

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

«__» _____ 20__ р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

«__» _____ 20__ р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна

на тему: Одержання глюконової кислоти культивуванням *Aspergillus niger*

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

ТИМЧЕНКО Анастасія Романівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник КОВШАР Ірина Дмитрівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент ПЕТРЕНКО Наталія
(ім'я та прізвище) (підпис)

Я як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2025 р.

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 СТАБНІКОВ

“ 06 ” листопада 20 24 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ТИМЧЕНКО Анастасія Романівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання глюконової кислоти культивуванням
Aspergillus niger

керівник роботи КОВШАР Ірина Дмитрівна.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 5 листопада 2024 року № 932к

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Aspergillus niger* , цільовий про-
дукт: глюконова кислота, об'єм ферментера 10 м³, коефіцієнт заповнення
0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗ-
ДІЛ 1. Характеристика глюконової кислоти. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору
та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґру-
нтування глюконової кислоти. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗ-
ДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва глюконової
кислоти. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання виробництва глюконової кис-
лоти. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми виробництва глюконової кислоти.
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва глюконової кислоти. РОЗДІЛ 9. Охорона до-
вкілля

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва глюконової кислоти – 1 аркуш формату А1,
1 аркуш формату А2. Апаратурна схема виробництв глюконової кислоти – 2
аркуші формату А1, 1 аркуш формату А2.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання ви- дав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 05 листопада 2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика глюконової кислоти	05.11.2024- 20.11.2024	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	06.11.2024- 20.11.2024	
3	Техніко-економічне обґрунтування глюконової кислоти	06.11.2024- 20.11.2024	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва глюконової кислоти	06.11.2024- 20.11.2024	
5	Специфікація обладнання виробни глюконової кислоти	20.11.2024- 30.11.2024	
6	Опис технологічної схеми біосинтезу глюконової кислоти	20.11.2024- 30.11.2024	
7	Контроль виробництва глюконової кислоти	20.11.2024- 30.11.2024	
8	Охорона довкілля	20.11.2024- 30.11.2024	
9	Оформлення пояснювальної записки	30.11.2024- 07.12.2024	
10	Виконання графічної частини проекту	30.11.2024- 07.12.2024	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Анастасія ТИМЧЕНКО _____
(ім'я та прізвище)

Ірина КОВШАР _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічної та апаратурної схем біосинтезу глюконової кислоти штамом *Aspergillus niger* СИМ М276, який синтезує 76,67 г/л глюконової кислоти. Глюконова кислота буде витрачена на виробництво лікарського засобу на основі глюканату кальцію, з метою профілактики і лікування рахіту у дітей.

Розрахована потужність біотехнологічного виробництва складає 275 602 л глюконової кислоти на рік. Технологічна схема біосинтезу глюконової кислоти включає допоміжні роботи (підготовка стерильного аераційного повітря, підготовку титрувального розчину NaOH, підготовка 2,5 % розчину сульфатної кислоти, приготування цитратного буферу, приготування розчину гідролізату целюлози, приготування і стерилізація розчину кальцію карбонату, приготування та стерилізацію поживних середовищ), а також безпосередньо технологічний процес (чотири стадії вирощування посівного матеріалу (у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 15 л, 160 л і 1250 л) та біосинтез у ферментері об'ємом 10,0 м³ із коефіцієнтом заповнення 0,6).

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, п'яти розділів, списку використаної літератури (58 найменування), технологічної (формат А1) 2 аркуші та А2 та апаратурної 3 аркуші (формат А1 та А2), 1 аркушем. Загальний обсяг роботи – 93 сторінки, 20 таблиць і 12 рисунків.

Ключові слова: глюконова кислота, глюканат кальцію *Aspergillus niger* СИМ М276 біосинтез, рахіт, лікарські засоби, технологічна схема, апаратурна схема.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological and apparatus schemes for the biosynthesis of gluconic acid by the *Aspergillus niger* SIIM M276 strain, which synthesizes 76.67 g/L of gluconic acid. The produced gluconic acid will be used for the production of a pharmaceutical preparation based on calcium gluconate, aimed at preventing and treating rickets in children.

The calculated capacity of the biotechnological production is 275,602 L of gluconic acid per year. The technological scheme of gluconic acid biosynthesis includes auxiliary operations (preparation of sterile aeration air, preparation of NaOH titration solution, preparation of a 2.5% sulfuric acid solution, preparation of citrate buffer, preparation of cellulose hydrolysate solution, preparation and sterilization of calcium carbonate solution, preparation and sterilization of nutrient media), as well as the main technological process. The main process consists of four stages of seed material cultivation (in flasks on shakers, in inoculators with volumes of 15 L, 160 L, and 1250 L) and biosynthesis in a 10.0 m³ fermenter with a filling coefficient of 0.6.

The qualification work consists of an introduction, five chapters, a list of references (58 sources), technological documentation (two sheets in A1 format and one in A2 format), and apparatus documentation (three sheets in A1 and A2 formats), as well as one schematic diagram. The total volume of the work is 93 pages, including 20 tables and 12 figures.

Keywords: gluconic acid, calcium gluconate, *Aspergillus niger* **SIIM M276**, biosynthesis, rickets, pharmaceuticals, technological scheme, apparatus scheme.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ЗМІСТ	6
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛЮКОНОВОЇ КИСЛОТИ	9
1.1 Хімічні властивості	9
1.2 Практичне застосування	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛЮКОНОВОЇ КИСЛОТИ.....	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	11
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	16
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	17
2.4 Таксономічний статус біологічного агента.....	20
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	21
3.1. Потреба у виробництві глюконової кислоти	21
3.2. Обрахунок загальної потужності виробництва кальцію глюконату	23
3.3. Розрахунок загальної кількості циклів проектованого виробництва глюконової кислоти та об'єму виробничого ферментера	24
3.4. Розрахунок кількості необхідних етапів для підготовки посівного матеріалу.....	25
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	29
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	29
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	30
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	32
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	32
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	34
5.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	36
5.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	45

5.4.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках	46
5.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах	46
5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу	48
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	50
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.	54
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	63
РОЗДІЛ 9 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	72
9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва глюконової кислоти на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів	72
9.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва глюконової кислоти	75
9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....	75
9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів	78
9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів	79
Перелік літератури:	82
ДОДАТКИ	89

ВСТУП

Глюконова кислота – органічна кислота з групи альдонових кислот, що утворюється внаслідок окиснення альдегідної групи глюкози. Глюконова кислота застосовується у фармацевтичній промисловості як наповнювач для таблеток. У харчовій промисловості зареєстрована як харчова добавка E574, як регулятор кислотності і розпушувач. Солі глюконової кислоти, такі як глюконат кальцію, глюконат цинку та глюконат заліза, також широко використовуються під час виробництва лікарських засобів (ЛЗ). Зважаючи на високу вартість виробництва глюконової кислоти хімічними методами, біотехнологічний синтез цієї органічної кислоти є економічно обґрунтованим. Серед мікроорганізмів, найбільшу кількість глюконової кислоти здатні синтезувати гриби роду *Aspergillus* [1-7].

Серед дітей перших років життя широко розповсюджений вітамін-D-дефіцитний рахіт, що пов'язаний із низькою кількістю вітаміну-D в організмі, який регулює рівень кальцію та фосфату у крові. Це призводить до порушення процесу мінералізації кісток і як наслідок до їх ранніх деформацій. Щоб попередити виникнення рахіту або у випадку розвитку захворювання лікарі призначають ЛЗ, що містять у своєму складі кальцій. Таким чином, потреба у виробництві глюконової кислоти пов'язана із виробництвом ЛЗ на основі глюконату кальцію, що отримують шляхом взаємодії глюконової кислоти із карбонатом чи гідроксидом кальцію [2-5, 7]

*Новизною курсової роботи є використання вископродуктивного штаму *Aspergillus niger* SHM M276, що здатен синтезувати до 76,67 г/л глюконової кислоти, під час росту на поживному середовищі, що складається із гідролізату кукурудзяних качанів, що залишаються як відходи сільського господарства [7].*

					НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тимченко А.Р.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушіє 8
Консульт.								
Керівник		Ковшар І.Д.						
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						
					Кафедра БТМ			

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛЮКОНОВОЇ КИСЛОТИ

1.1 Хімічні властивості

Глюконова кислота – органічна кислота з групи альдонових кислот, що утворюється внаслідок окиснення альдегідної групи глюкози. Типовими продуцентами глюконової кислоти є гриби роду *Penicillium* (*Penicillium luteum*) та *Aspergillus* (зокрема *Aspergillus niger* та *Aspergillus terreus*). Раніше використовували такі роди як: *Glilocadium*, *Scopulariopsis* і *Gonatobotrys* [2]. Крім типових продуцентів, до синтезу цієї кислоти здатний гриб *Aureobasidium pullulans* та бактерій *G. oxydans*, *Z. mobilis*, *A.methanolicus*, *P. fluorescens* і види *Morexella*, *Tetracoccus*, *Pullularia*, *Micrococcus*, *Enterobacter*. [1, 2]

Середня молекулярна маса глюконової кислоти становить 196,16 г/моль. Має таку хімічну формулу: $C_6H_{12}O_7$, та структурну:

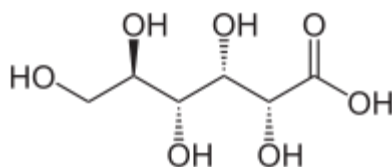


Рис.1. Структурна формула глюконової кислоти

Кипить за температури $417^{\circ}C$, а плавиться при $131^{\circ}C$, є добре розчинною. Глюконова кислота є не їдкою, не корозійною, нетоксичною органічною кислотою. Має вигляд безбарвного кристалу.

Виробництво глюконової кислоти досягається як і мікробною ферментацією, так і хімічним, електрохімічним, ферментативним каталізом. Хоч і хімічне перетворення глюкози в глюконову кислоту є доступним, але переважно використовують процеси бродіння які мають кілька труднощів. Щоб подолати їх було запропоноване новий процес каталітичного окислення, в якому глюконова кислота утворюється шляхом взаємодії глюкози з молекулярним киснем в лужних умовах у присутності каталізаторів з благородних металів, таких як Платина або Паладій [3].

					НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Тимченко А. Р.				РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛЮКОНОВОЇ КИСЛОТИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.								9
Керівник	Ковшар І.Д.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

Для хімічного каталізу окислення глюкози до глюконової кислоти важливі такі параметри як температура, розчинений кисень та рН. Каталітичне окислення глюкози здійснюється в лужних умовах при рН 8-11, що підтримується безперервним додаванням гідроксиду лужного металу, переважно при температурі 30-60°C. Окислення здійснюється кисневмісними газами при тиску 3-10 бар [2].

Ферментативне перетворення здійснюється або грибовим ферментом глюкозооксидазою, або бактеріальною глюкозодегідрогеназою. Розглядаючи ферментативне виробництво глюконової кислоти, можна сказати, що воно є не економічно доцільним для масового виробництва через нестабільність ферменту, в наслідок чого виходить висока вартість. Але його перевага в тому, що займає менше часу і в результаті отримуємо глюконову уислоту без домішків.

1.2 Практичне застосування

Глюконова кислота та її солі широко використовуються в різних галузях промисловості (харчовій, хімічній, фармацевтичній, будівельній, текстиль) та в побуті. Найпопулярнішими виробниками глюконової кислоти в світі є такі компанії як: Pfizer Inc, Bristol-Meyers Co, Premier Malt products Inc(США); Roquette Freres (Франція); Benckiser (Німеччина), Fujisawa (Японія). В промисловості застовується для агрохімікатів, будівельної хімії (добавка до цементу), для виробництва чорнил/фарб/барвників, для очистки води, у фармацевтичних препаратах, і найпопулярніше застосовується як харчова добавка в напої, хліб, м'ясні та молочні продукти, корми. Також окислення глюкози в глюконову кислоту глюкозодегідрогеназою застосовується для аналізу глюкози в сенсорах глюкози [1].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛЮКОНОВОЇ КИСЛОТИ

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

Як свідчать літературні дані [4], в останні роки попит на виробництво глюконової кислоти (ГК) та її похідних стрімко зростає, оскільки ГК та її солі (такі як глюконат кальцію, глюконат цинку та глюконат заліза) широко застосовується в харчовій, медичній, будівельній та біотехнологічній промисловості. На світовому біотехнологічному ринку промислового бродіння, об'єм синтезу органічних кислот займає третє місце, поступаючись тільки виробництву антибіотиків та амінокислот [6, 7, 8, 9]. .

Виробництво ГК це доволі простий одно етапний процес окислювального бродіння. Щоб здешевити таке традиційне бродіння, сучасні дослідження зосередженні на пошуку більш дешевих субстратів, зокрема відходів агропромислового комплексу. Проте очищення ГК від побічних продуктів культивування, а також а зниження активності ферментів біосинтезу є доволі значними перепонами на шляху ринкового виробництва із високим виходом цільового продукту. Тому роботи у напрямку скринінгу та трансформації вже відомих штамів продуцентів є дуже важливим кроком на шляху отримання високопродуктивних штамів та здешевлення промислового виробництва [4, 6, 8].

У таблиці 2.1 приведенні найбільш відомі продуценти ГК серед грибів, дріждів та бактерій. Найбільш дослідженим синтез глюконової кислоти є у грибів роду *Aspergillus* та бактерій роду *Gluconobacter*, при використанні глюкози як субстрату. Перетворення глюкози в глюконову кислоту каталізується глюкозооксидазою у грибів і глюкозодегідрогеназою у бактерії.

Сучасне виробництво глюконової кислоти шляхом промислової ферментації найчастіше базується на специфічному бродінні *Aspergillus niger*, яке було запатентоване Бломом в 1952 році, та вдосконалене Зіффером у 1971.

					НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Тимченко А.Р.			Літ.	Арк.	Акрушія 1
Консульт.							
Керівник		Ковшар І.Д.			Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. каф.		Стабніков В.П.					
					РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛЮКОНОВОЇ КИСЛОТИ		

Найбільш відомі продуценти глюконової кислоти

Гриби та дріжджі	Бактерії
<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. carneus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Penicillium variabile</i> , <i>P. puberulum</i> , <i>P. frequentans</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. glaucum</i> , <i>P. notatum</i> , <i>P. oxalicum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Acetobacter diazotrophicus</i> , <i>A. methanolicus</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> , <i>G. japonicus</i> , <i>Pseudomonas taetrolens</i> , <i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Azospirillum brasiliensis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> , <i>P. ovalis</i> , <i>P. acidovorans</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Rhodotorula rubra</i>

Наприклад, робота [1] демонструє мутантний штам *Aspergillus niger* UV-112, отриманий шляхом УФ-опромінення, має набагато вищу швидкість трансформації глюкози, ніж вихідний штам (0,66 г\г проти 0,25 г\г). *A. niger* вважається ідеальним кандидатом для бродіння завдяки високій швидкості росту, високому виходу ГК та легкому відокремленню побічних продуктів. Варто зазначити, що поживне середовище для вирощування інокуляту *A. niger* вимагає низького співвідношення карбону до нітрогену, тоді як ферментаційне середовище навпаки [5, 9]. Під час процесу бродіння у ферментаційному середовищі повинна міститися велика кількість глюкози (120-350 г/л) і джерело фосфору і азоту в низькій концентрації (20 мМ). Міцелій можна повторно використовувати до 5 разів з періодичним додаванням глюкози. Також, було доведено що додаючи в поживне середовище дріждовий екстракт (0,5%), синтез глюконової кислоти значно зростає [4].

Провівши аналіз описаних у літературі продуцентів ГК, у табл. 2.2. приведено дані щодо біосинтезу цільового продукту різними мікроорганізмами. Найвищою синтезувальною здатністю 92 г/л ГК синтезує штам *Aspergillus niger* NCIM 548 [5], в той час як *Aspergillus niger* SIIM M276 синтезує – 76,67 г/л [11] за 72 год культивування. Найменшу кількість ГК (68,9 г/л) синтезує *Gluconobacter oxydans* DSM2003 протягом 72 год культивування [10].

Наступною стадією порівняння продуцентів є розрахунок вартості поживних середовищ для культивування (табл. 2.3).

Як видно із даних, приведених у табл. 2.2, найбільш дешевим є середовище для вирощування *Aspergillus niger* SIIM M276 та *Gluconobacter oxydans* DSM2003 – 1,5 грн. Найбільш дороговартісним є середовище для культивування *Aspergillus niger* NCIM 548 – 5,7 грн.

Останнім етапом відбору найефективнішого штаму-продуценту ГК є розрахунок умовної вартості 1 г одержаного продукту (див. табл. 2.4). Згідно даних, найменша умовна вартість продукту – 0,010 грн/г становить для ГК синтезованої *Aspergillus niger* SIIM M276, а найбільш висока – 0,06 грн/г – для *Aspergillus niger* NCIM 548. Отже, підсумовуючи вище зазначену інформацію, для біосинтезу ГК як біологічний агент обираємо *Aspergillus niger* SIIM M276.

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для вирощування продуцентів глюконової К-ти

Продуцент	Складова поживного середовища	Вміст у складі ПС, г/л	Ціна складової, грн/кг	Вартість складової (грн) на 1 л ПС	Джерело інформації (1, 2, 3)*
1	2	3	4	5	6
<i>Aspergillus niger</i> SIIM M276	Кукурудзяні качани	200	7,50	1,5	<u>1</u>
	Вартість 1 л середовища – 1,5 грн				
<i>Gluconobacter oxydans</i> DSM2003	Кукурудзяні качани	200	7,50	1,5	<u>1</u>
	Вартість 1 л середовища – 1,5 грн				
<i>Aspergillus niger</i> NCIM 548	Лактоза	95	56	5,32	<u>1</u>
	Глюкоза	5,0	42,00	0,21	<u>1</u>
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5	40,0	0,02	<u>1</u>
	KH ₂ PO ₄	0,6	180,00	0,108	<u>1</u>
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,15	324,00	0,0486	<u>2</u>
Вартість 1 л середовища – 5,7 грн					

Примітка. * – Ціни наведено станом на березень 2024 р. 1 – <https://www.prom.ua/>, 2 – <https://fresh.co/ua/>, 3 – <https://agar.com.ua/>, 4 – <https://klebrig.com.ua/>, 5 – alibaba.com.

Таблиця 2.3

Особливості біосинтезу глюконової кислоти різними продуцентами

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація глюконової к-ти, г/л	Особливості біосинтезу	Література
	компонент	вміст, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Aspergillus niger</i> SIIM M276	Кукурудзяні качани	200	72	76,67	t°=33°C, n = 500 об/хв, pH = 6.0	Zhang H., Zhang J., Bao J. High titer gluconic acid fermentation by <i>Aspergillus niger</i> from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. Biore-source Technology, 2016, 203:211-219. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.12.042
<i>Gluconobacter oxydans</i> DSM2003	Кукурудзяні качани	200	72	68,9	t°=35°C, pH = 4.4	Hou W., Zhang M., Bao J. Cascade hydrolysis and fermentation of corn stover for production of high titer gluconic and xylonic acids. Bioresource Technology, 2018, 264: 395–399. doi:10.1016/j.biortech.2018.06.025.

Продовження табл. 2.3

<p><i>A. niger</i> NCIM 548</p>	<p>Лактоза Глюкоза (NH₄)₂HPO₄ KH₂PO₄ MgSO₄·7H₂O</p>	<p>95,0 5,0 0,5 0,6 0,15</p>	<p>72</p>	<p>92</p>	<p>t°=30°C, n = 200 об/хв, pH = 6.0</p>	<p>Mukhopadhyay, R., Chatterjee, S., Chatterjee, B. P., Banerjee, P. C., & Guha, A. K. Production of gluconic acid from whey by free and immobilized <i>Aspergillus niger</i>. 2005, <i>International Dairy Journal</i>, 15(3), 299–303. doi:10.1016/j.idairyj.2004.07.010</p>
-------------------------------------	--	--	-----------	-----------	---	--

Умовна вартість 1 г глюконової к-ти, синтезованого при рості на середовищах різного складу

Продуцент	Концентрація глюконової к-ти, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість одержаного глюконової к-ти за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г глюконової к-ти, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Aspergillus niger</i> SIIM M276	76,67	72	1,06	1,5	0,01
<i>Gluconobacter oxydans</i> DSM2003	68,9	72	0,96	1,5	0,02
<i>Aspergillus niger</i> NCIM 548	92	72	1,27	5,7	0,06

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування 72 год, концентрація глюконової кислоти в культуральній рідині становить 76,67 г/л. Середовище із гідролізатом кукурудзяних качанів має наступний склад: глюкоза – 80,21 г/л, ксилоза – 35,20 г/л, оцтова кислота – 2,29 г/л, гідроксиметил фурфурал – 0,49 г/л, фурфурал - 0.60 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу глюконової кислоти.. Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 76,67 г глюконової кислоти. Молекулярна маса глюконової кислоти становить 196. Отже, у 196 г глюконової кислоти ($C_6H_{12}O_7$) міститься 72 г Карбону, а в 76,67 г глюконової кислоти $(76,67 \times 72,0) / 196 = 28,16$ г Карбону.

