технічних вагах.

Для визначення концентрації цільового продукту гравіметричним методом нам знадобиться два прилади: центрифуга та ваги. [24]



Рис. 7.1. Центрифуга ОПН-8

Центрифуга лабораторна ОПН-8 переносна лабораторна медична центрифуга періодичної дії, з частотою обертання до 8000 об/хв. Призначена для поділу на фракції неоднорідних рідких систем щільністю до 2 г/см^3 під впливом відцентрових сил. Призначена для застосування в практиці клінічної лабораторної діагностики та проведення досліджень в медицині, біології, хімії та інших галузях.

Центрифуга забезпечує встановлення швидкості обертання ротора ступінчасто в діапазоні від 1000 до 8000 об/хв, через кожні 1000 об/хв. Завдяки механізму відліку часу забезпечується регулювання часу роботи в діапазоні від 0 до 60 хвилин з інтервалами кратними 5 хвилинам. Час розгону ротора до максимальної робочої частоти обертання не більше 8 хвилин. [25]



Рис. 7.2. Ваги лабораторні Дніпровес ФЕН-200b

Настольні високоточні ваги 3 класу точності, добре підходять для використання у лабораторіях [26].

Принцип дії капілярних віскозиметрів заснований на безперервному зсуві в капілярі рідини, яка постійно надходить, і постійному виносі теплоти з матеріалом, який витікає з капіляру. Вимірювання в'язкості за допомогою віскозиметра ВПЖ засноване на визначенні часу закінчення через капіляр певного об'єму рідини з вимірювального резервуара. [27]

7.2.2. В'язкість культуральної рідини

В'язкість культуральної рідини визначають віскозиметром капілярного типу (ВПЖ-2). [9]



Рис. 7.3. Капілярний віскозиметр ВПЖ-2

Для визначення часу закінчення рідини на трубку надягають гумову трубку. Далі, пальцем затиснувши коліно і перевернувши прилад, коліно опускають в резервуар з рідиною. Рідина засмоктується до рівня позначки М2, потрібно стежити щоб рідини не було бульбашок повітря.

У момент досягнення рівня рідини позначки М2, віскозиметр виймають з посудини і повертають в початкове положення. Знімають з коліна зайву рідину. Потім надягають на коліно гумову трубку.

Віскозиметр встановлюють у термостат таким чином, щоб резервуар знаходився нижче рідини в термостаті. Витримують в термостаті близько 15 хвилин, після чого при заданій температурі, в коліно засмоктують рідину до однієї третини висоти резервуара. Встановлюють час зниження меніска рідини від позначки М1 до позначки М2.

В'язкість обчислюють за формулою, за середнім (з декількох вимірювань) часом витікання рідини.

7.2.3. Концентрація джерел Карбону і Нітрогену

Визначення концентрації сахарози за допомогою високоефективної рідинної хроматографії.

У пробірки Еппендорфа потрібно розлити по 2 мл культуральної рідини. Далі потрібно відцентрифугувати за такими параметрами - 7500 об/хв, 4 °С, протягом 15 хв. Отриманий супернатант використовуємо для визначення концентрації сахарози.

Аналіз цукру в супернатанті проводиться за допомогою системи ВЕРХ Tosoh (Токіо), що включає насос Model DP-8020 та диференціальний заломлюючий детектор Model RI-8020. Використовується аналітична колонка ВЕРХ TSK-GEL AMIDE-80 (Tosoh) (4,6 3250 мм) із захисною колоною (TSKgurdgel Amide-80, Tosoh, Токіо). Рухливою фазою виступає 80% розчин ацетонітрилу. Швидкість потоку становить 1,0 мл / хв, а температура колонки підтримується на рівні 39°С за допомогою колонкової печі (СО-8020, Тосох, Токіо). [28]

Визначення концентрації нітрату натрію

Для визначення концентрації нітрату натрію, потрібно використати реакцію Грісса. Спочатку нітрати потрібно відновити до нітритів,