Як джерело вуглецю для одержання глюконової кислоти використовуються глюкоза. Розрахуємо, у скількох грамах глюкози міститься 28,16 г Карбону. Молекулярна маса глюкози ($C_6H_{12}O_6$) – 180. У 180 г глюкози міститься

72 г Карбону, а 28,16 г Карбону міститься у $(28,16 \times 180) / 72 = 70,4$ г глюкози. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на глюкозі близько 40% субстрату окислюється до CO_2 для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме $(70,4 \times 0,4) + 70,4 = 98,56$ г/л.

Оскільки як джерело вуглецю для одержання глюконової кислоти використовується також ксилоза, розрахуємо у скількох грамах ксилози міститься 28,16 г Карбону. Молекулярна маса ксилози ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$) – 150. У 150 г глюкози міститься 60 г Карбону, а 28,16 г Карбону міститься у $(28,16 \times 150) / 60 = 70,4$ г ксилози. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на глюкозі близько 40% субстрату окислюється до CO_2 для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст ксилози у середовищі становитиме $(70,4 \times 0,4) + 70,4 = 98,56$ г/л.

Оскільки поживне середовище для біосинтезу представляє собою гідролізат кукурудзяних качанів, то у склад поживного середовища ніяких змін вносити не будемо.

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

A. niger має – нерухомий патогенний гриб-сапрофіт, що має гладкий або злегка гранульований конідіофор довжиною від 1,5 до 3 мм з товстою стінкою, зазвичай коричневого кольору. Має різний зовнішній вигляд: кулясті, еліптичні, гладкі, однопрофільні, Везикули кулясті, гіалінові або забарвлені в темно-коричневий колір, діаметром 75 мкм, які важко спостерігати, через скупчення чорних конідій. Тіло гриба складається з безбарвних, сильно розгалужених і переплетених між собою тонких ниток – гіфів, що утворюють міцелій. Діаметр гіфів – від 3-6 мкм. [8] Для аспергілів характерний поверхневий ріст, проте при достатній аерації і строгому дотриманні асептики вони можуть розмножуватися і в товщі твердої і в глибині рідкого середовища.

Колонії *Aspergillus niger* швидко ростуть і їх легко впізнати за характерним запиленим зовнішнім виглядом. Спочатку грибниця біла, потім вона змінює свій колір від жовтого до темного і, в кінці має колір від темно-коричневого до чорного. Зворотня сторона колонії має напівпрозорий сіро-жовтий колір, що відрізняє *A. niger* від інших грибів з темними колоніями [10, 11].

Даний гриб розмножується шляхом вироблення конідій(безстатевий шлях). Взагалі, аспергіли можуть розмножуватися і статевим шляхом за допомогою асків, що утворюються в плодових тілах. Однак розвиток плодових тіл *A. niger* припиняється на ранній стадії і недорозвинені плодові тіла перетворюються на щільні скупчення сплетених гіф (склероції). [9]

Для культивування *A.niger* використовують агар Сабуро з декстрозою, Чапека-Докса, дріжджовий екстракт та солодовий агар. Часто додають антибіотик, для обмеження росту бактеріальний мікроорганізмів.

При рості на агарі Чапека-Докса, через 24-48 годин спостерігається повітряний міцелій, що складається з перепланих гіфів молочно кольору. Через 3 години культивування спостерігається активне утворення спор коричневого кольору.

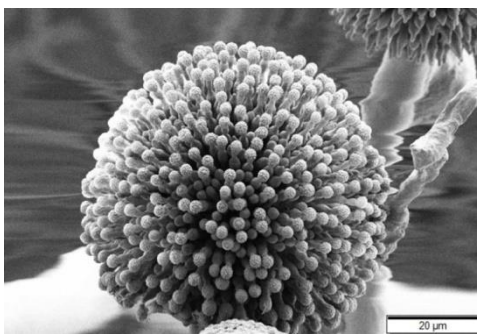


Рис 2.1 *Aspergillus niger*: форма клітини під мікроскопом, збільшення x1100

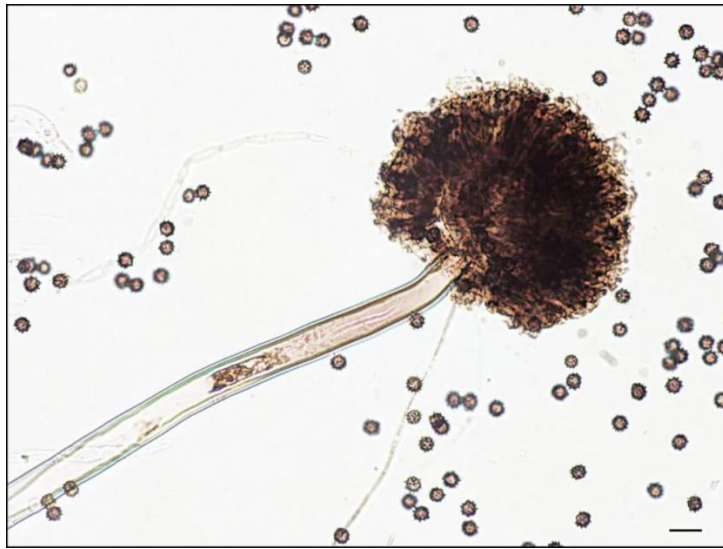


Рис 2.2. *Aspergillus niger*: вигляд під світловим мікроскопом

Aspergillus niger виробляє різноманітні ферменти - амілолітичні, протеїнази, пектиназу, ліпазу, глюкозооксидазу, ферменти, що руйнують рогову речовину, хітин та ін. За типом дихання відноситься до аеробів. [7] За типом харчування аспергіліє гетеротрофними організмами, що засвоюють вуглець з органічних сполук. Надходження в клітину розчинених у воді речовин відбувається шляхом дифузії та осмосу через всю поверхню тіла та регулюється цитоплазматичною мембраною. Таким чином, організм відбирає з навколишнього середовища необхідне харчування.

У порівнянні з автотрофами аспергілі мають клітини, що є проникними для речовин більшої молекулярної маси і мають високий осмотичний тиск (осмотрофи) [6]. *A. niger* потребує звичайних органігенів - вуглецю, азоту, кисню, водні та багатьох інших елементах.

Культура грибка росте за рН від 3.0 до 8.0. Середовище Сабуро та Чапека, 20-25С. На агарі Сабуро – білі пухнасті колонії, згодом зеленого чи жовтого кольору. На агарі Чапека – гладкі чи зірчасті колонії, зеленого чи чорного кольору[6].

2.4 Таксономічний статус біологічного агента.

Домен: *Eukaryota*

Царство: *Fungi*

Підцарство: *Dikarya*

Відділ: *Ascomycota*

Підвідділ: *Pezizomycotina*

Клас: *Eurotiomycetes*

Підклас: *Eurotiomycetidae*

Порядок: *Eurotiales*

Родина: *Aspergillaceae*

Рід: *Aspergillus*

Вид: *niger* [12]

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у виробництві глюконової кислоти

Попит на виробництво глюконової кислоти (ГК) та її солей (такі як глюконат кальцію, глюконат цинку та глюконат заліза) стрімко зростає через широке застосування в харчовій, медичній, будівельній та біотехнологічній промисловості. Розмір ринку глюконової кислоти оцінювався в 0,18 млрд доларів США в 2022 році. Прогнозується, що галузь виробництва глюконової кислоти зросте з 0,187 млрд доларів США в 2023 році до 0,24 млрд доларів США в 2032 році, демонструючи сукупний річний темп зростання (CAGR) 3,50% протягом прогнозованого періоду (2024 - 2032). Збільшення використання глюконової кислоти в харчових продуктах і напоях, а також збільшення використання кислоти в засобах особистої гігієни є ключовими ринковими факторами, що сприяють зростанню ринку. Найбільшими виробниками глюконової кислоти є: The Chemours Company, Zhonglan Industry Co. Ltd., Hefei TNJ Chemical Industry Co. Ltd, Siddharth Chlorochem Pvt. Ltd, Penta International Corporation, Connect Chemicals, Charkit Chemical Company LLC, Beijing LYS Chemicals Co. Ltd., Haihang Industry Co., Ltd. CrossChem LP [13].

Потреба у виробництві глюконової кислоти обумовлена виробництвом ЛЗ на основі глюконату кальцію, що отримують шляхом взаємодії глюконової кислоти із карбонатом чи гідроксидом кальцію. Кальцію глюконат використовують для профілактики / лікування захворювань, таких як остеопороз, остеомаліяція, рахіт, гіпаратиреоз та інші, пов'язаних із дефіцитом кальцію в організмі [14, 15, 16]. Дітям тільки внутрішньовенно, залежно від віку, розчин глюконату кальцію вводять у таких дозах: віком до 6 місяців – 0,1–1 мл, 6–12 місяців – 1–1,5 мл, 1–3 роки – 1,5–2 мл, 4–6 років – 2–2,5 мл, 7–14 років – 3–5 мл [4]. Добова потреба у кальцію представлена у *табл 1.1*.

					НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Тимченко А. Р.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУН- ТУВАННЯ				
Консульт.				Літ.				Арк.	Акруші ²¹
Керівник		Ковшар І.Д.							
Н. Контр.									
Зав. каф.		Стабніков В.П.							
					Кафедра БТМ				

На жаль рахіт був і залишається дуже розповсюдженим захворюванням в Україні. Вітамін-D-дефіцитний рахіт - захворювання раннього дитячого віку, що характеризується низьким рівнем вітаміну-D, який контролює рівень кальцію та фосфату у плазмі крові з подальшим порушенням мінералізації кісток, що призводить до їх деформацій. Рахіт звичайно розвивається на 1-му році життя дитини і батькам потрібно мати уявлення про його ранні ознаки. На рахіт хворіють діти, як правило, перших 2-х років життя. Перші симптоми захворювання з'являються в 2-4 місяці, розгорнута картина рахіту спостерігається в 4-6 місячному віці [14, 15].

Таблиця 3.1

Потреба дитячого організму у кальцію на добу [15-16].

Вікова група дітей	Добова потреба у кальцію згідно норми, мг/добу	Кількість глюконату кальцію, мл
0 – 6 місяців	200	0,1–1
6 – 12 місяців	260	1–1,5
12 міс – 3 роки	Більше 500	1,5–2
4 – 6 років		2–2,5
7 – 14 років		3–5

Згідно із даними Мінюсту та інституту молоді, станом на 2022 рік в Україні проживає 7 348 531 дітей віком від народження до 18 років [17]. Розрахунок буде вестися для вікових груп до 14 років, оскільки профілактику і лікування рахіту бажано проводити для якомога молодшого віку [14, 15]. Поширеність рахіту серед дитячого населення в Україні коливається від 50 до 70%. Для розрахунку приймемо, що в середньому кількість хворих для кожної вікової групи 50 %. Таким чином, можна розрахувати потребу у кальцію глюконаті на курс лікування (див. табл. 1.2)

3.2. Обрахунок загальної потужності виробництва кальцію глюконату

В Україні виробництво кальцію глюконату (КГ) повністю забезпечується вітчизняними виробниками у формі таблеток та розчину для ін'єкції. Згідно із державним реєстром лікарських засобів [18], зареєстровано у формі розчину для ін'єкції 4 торгові марки, в той час як у вигляді таблеток – 6 торгових марок. Оскільки для забезпечення швидкого терапевтичного ефекту, необхідно потрапляння діючої речовини у системних кровоток, КГ будемо виробляти у вигляді розчину для ін'єкції. Крім того, конкуренція у виробництві розчину знач менша, ніж при виробництві ЛЗ у вигляді таблеток.

Як видно із даних із таблиці 3.2, потреба у виробництві КГ на курс лікування становить 305 176,5 л.

Таблиця 3.2

Розрахунок об'єму кальцію глюконату (КГ) на курс лікування

Вікова група дітей	Доза КГ на добу, мл	Тривалість лікування, діб	Кількість КГ на курс лікування 1 пацієнта, мл	Кількість пацієнтів, тис. осіб	Об'єм КГ для пацієнтів, л
0 – 6 місяців	1	30	30	783,4	47004
6 – 12 місяців	1,5		45		
12 міс – 3 роки	2		60		
4 – 6 років	2,5		75		
7 – 14 років	5		150		
Загальна кількість КГ, л					305176,5

Розрахувавши необхідну кількість КГ, слід визначити, скільки потрібно отримати глюконової кислоти (ГК). Продуцентом ГК є *Aspergillus niger* СИМ М276, який синтезує 76,67 г/л ГК протягом 72 год [5]. Враховуючи, що ЛЗ КГ містить в 1 мл лікарського засобу 95,5 мг ГК, з них 8,95 мг сумарного кальцію (Ca^{2+}). Тобто в 1 мл препарату міститься 86,55 мг ГК. Оскільки нам необхідно 305 176,5 л КГ, то розрахуємо скільки необхідно для цього ГК:

1 мл КГ – 86,55 мг ГК

305 176500 мл КГ – X мг ГК,

звідки $X = 264130\,261\,000$ мг або $264130,261$ кг ГК. Також треба врахувати, що при виробництві КГ із ГК втрачається приблизно 20 % ГК під час взаємодії із $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Таким чином кількість ГК $264130,261 \times 0,8 = 211\,304,2$ кг.

Знаючи цю інформацію, можна розрахувати необхідної кількості культуральної рідини:

$$\frac{211\,304,2 \cdot 1000}{76,67} = 2\,756\,022 \text{ л}$$

Оскільки на ринку висока конкуренція у виробництві ЛЗ, пропонується виробляти ГК для задоволення 10 % від загальної потреби:

$$2\,756\,022 \text{ л} \times 0,1 = 275\,602 \text{ л}$$

3.3. Розрахунок загальної кількості циклів проектного виробництва глюконової кислоти та об'єму виробничого ферментера

Наступним кроком розрахуємо, який об'єм культуральної рідини можна отримати за цикл біосинтезу. Згідно із цими даними розрахуємо кількість необхідних етапів підготовки посівного матеріалу. Прийmemo, що кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) = 220, тоді кількість культуральної рідини на добу (V_d) становитиме:

$$V_d = C / T_{рд} = 275\,602 / 220 = 1253 \text{ л}$$

Об'єм культуральної рідини за цикл ($V_{пц}$) буде становити:

$$V_{пц} = \frac{K_1 * V_d * T_{цф}}{24} = \frac{1,41 * 1253 * 80}{24} = 5889 \text{ л/цикл}$$

де $T_{цф}$ – загальний цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (72 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій $K_1 = 1,1 - 1,5$.

Розрахований об'єм культуральної рідини (5889 л) можна одержати у ферментері, геометричний об'єм якого складатиме:

$$V_{\Gamma} = \frac{V_{\text{пц}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{5889}{0,6} = 9815 \text{ л}$$

Найближчим за об'ємом є стандартний ферментер на 10,0 м³ (V_ф).

Уточнюємо коефіцієнт заповнення для обраного ферментера:

$K_{\text{зап}} = V_{\Gamma} / V_{\text{ф}} = 5889,0 / 10\ 000 = 0,59$. Розраховане число не перевищує заданого значення, а отже, об'єм ферментера підібраний правильно.

3.4. Розрахунок кількості необхідних етапів для підготовки посівного матеріалу

Отже, за виробничий цикл можна одержати $V_{\text{пц}} = 5889$ л культуральної рідини. Також слід врахувати, що при одержанні культуральної рідини, можливими є її втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (E_ф), які складають 10%.

Отже, розрахуємо кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед процесом ферментації:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{пц}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 5889 / (1 - 0,1) = 6543 \text{ л}$$

Встановлена доза для посівного матеріалу складає від 5 до 10 % від об'єму поживного середовища. Приймаємо такий показник $X_{\text{пм1}} = 10\%$. Тому, із врахуванням дози посівного матеріалу $X_{\text{пм1}}$ робочий об'єм ферментера $V_{\text{роб1}}$ складе:

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

Звідси, об'єм поживного середовища $V_{\text{пс1}}$ буде:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 6543,0 / (1 + 0,1) = 5948,0 \text{ л,}$$

тоді об'єм посівного матеріалу $V_{\text{пм1}}$ складе

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 6543,0 - 5948 = 595 \text{ л}$$

Враховуючи втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря в розмірі 10 – 15%, об'єм посівного матеріалу та поживного середовища у посівному апараті буде таким:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 595 / (1 - 0,1) = 661 \text{ л.}$$

Оскільки попередньо було обрано дозу посівного матеріалу у розмірі 10%, то у посівному апараті об'єм поживного середовища становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 661 / (1 + 0,1) = 601 \text{ л,}$$

де $X_{\text{па}} = 0,1$ – встановлена доза інокуляту для посівного апарату.

Далі слід розрахувати об'єм посівного матеріалу для посівного апарату, який

$$\text{становить } V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 661 - 601 = 60 \text{ л.}$$

Інокулят об'ємом $V_{\text{роб.2}} = 661$ л можна отримати протягом вирощування штаму у посівному апараті з геометричним об'ємом $V_{\text{ін2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 661 / 0,6 = 1102$ л. Для цього обираємо найближчий за розміром стандартний посівний апарат $V_{\text{спа}} = 1,25 \text{ м}^3$. Перерахований коефіцієнт заповнення складатиме:

$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сін}} = 661 / 1250 = 0,53$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів

Посівний матеріал об'ємом 60 л можна отримати шляхом вирощування в інокуляторі із врахуванням подальших втрат у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10 – 15%).

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

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 60 / (1 - 0,15) = 78,47 \text{ л.}$$

Додавання посівного матеріалу у кількості 10% від об'єму поживного середовища є стандартною практикою для забезпечення належного засіву. Тоді об'єм поживного середовища, для вирощування бактерій в інокуляторі буде складати:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 78,47 / (1 + 0,1) = 71,34 \text{ л,}$$

де $X_{\text{ін}} = 0,1$ – встановлена доза інокуляту для посівного апарату.

Об'єм посівного матеріалу для інокулятора становить $V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 78,47 - 71,34 = 7,13$ л.

Відповідну кількість посівного матеріалу $V_{роб.3} = 7,13$ л можна отримати під час культивування штаму в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{ін3} = V_{роб.3} / K_{зап} = 78,47 / 0,6 = 130,8$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сін} = 160$ л та уточнюємо попередньо встановлений коефіцієнт заповнення.

$K_{зап3} = V_{роб.3} / V_{сін} = 78,47 / 160 = 0,49$. Одержане значення перебуває у межах, прийнятих для ферментерів межах для аеробних процесів.

Розрахований об'єм інокуляту (7,13 л) можна отримати шляхом вирощування штаму в інокуляторі із врахуванням подальших втрат у результаті краплиноносу через колектор відпрацьованого повітря (10 – 15%).

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

$$V_{роб.4} = V_{пм3} / (1 - E_{ін}) = 7,13 / (1 - 0,1) = 7,92 \text{ л.}$$

Додавання посівного матеріалу у кількості 10% від об'єму поживного середовища є стандартною практикою для забезпечення належного засіву. Тоді об'єм поживного середовища, для вирощування в інокуляторі буде складати:

$$V_{пс4} = V_{роб.4} / (1 + X_{ін}) = 7,92 / (1 + 0,1) = 7,2 \text{ л,}$$

де $X_{ін} = 0,1$ – встановлена доза інокуляту для посівного апарату.

Об'єм посівного матеріалу для інокулятора тоді складає $V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 7,92 - 7,2 = 0,72$ л.

Відповідну кількість посівного матеріалу $V_{роб.3} = 7,92$ л можна отримати під час культивування штаму в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{ін3} = V_{роб.3} / K_{зап} = 7,92 / 0,6 = 13,2$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сін} = 15$ л та уточнюємо попередньо встановлений коефіцієнт заповнення.

$K_{зап3} = V_{роб.4} / V_{сін} = 7,92 / 15 = 0,53$. Одержане значення перебуває у межах, прийнятих для ферментерів межах для аеробних процесів.

Посівний матеріал об'ємом $V_{\text{пм4}} = 0,72$ л можна одержати культивуванням штаму у колбах на качалці. Для цього застосовують 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:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 720 / (750 \cdot 0,2) = 4,8 - 5 \text{ колб.}$$

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідно 5 качалочних колб.

Можна зробити висновок, що процес одержання посівного матеріалу для проведення виробничого біосинтезу глюконової кислоти у ферментері об'ємом $10,0 \text{ м}^3$ за коефіцієнту заповнення $0,6$ буде проходити у 4 етапи. Узагальнена інформація щодо кількості стадій виробництва глюконової кислоти наведена у табл. 1.3.

Отже, за результатами наведених розрахунків, можна зробити висновок, що для біосинтезу глюконової кислоти *Aspergillus niger* SIIM M276 потрібно встановити один ферментер об'ємом $10,0 \text{ м}^3$, один посівний апарат об'ємом $1,25 \text{ м}^3$, один інокулятор об'ємом 160 л та один інокулятор об'ємом 15 л.

Таблиця 3.3

Кількість стадій та апаратів, необхідна підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу глюконової кислоти

№ стадії	Геометричний об'єм обраного апарату, $V_{\text{г}}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$, частка	Робочий об'єм апарата, $V_{\text{роб}}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$, л
1	2	3	4	5	6
1	10000	0,6	6543	5948	595
2	1250	0,53	661	601	60
3	160	0,49	78,47	71,34	7,13
4	15	0,53	7,92	7,2	0,72
5	0,75×5 колб	0,2	–	0,72	0,72

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Aspergillus niger SIIM M276 здатен до синтезу глюконової кислоти за умов росту на такому субстраті як глюкоза. Такий моносахарид у процесі його споживання бактерією розкладається за гліколітичним шляхом.

Відповідно до Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) катаболізм глюкози у *A. niger* [19] відбувається шляхом її попереднього розпаду із залученням гексокінази (1 КФ 2.7.1.1) на α -D-глюкозо-6-фосфат. Потім ця речовина перетворюється за допомогою глюкозо-6-фосфат-ізомераз (2 КФ 5.3.1.9) на β -D-фруктозо-6-фосфат, який далі розкладається із залученням фруктозо-1,6-біфосфатази (3 КФ 3.1.3.11) та 6-фосфотрикарбонату кіннази (3 КФ 2.7.1.11) у β -D-фруктозо-1,6-дифосфат. З однієї такої сполуки далі утворюються діоксиацетонфосфат і гліцеральдегід-3-фосфат (фермент – фруктозо-дифосфат альдолаза (4 КФ 4.1.2.13)). На наступному етапі гліцеральдегід-3-фосфат за дії гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (5 КФ 1.2.1.12) перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, з якого отримуємо 3-фосфогліцерат під дією ферменту фосфогліцераткінази (6 КФ 2.7.2.3).

Далі буде перетворення 3-фосфогліцерату за допомогою 2,3-дифосфогліцерат-незалежної фосфогліцерат мутази (7 КФ 5.4.2.12) на 2-фосфогліцерат, з якого утворюється фосфоенолпіруват (ФЕП) за дії енолази (8 КФ 4.2.1.11). ФЕП трансформується під дією піруваткінази (9 КФ 2.7.1.40) на піруват, який перетворюється під дією піруватдекарбоксилази (10 КФ 4.1.1.1) на 2-гідроксиетил-триптофандифосфат, який під дією піруватдекарбоксилази (11 КФ 4.1.1.1) перетворюється на ацетальдегід. В свою чергу ацетальдегід перетворюється на ацетат, за рахунок дії ацетил-КоА синтетази (12 КФ 6.2.1.1). Одержаний таким чином ацетил-КоА направляється до циклу трикарбоних кислот (ЦТК) [20].

					НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Тимченко А. Р.				РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Лім.	Арк.	Акруші 29
Консульт.								
Керівник	Ковшар І.Д.							
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							
						Кафедра БТМ		

Анаплеротичними реакціями, що забезпечують поповнення оксалоацетату (інтермедіату ЦТК) при рості на вуглеводному субстраті глюкозі, є такі перетворення як карбоксилювання фосфоенолпірувату (фермент – фосфоенолпіруват карбоксикіназа (АТР) КФ 4.1.1.49) і карбоксилювання пірувату (фермент – піруваткарбоксилаза КФ 6.4.1. 1).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

β -D-глюкоза, утворена із α -D-глюкози за допомогою альдоз 1-епімерази (13 КФ 5.1.3.3) трансформується у D-глюконо-1,5-лактон, який вступає у реакцію із водою і перетворюється у глюконову кислоту [21].

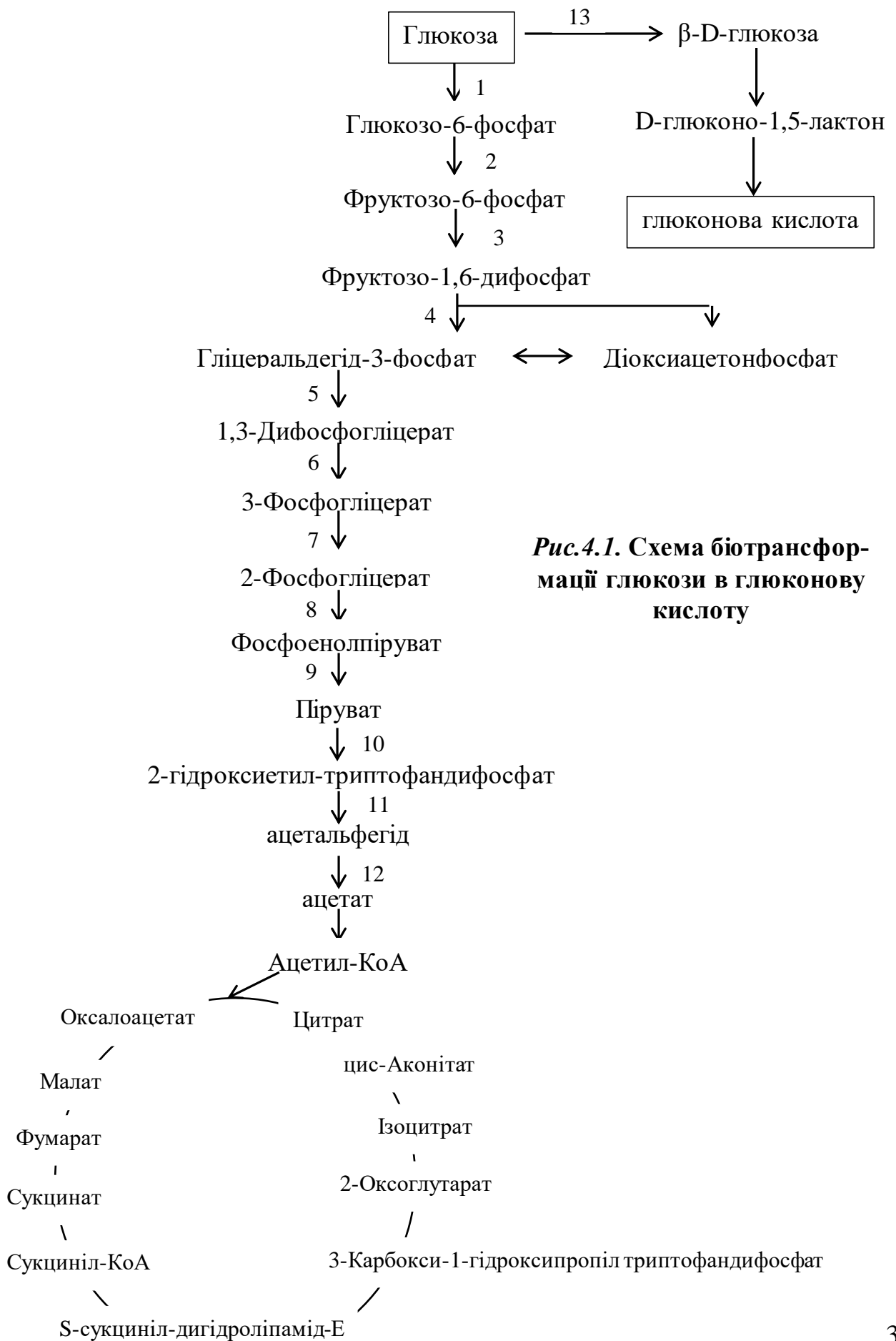


Рис.4.1. Схема біотрансформації глюкози в глюконову кислоту

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Виробництво глюконової кислоти *Aspergillus niger* є аеробним процесом бродіння з високим споживанням кисню. Біотрансформація глюкози в глюконову кислоту являє собою просту реакцію дегідрування без участі складних метаболічних шляхів клітини. Кисень є одним із основних прямих субстратів біоконверсії, де під час бродіння глюконової кислоти *A. niger* використовує молекулярний кисень для окислення глюкози. Для біоконверсії, а також для дихання міцелію необхідний кисень. Кисень зазвичай надається у формі повітря, але чистий кисень або перекис водню є варіантами ефективного перетворення.

На рис. 5.1 показано ефект посилення аерації біоперетворення глюкози в глюконову кислоту *Aspergillus niger* у зануреній культурі. Це видно з даних, що впливає на збільшення виробництва глюконової кислоти, збільшення аерації та розміру ферментаційних ємностей. Оптимальним був вихід глюконової кислоти (62 г/л) який отримують у ферментаційній колбі, що містить середовище об'ємом 2 л.