В 1 лунку мікротитратора потрібно додати зразок культуральної рідини, у 2 лунку – культуральну рідину, НЕРЕС та форміат у співвідношенні 0,05/1/1. Потім зразки потрібно інкубувати при температурі 22°С протягом 1 години. Після цього потрібно відцентрифугувати при таких умовах: 1000G, 10 хв, 4°С. 50 мл супернатанту потрібно перенести у інший мікропланшет та додати до нього 100мкл суміш 1% сульфаніламід у 30% оцтовій кислоті та 0,1% нафтилетилендіамід дигідрохлорид у 60% оцтовій кислоті в співвідношенні 1/1. За допомогою мікропланшетного рідера (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA) потрібно двічі виміряти

оптичну густину при довжині хвилі 540 нм від 5 до 30 хв. Обчислюють загальний вміст нітратів плюс нітриту за стандартною кривою. Після першого вимірювання потрібно додати нітратредуктазу, вимірювання повторити. Для визначення кількості нітрату, від результату першого вимірювання віднімається результат другого.[29]

Визначення концентрації амінного азоту проводять мідним способом. Суть даного методу полягає у тому, що до визначеної кількості досліджуваного розчину, приливають при слаболужній реакції надлишок суспензії фосфорнокислої міді у боратному буфері, в результаті чого після збовтування у розчин переходять мідні солі більшості амінокислот.

10 мл фільтрату культуральної рідини наливають у мірну колбу на 25 мл і додають одну – дві краплини тимолфталейну і по краплях 1 Н розчин гідроксиду натрію до блідо-синього забарвлення. Після цього у колбу додають 10 – 15 мл суспензії ортофосфату міді у боратному буфері, потім доводять вміст колби до мітки дистильованою водою. Добре збовтують і фільтрують через складчастий фільтр з малопористого фільтрувального паперу або центрифугують. Фільтрат повинен бути зовсім прозорий, бо за наявності частинок осаду завищується кінцевий результат. 5 – 10 мл фільтрату відбирають у конічну колбу або у фарфорову чашку, додають 0,25 – 0,5 мл 80% оцтової кислоти, 0,2 – 0,4 г калій йодиду. Йод, що виділився, відтитровують 0,01 Н розчином тіосульфату натрію, додаючи в кінці титрування 1 – 4 краплини крохмалю до зникнення синього забарвлення.

Паралельно проводять контрольний дослід, де замість досліджуваного досліджу беруть дистильовану воду.

Результат обчислюють за формулою:

$$X = \frac{(a-b) \cdot 0,28}{n},$$

де X – вміст амінного азоту, мг/л; a – кількість 0,01 Н розчину тіосульфату натрію, витрачена на титрування дослідного зразка, мл; b – кількість 0,01 Н розчину тіосульфату натрію, витрачена на титрування

контролю, мл; n – кількість досліджуваного розчину, яку взято на аналіз, мл.

[30]

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пирог Т. П., Кузьмінська Ю. В. Вплив умов культивування мікроорганізмів – продуцентів екзополісахаридів на їхній синтез та фізико-хімічні властивості. *Біополімери і клітина*. 2003, 19
2. Ptitchkina N.M., Novokreschonova L.V., Ishin A.G. Rheological properties of aqueous solutions of aubasidan. Research and Technological Institute of Agricultural Biotechnology Saratov, Russia.
3. Vatutin M.T., Zinkovych M.I. Contrast-induced nephropathy. *Buk. Med. Herald*. 2015, 19, № 2(74): 220-225
4. Prasongsuk S., Lotrakul P., Ali I., Bankeeree W. The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 2017
5. Семикоз О.М. Розробка технології м'ясних продуктів з аубазиданом : Автореф. Дис. ... канд. техн. Наук – Одеса : ОДАХТ, 1997. – 16 с.
6. Соколенко Д. В., Кузнецов С. И., Канаев П. А., Буркова Н. В. О перспективах использования аубазидана – гликана *aureobasidium pullulans*. *Успехи медицинской микологии*, СПб МАПО Санкт-Петербург 2004 – 186 с.
7. Патент України на винахід №1559718. Штамм гриба *aureobasidium pullulans* продуцент екзополісахарида / Байко, Елинов, Зен, Юрлова. Опубл. 08.01.1989
8. Патент України на винахід №10607. Спосіб одержання аубазидану / Задніпряна З.А., Коваль К.О., Олійнічук С.Т., Шевченко В.І. Опубл. 16.10.2000
9. Патент України на винахід №32055. Спосіб одержання біополімеру – гомополісахариду / Болоховський В.В., Болоховська В.А., Нагорна О.В. Опубл. 12.05.2008
10. Игнатова Л.В., Савицкая И.С., Кистаубаева А.С. Видовые особенности диморфных грибов *aureobasidium pullulans* – продуцентов экзополісахарида. Биологический вид в структурно-функциональной иерархии биосферы. Белгород, 08–12 октября 2018