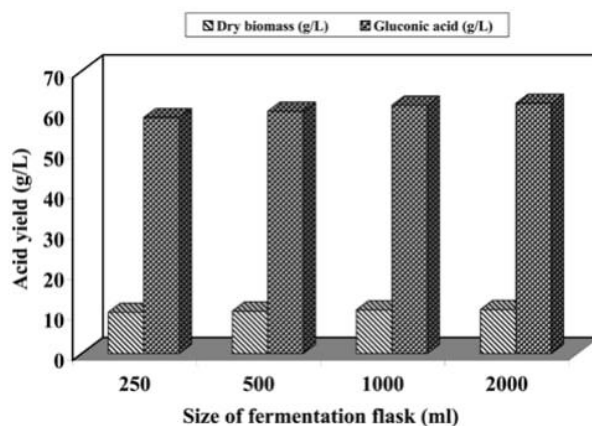


Fig. 1. Effect of aeration on the gluconic acid production and biomass of *A. niger* in submerged culture at 30°C for 7 days.

Рис. 5.1. Ефект посилення аерації біоперетворення глюкози в глюконову кислоту *Aspergillus niger*

					НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ			32		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.	Тимченко А. Р.				РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ			Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.										
Керівник	Ковшар І.Д.							Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Зав. каф.	Стабніков В.П.									

Ще одним критичним фактором, що впливає на синтез ГК є значення рН. Найбільш високий рівень синтезу ГК спостерігається в діапазоні 5-7, рис 2.2 [22].

Table 5. Effect of initial pH on the gluconic acid production and growth of *A. niger* in submerged culture at 30°C for 7 days

pH values	Dry biomass (g/l medium)	Gluconic acid (g/l)*
2	2.65	7.20
3	4.80	22.92
4	8.08	44.81
5	10.50	57.30
6	10.02	58.46
7	9.01	50.90
8	8.10	43.51
9	7.11	40.00
Mean ± SD	7.53 ± 2.65	40.64 ± 17.56

*Contains: 10% glucose = 150 g/l (w/v).

Рис 5.2. Вплив початкового рН на виробництво глюконової кислоти і ріст *A. niger*

Щодо температурного режиму, рис. 2.3 демонструє вплив температури інкубації на виробництво ГК (20°C-50°C). Оптимальна температура для ефективного бродіння для ГК (58,46 г/л) та виходу біомаси (10,02 г/л) становила 30°C. Про цю температуру також повідомляється як оптимальний для максимального виробництва глюконової кислоти іншими авторами. При 45°C вплив температури на виробництво глюконової кислоти був незначним [22].

Table 6. Effect of temperature on the gluconic acid production and growth of *A. niger* in submerged culture at pH 6.0 for 7 days

Temperature (°C)	Dry biomass (g/l medium)	Gluconic acid (g/l)*
20	5.82	30.22
25	10.00	50.72
30	10.02	58.46
35	8.01	48.50
40	2.52	18.53
50	–	–
Mean ± SD	7.27 ± 3.17	41.29 ± 16.40

*Contains: 10% glucose = 150 g/l (w/v).

–: not detected.

Рис 5.3. Вплив температури інкубації на виробництво глюконової кислоти

Зміни в умовах культивування мікроорганізмів часто корисні, щоб перевірити чи покращується виробництво за занурених, поверхневих та інших модифікованих умов бродіння. Залежно від режиму надходження O_2 розрізняють два види умов культивування для ферментації ГК: занурена ферментація (SmF) і твердофазна поверхнева ферментація (SSF). Така ферментація пішла від поверхневої ферментації і розроблена в неглибоких посудинах шляхом утворення «килимка» грибкового міцелію на поверхні середовища.

Спочатку поверхнева ферментація вважалася можливою для безперервного процесу ферментації глюконової кислоти, але пізніше було відхиленням через низький перехід O_2 в рідкій фазі, що не забезпечує безперебійної роботи безперервної ферментації глюконової кислоти. Таким чином поверхнева ферментація була модифікована шляхом використання перфорованої твердої опори для мікроорганізму з використанням природного субстрату як джерела вуглецю.

Отже, підсумувавши наведену вище інформацію, можна стверджувати, що біосинтез глюконової кислоти здійснюватиметься за таких умов:

- ❖ стерильність;
- ❖ кисневе культивування
- ❖ температурний режим: 33 C;
- ❖ рН 6,0;
- ❖ глибинний спосіб.

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Aspergillus niger по відношенню до кисню є облігатним аеробом, тому культивування продуцента має протікати за умови безперервної подачі стерильного аераційного повітря [5].

Оскільки атмосферне повітря містить різноматні частинки різних розмірів, що є місцем локалізації різноманітних мікроорганізмів, то попередня підготовка вхідного повітря та його стерилізація є обов'язковим етапом будь-

якого біотехнологічного виробництва. Основним методом отримання підготованого стерильного повітря належного класу чистоти є стерилізуюча фільтрація за допомогою фільтрів тонкої очистки [23-25].

Отримання стерильного повітря належного класу чистоти є комплексним процесом, що зазвичай складається із таких ключових етапів:

- Забір атмосферного повітря на у діапазоні 20-30 м на землю за допомогою турбокомпресора;
- Відібране повітря проходить попередню очистку від грубих часточок (пилу), шляхом проходження фільтрів грубої очистки. Це допомагає знизити концентрацію забруднення і захистити систему від часточок, що можуть пошкодити більш чутливі фільтри тонкої очистки та компресори ;
- Далі повітря потрапляє у турбокомпресор, де стискається до 0,35—0,5 МПа, щоб забезпечити подолання опору фільтрувальних матеріалів на наступних стадіях фільтрування.
- Після стискання повітря нагрівається до 120–250°C і як наслідок зростає % його вологості. Щоб уникнути накопичення зайвої вологи, повітря охолоджують і видаляють зайву вологу на краплевловлювачі.
- Підготоване таким чином повітря поступає на головні фільтри із панелями із матеріалом із скловолокна і базальту з грубозернистими пористими перегородками, діаметром пор від 15 до 50 мкм., де проходить видалення до 98% мікроорганізмів;
- Підготоване таким чином повітря через магістральні трубопроводи поступає через фільтри тонкої очистки (ефективність очищення 99,999%) у виробничі зони, приміщення, де проходить культивування, у ферментери, а також у бокси і лабораторні приміщення, де працюють із культурами мікроорганізмів [23-25].

5.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Промисловий біосинтез глюконової кислоти *Aspergillus niger* триває 220 днів (див. розділ 3) і потребує підготовки ферментеру 10000 л, інокуляторів об'ємом 15 л, 160 л і 1250 л, реакторів-змішувачів для композицій, качалки, боксу для роботи із культурою мікроорганізмів, збірника культуральної рідини і центрифуги для отримання супернатанту.

Технологія виробництва глюконової кислоти включає в себе лабораторні приміщення, приміщення із машиною для перемішування інокуляту у колбах, виробничого приміщення, а також приміщення для виділення глюконової кислоти. Для забезпечення доступу до обладнання і для полегшення очистки, обладнання розташовується на відстані приблизно 1,5 м одне від одного та від стін. Табл. 5.1. демонструє габаритні розміри обладнання

Таблиця 5.1

Габаритні розміри виробничого обладнання

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Інокулятор	15	0,6	0,8
Інокулятор	160	0,6	1,6
Інокулятор	1250	1,0	1,95
Ферментер	10000	1,5	6,1
Реактор змішувач	10	0,6	0,8
Реактор змішувач	15	0,6	0,8
Реактор змішувач	100	0,7	1,9
Реактор змішувач	1000	0,7	2,6
Реактор змішувач	1000	0,7	2,6
Реактор змішувач	5000	-	3,5
Реактор змішувач	10000	1,5	6,0
Реактор змішувач	10000	1,5	6,0
Реактор змішувач	15000	2,3	3,5
Реактор змішувач	25000	-	6,25
Всього		78550	

Як видно із даних наведених у табл. 5.1 загальний об'єм виробничого обладнання складає 78 550 л. Також варто врахувати, що під час виділення про-

дукту із культуральної рідини використовується: збірник супернатанту культуральної рідини об'ємом 10000 л і промислова центрифуга 10000 л. Отже разом загальний об'єм обладнання для оичтки складає 98,55 м³.

На наступному етапі розраховуємо кількість мийних та дезінфікуючих засобів, необхідних для очистки стін та підлоги у приміщеннях. Приблизний план приміщення для технологічного процесу отримання глюконової кислоти наведено на *рис. 5.4*

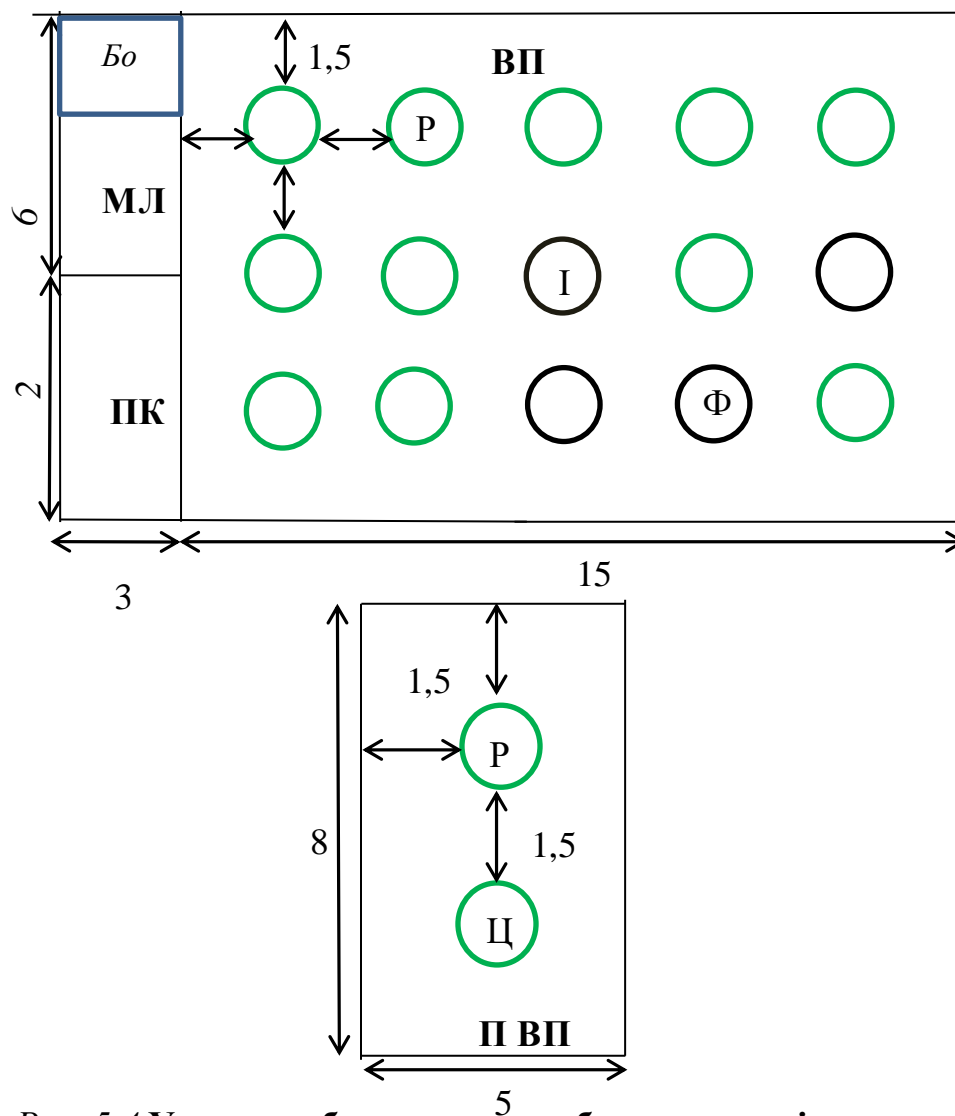


Рис. 5.4 Умовне зображення виробничих приміщень

- ВП** – виробниче приміщення;
- МЛ** – мікробіологічна лабораторія;
- ПК** – приміщення з качалками.
- П ВП** – приміщення виділення продукту
- І, Р, Ф, Ц, З** – інокулятор, реактор-змішувач, ферментер, центрифуга, збірник