11. Беломесяцева Д. Б., Шабашова Т. Г.: Флора Беларуси. Грибы. Т. 2. Анаморфные грибы. Кн. 1. Темноокрашенные гифомицеты. Минск, 2015. 49 с.
12. Пирог Т.П., Скроцька О.І.; «Загальна мікробіологія конспект лекцій». Київ НУХТ 2018. 106 с.
13. Як розвивається ринок напівфабрикатів в Україні [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://biz.nv.ua/ukr/experts/napivfabrikati-v-ukrajini-chi-ye-maybutnye-u-cogo-rinku-ostanni-novini-50101566.html>
14. Ринок заморожених м'ясних і рибних напівфабрикатів України [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pro-consulting.ua/ua/pressroom/rynok-zamorozhennyh-myasnyh-i-rybnyh-polufabrikatov-ukrainy-obzor>
15. Аналіз ринку заморожених напівфабрикатів України. 2018 рік [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pro-consulting.ua/ua/issledovanie-rynka/obzor-rynka-zamorozhennyh-polufabrikatov-ukrainy-2018-god>
16. Статистичний збірник "Розподіл постійного населення України за статтю та віком" на 1 січня 2018 року [Електронний ресурс] Режим доступу: http://database.ukrcensus.gov.ua/PXWEB2007/ukr/publ_new1/2018/publ2018.asp
17. Як розвивається ринок напівфабрикатів в Україні [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://biz.nv.ua/ukr/experts/napivfabrikati-v-ukrajini-chi-ye-maybutnye-u-cogo-rinku-ostanni-novini-50101566.html>
18. Пастушенко А.С., Храмов Н.С., Норинський О.І. Процеси і апарати біотехнологічного виробництва. Метод. реком. Миколаїв, 2016. 49 ст.
19. Касаткин А.Г. Основные процессы и аппараты химической технологии. Издание седьмое. Государственное научно-технологическое издательство химической литературы. Москва, 1961. 832 ст.

20. Калунянц К.А, Голгер Л.И., Балашов В.Е. Оборудование микробиологических производств. Агропромиздат, 1987. 397 ст.
21. Bodzek M. Membrane Techniques in Air Cleaning//Journal of Environmental Studies. — 2000. — Vol. 9, №. 1. — P. 1–12.
22. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: конспект лекцій. НУХТ, 2019. 252 ст.
23. Гравіметричний метод аналізу [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://udhtu.edu.ua/wp-content/uploads/2018/03/GRAVIMETRICHNIY-METOD-ANALIZU.pdf>
24. Stojilkovski, K., Uranič, N., Kolar, D., & Kreft, S. Simple method for the determination of polysaccharides in herbal syrup. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 2019. doi:10.1080/07328303.2019.1567754
25. Центрифуга ОПН-8 переносна лабораторна [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p515711938-tsentrifuga-opn-perenosnaya.html?&primelead=OA>
26. Ваги лабораторні Днепровес ФЕН-200b [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://unipro.lviv.ua/lv/vagy-laboratorni-dneproves-fen-200a--npv--200-g--d-0-001-g--platforma--90-mm--zovnishnya-kalibrovka/>
27. А. К. Бурдо, Н.А. Дзюба, О.В. Землякова. Теоретичні основи харчових технологій. Одеса ОНАХТ, 2016. 48 ст.
28. А. Hashimoto and Т. Kameoka Mid-Infrared Spectroscopic Determination of Sugar Contents in Plant-Cell Culture Media Using an ATR Method. doi:10.1366/0003702001950490
29. Granger D. L., Taintor R. R., Boockvar K. S., Hibbs J. B. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. Nitric Oxide Part A: Sources and Detection of NO. 1996. doi:10.1016/s0076-6879(96)68016-1

30. Определение аминного азота медным способом. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://studopedia.ru/16_60881_opredelenie-aminnogo-azota-mednim-sposobom.html