Для підтримки чистоти у виробничих приміщеннях, миття підлоги здійснюватиметься щодня, тобто 220 разів. Генеральне прибирання (обробка стін, вікон і підлоги) – 2 рази на місяць, 16 разів. Далі розрахуємо кількості необхідних миючих засобів для очистки стін і підлоги. Як зазначено на із *рис. 5.1*, враховуючи висоту приміщень 8 м, площа підлоги виробничого приміщення складає 120 м² (15 м × 8 м), площа стін: $((15 \text{ м} \times 8 \text{ м}) \times 2 + (8 \text{ м} \times 8 \text{ м})) \times 2 = 368 \text{ м}^2$, а загальна площа: $120 \text{ м}^2 + 368 \text{ м}^2 = 488 \text{ м}^2$. Площа підлоги у мікробіологічній лабораторії складає 6 м × 3 м = 18 м², площа стін: $((6 \text{ м} \times 8 \text{ м}) \times 2 + (3 \text{ м} \times 8 \text{ м})) \times 2 = 144 \text{ м}^2$, загальна площа: 162 м². Площа підлоги приміщення, де встановлено установку з качалками: 2 м × 3 м = 6 м², площа стін – $((2 \text{ м} \times 8 \text{ м}) \times 2 + (3 \text{ м} \times 8 \text{ м})) \times 2 = 80 \text{ м}^2$, загальна площа: 86 м². Площа підлоги приміщення виділення продукту: 8 м × 5 м = 40 м², площа стін – $((8 \text{ м} \times 8 \text{ м}) \times 2 + (5 \text{ м} \times 8 \text{ м})) \times 2 = 208 \text{ м}^2$, загальна площа: 248 м². Результати підрахунку сумарної площі поверхонь, що підлягають обробці, наведена в *табл. 5.2*.

Таблиця 5.2

Розрахунок загальної площі стін та підлоги

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Виробниче приміщення	120	368	488
Мікробіологічна лабораторія	18	144	162
Приміщення з качалками	6	80	86
Приміщеннч виділення продукту	40	208	248
Разом	184	800	984

У *табл. 5.3* приведено розрахунок площ / об'єму для миття /дезінфекції впродовж виробничого процесу, враховуюч періодичність обробки. Враховуючи, що загальний об'єм культуральної рідини становить 275 602 л , а об'єм культуральної рідини / цикл дорівнює 5889 л/цикл, то кількість циклів *миття обладнання* буде становите: $275 \text{ 602 л} / 5889 \text{ л/цикл} = 47$ циклів, плюс додаткове миття після заключного циклу – 48. Тоді загальний об'єм миття:

$$98,55 \times 48 = 4728,0 \text{ м}^3$$

Таблиця 5.3

Розрахунок площ / об'єму миття / дезінфекції

Об'єкт	Площа / об'єм об'єкту, м ² / м ³	Періодичність миття / дезінфекції під час виробничого процесу	Загальна площа / об'єм, м ² / м ³
Обладнання	98,55 м ³	48	4728 м ³
Підлога	184 м ²	220	40 480 м ²
Стіни/ двері	800 м ²	16	12 800 м ²

Обґрунтування вибору мийних / дезінфікуючих засобів

Оскільки згідно із рекомендаціями по застосуванню мийних і дезінфікуючих засобів, витрата робочого розчину становить в середньому близько 100 мл на площу в 1 м², то одним із основних критеріїв під час підбору є ціна засобу для очистки і дезінфекції.

Виходячи із даних у *табл 5.3* загальний об'єм для виробничого обладнання становить 4728 м³. З метою економії води і мийного засобу (до 50 % від об'єму апарату), а також для підвищення ефективності миття, мийні засоби подаються в реактори/інокулятори/ферментер через СІР-мийки. Витрата мийного засобу на один цикл миття становить: $98550 \text{ л} \times 0,5 = 47275 \text{ л}$ робочого розчину, а за весь період: $47275 \text{ л} \times 48 = 2\,365\,200 \text{ л}$. Знаючи, що загальна площа всіх поверхонь складає $40480 \text{ м}^2 + 12\,800 \text{ м}^2 = 53280 \text{ м}^2$ (*див табл. 5.3*), кількість мийного / дезінфікуючого розчину становить: $53280 \text{ м}^2 \times 100 \text{ мл} = 5328 \text{ л}$.

Підбір мийного / дезінфікуючого засобу для виробництва

Ефективність будь-якого біотехнологічного виробництва залежить в першу чергу від суворого дотримання протоколів очистки і дезінфекції, що дає змогу захистити готовий продукт від перехресної контамінації / мікробного забруднення та забезпечити відповідність технологічного процесу. Крім низької вартості до мийні / дезінфікуючі засоби мають бути:

- толерантні до оброблюваних поверхонь;

- зручні у використанні і легкокорозичиненні у воді;
- високоефективні проти різних мікроорганізмів;
- мало токсичні для здоров'я людини і безпечні для продукту, без впливу на смак, запах, колір

Табл. 5.4. демонструє орієнтовну вартість де-яких мийних / дезінфікуючих засобів та їх витрати під час використання для встановлених об'ємів та площ.

Вартість мийних / дезінфікуючих засобів під час виробництва глюконової кислоти

Назва	Концентрація робочого розчину, %	Об'єкт миття / дезінфекції	Площа / об'єм миття / дезінфекції об'єкту, м ² / л	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного/ дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Сумарна вартість миття / дезінфекції під час виробництва, грн
SUPRA SPEED ¹	3,5%	Обладнання	4728,0 л	2 365 200	120,6	4,22	9 984 782
PRIMA MK ²	0,8 %	Обладнання	4728,0 л	2 365 200	123,36	1,0	2 365 200
ДЕЗЕКОН OM ³	2,5 %	Стіни/підлога/ вікна	53 280	5328	540	13,5	71 928
НОВОХЛОРЕКСТРА ⁴	0,25 %	Стіни/підлога/ вікна	53 280	5328	120	3	15 984

Примітка. Вартість засобів наведено станом на січень 2025 р.: 1. https://prom.ua/p294519716-sredstvo-dlya-ochistki.html?srsltid=AfmBOop8wWl5m6L3VuUz43PM0OKJ891zQhYT_1etv1Xl8e3v_Ho1apUS, 2 - <https://prom.ua/p2460761442-kontsentrat-prima-pena.html>, 3 - <https://prom.ua/p1537967092-dezekon-flakon-dozator.html>, 4 -

* **розрахунок вартості 1 л робочого розчину описано для мийного засобу «SUPRA SPEED»:** Ціна 1 л становить 120,6 грн, концентрація його робочого розчину – 3,5 %, тому в 1000 мл робочого розчину міститься 35 мл (0,035 л) концентрату. Таким чином вартість 3,5 % розчину становить: 120,6 грн × 0,035 л = 1,47 грн/л.

Миючі засоби

Миючий засіб SUPRA SPEED – концентрований лужний пінний миючий засіб, що представляє собою оптимізовану суміш ПАР і комплексоутворюючих речовин, водорозчинних, біорозкладністю. Використовується для очищення обладнання. Засіб в хімічному відношенні стабільно в воді і на повітрі, не розкладається з виділенням шкідливих речовин. Перед застосуванням засіб необхідно збовтати. Миття здійснюють механізованим (апарати високого тиску, піногенератори) або ручним способом за допомогою аерозольного розпилення. Робоча концентрація: від 0,5% до 7%. В нашому випадку приймемо середнє значення у 3,5 % [26].

Миючий засіб PRIMA МК – висококонцентрований кислотний пінний миючий засіб, що є оптимізованою сумішшю ПАР і комплексоутворюючих речовин, на основі азотної кислоти, водорозчинно, біорозкладається. Склад? Склад: композиція дидецилдиметиламоніум хлориду – не менше 9,0%, амінопропілдодецилпропандіаміну – не менше 5,0%, полігексаметиленбігуанід гідрохлориду – не менше 0,98% (діючі речовини) та допоміжних компонентів (сурфактант, регулятор). Засіб у хімічному відношенні стабільно у воді та на повітрі, не розкладається з виділенням шкідливих речовин. Застосовується для видалення карбонатних відкладень, комплексних забруднень, вапняних нальотів із обладнання, трубопроводів. Робоча концентрація 0,1 – 1,5 %. В нашому випадку приймемо середнє значення у 0,8 %. Утилізація відпрацьованого розчину Prima МК пінна проводиться шляхом зливу в промислову каналізацію [27].

Порівнявши два миючі засоби PRIMA МК і SUPRA SPEED, для мийки обладнання краще обрати миючий засіб PRIMA МК, оскільки сумарна вартість миття обладнання за допомогою PRIMA МК є у 4 рази дешевшою, ніж у випадку використання SUPRA SPEED.

Дезінфікуючі засоби

Дезінфікуючі засоби дають змогу знизити концентрацію мікроорганізмів до певного встановленого рівня, летально впливаючи на клітинні органели і внутрішньоклітинний метаболізм.

Дезінфікуючий засіб ДЕЗЕКОН ОМ – високоекономічний лужний низькопінний концентрований дезінфекційний засіб на основі композиції четвертинних амонієвих солей, амінів і бігуанідів для дезінфекції. Склад: синергічна композиція дідецілдіметіламоніум хлориду – не менше 9,0%, амінопропілдодецілпропандіаміна – не менше 5,0%, полігексаметіленбігуанід гідрохлориду – не менше 0,98% (діючі речовини) і допоміжних компонентів (сурфактант, регулятор рН, барвник, ароматизатор.). Засіб має бактерицидні (включаючи збудників туберкульозу, *P.aeruginosa*, *S.aureus*), віруліцидні (включаючи віруси гепатитів В, С, ВІЛ, герпесу, грипу), фунгіцидні (проти збудників кандидозів і дерматомікозів, а також цвілевих грибів *A.niger*, в т.ч. в спорових форм) властивості. При підвищенні температури розчинів їх антимікробна активність і миюча здатність збільшуються.

Засіб добре змішується з холодною і гарячою водою в будь-якому співвідношенні. Водні розчини прозорі, зі слабким запахом ароматизатора і помірним піноутворенням; мають мийні властивості, які посилюються при підвищенні температури робочих розчинів; не фіксують забруднення на поверхнях об'єктів обробки, добре змиваються, не залишають плям і нальоту, видаляють органічні забруднення. Робочі розчини не ушкоджують поверхні об'єктів, виготовлених з металів, скла, полімерних матеріалів, гуми, пластмас, лакофарбового, гальванічного покриття. Не знебарвлює і не знижує міцність тканин, полегшує прання. Засіб застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації від 0,02% до 5%. Для розрахунку приймемо робочу концентрацію у 2,5 %. Норма витрати робочого розчину – 100 мл/м² [28].

Дезінфікуючий засіб НОВОХЛОП-ЕКСТРА – засіб має широку сферу застосування. Добре змішується з водою в будь-якому співвідношенні. Склад: хлор-активний агент (початкова концентрація активного хлору 7-9%), мийні, ароматизуючі, антикорозійні компоненти, стабілізатор вмісту активного хлору. Дезінфікцій засіб «Новохлор-Екстра» ефективний проти широкого спектра мікроорганізмів: грам + і грам-бактерій (в т. ч. *Pseudomonas aeruginosa*, БГКП, *S.aureus*, *Listeria monocytogenes*, гнильних бактерій (в т. ч. роду *Proteus*, мікобактерій туберкульозу, збудників черевного типу, паратифів, дифтерії, менінгококової інфекції та внутрішньолікарняних інфекцій, вегетативних і спорових форм спороутворюючих бактерій (в т. ч. роду *Clostridium*, збудників «картопляної хвороби» хліба), вірусів (в т. ч. поліовірусів, вірусів гепатитів А, В, С та ВІЛ, вірусів грипу всіх типів (в т. ч. H5N1 та H1N1), SARS («Атипова пневмонія»), грибів роду *Candida*, збудників дерматомікозів, плісняві гриби *Aspergillus niger* в спорових формах, спор мікроорганізмів, а також збудників особливо небезпечних інфекцій, зокрема сибірської виразки, чуми, холери, псевдотуберкульозу, бруцельозу, лептоспірозу.

III клас небезпеки (помірнонебезпечні речовини по ГОСТ 12.1.007-76). Не має сенсibilізуючої і мутагенної дії. Дезінфікуючий засіб «Новохлор-Екстра» і його робочі розчини мають лужну реакцію, емульгуючу, виражену мийну і високу змочувальну дії; не фіксують на поверхнях обробки органічні забруднення, добре змиваються водою з оброблених поверхонь, не залишають патьоки і наліт; видаляють білкові, жирові, механічні забруднення. Засіб і його розчини не ушкоджують вироби з металу, скла, гуми, полімерних матеріалів (в т. ч. полістиролу, поліетилену, полівініл-хлориду, поліуретану), деревини, кераміки, лакофарбове, гальванічне і полімерне покриття. Засіб застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації по активному хлору від 0,01% до 0,5% залежно від сфери застосування, цілі обробки, виду забруднення, збудника і об'єктів обробки. Для розрахунку приймемо робочу концентрацію у 0,25 %. Норма витрати робочого розчину – 75-100 мл/м² [29].

Проаналізувавши наведені *дезінфікуючі засоби* і їх ціну, для дезінфекції приміщень краще обрати засіб **НОВОХЛОП-ЕКСТРА**, оскільки сумарна вартість засобу у майже 6 разів менша від засобу **ДЕЗЕКОН ОМ**.

5.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 10,0 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Підготовка посівного матеріалу відбувається у чотири стадії (в колбах на качалці, у посівних апаратах об'ємом 15, 160 л та 1,25 м³).

Згідно із інформацією із статті [5], склад поживного середовища для вирощування інокуляту, має такий вигляд (г/л):

- Глюкоза – 60,00;
- Дріжджовий екстракт – 2,0;
- MgSO₄ – 0,2;
- KН₂PO₄ – 0,1
- NaН₂PO₄ – 0,2;
- MnSO₄ – 0,01;
- рН середовища – 6,0.

Для біосинтезу використовується розчин гідролізату кукурудзяної соломи.

Щоб процес біосинтезу був максимально ефективним необхідно дотримуватись умови стерильності поживного середовища, яке використовується для культивування *Aspergillus niger*. Отже необхідно провести розподіл компонентів поживного середовища на відповідні композиції, щоб правильно обрати режими стерилізації.

Для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках потрібен невеликий об'єм поживного середовища, який будемо стерилізувати в автоклаві. Наступні стадії одержання інокуляту та виробничого біосинтезу, підготовку компонентів середовища будемо здійснювати в окремих реакторах-змішувачах або безпосередньо у ферментаційному обладнанні. Глюкозу і дріжджовий

екстракт будемо стерилізувати у м'якому режимі, оскільки глюкоза є термолабільною та здатна до карамелізації.

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

На цьому етапі, щоб отримати необхідний об'єм інокуляту, потрібно приготувати 720 мл стерильного поживного середовища. Підготовлене середовище розливаємо у 5 стерильних качалочних колб об'ємом по 750 мл. Стерилізацію компонентів середовища проводимо таким чином:

Композиція А: глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа, час 20 – 30 хв).

Композиція Б: MgSO₄, MnSO₄ (режим стерилізації: режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: KH₂PO₄, NaH₂PO₄ (режим стерилізації: режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Таблиця 5.5

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 720 мл середовища, г (мл)	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	60	43,2	0,4
Дріжджовий е-т	2,0	1,44	
Вода		0,4	
MgSO ₄	0,2	0,144	0,1
MnSO ₄	0,01	0,0072	
Вода		0,1	
KH ₂ PO ₄	0,1	0,072	0,12
NaH ₂ PO ₄	0,2	0,144	
Вода		0,12	
Всього			0,72 л

5.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Підготовка посівного матеріалу передбачає приготування 7,2, 71,34 і 601 л стерильного поживного середовища

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 15 л

Для цієї стадії необхідно 7,2 л поживного середовища, склад композиції та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.2.1. Композиція А готується у реакторі на 10 л і стерилізується в інокуляторі 10 л, а композиція Б і В – в автоклаві.

Таблиця 5.6

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 15 л (Кз = 0,6)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 7,2 л середовища, г (мл)	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	60	432,0	5,2
Дріжджовий е-т	2,0	14,4	
Вода	4,8		
Конденсат			0,4
MgSO ₄	0,2	1,44	1,0
MnSO ₄	0,01	0,072	
Вода	1,0		
KH ₂ PO ₄	0,1	0,72	1,0
NaH ₂ PO ₄	0,2	1,44	
Вода	1,0		
Всього			7,2 л

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 160 л

Для цієї стадії необхідно 71,34 л поживного середовища, склад композиції та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.2.1. Композиція готується у реакторі на 100 л і стерилізується в інокуляторі 100 л, а композиція Б і В – в автоклаві.

Таблиця 5.7

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 160 л (Кз = 0,6)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 71,34 л середовища, г (мл)	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	60	4,28 кг	69,0
Дріжджовий е-т	2,0	142,68	
Вода	62,8		
Конденсат			6,2
MgSO ₄	0,2	14,26	1,0
MnSO ₄	0,01	71,34	
Вода	1,0		
KH ₂ PO ₄	0,1	7,13	

NaH ₂ PO ₄	0,2	14,26	1,34
Вода	1,34		
Всього			71,34 л

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1250 л

Для цієї стадії необхідно 601 л поживного середовища, склад композиції та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.2.1. Композиція А готується у реакторі на 1000 л і стерилізується у посівному апараті на 1000 л, композиція Б у автоклаві, а композиція В у реакторі на 5 л.

Таблиця 5.8

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1,25 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 601 л середовища, г (мл)	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	60	36,06 кг	597,0
Дріжджовий е-т	2,0	1,20 кг	
Вода	543,0		
Конденсат			53,0
MgSO ₄	0,2	120,2	1,0
MnSO ₄	0,01	6,01	
Вода	1,0		
КН ₂ РО ₄	0,1	60,1	3,0
NaH ₂ PO ₄	0,2	120,2 к	
Вода	2,8		
Конденсат			
Всього			601,0

5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Для цієї стадії необхідно 5,948 м³ (5948 л) поживного середовища (розчину гідролізату кукурудзяних качанів), тому потреби у використанні установки безперервної стерилізації немає. Гідолізат отримують в процесі хіміко-ферментативного гідролізу маси подрібнених кукурудзяних качанів, як детально описано у розділі 4.

5.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Оскільки культивування продуценту і біосинтез глюконової кислоти *Aspergillus niger* передбачає підтримку рН на рівні 6,0, то необхідна попередня

підготовка титрувального агенту, 20%-вий розчин натрію гідроксиду. Розраховані дані щодо необхідних об'ємів розчинів такого компоненту наведено у табл. 2.1.

Таблиця 5.9

Розраховані об'єми та особливості приготування 20 % р-ну NaOH

Об'єм ПС, л	Об'єм, мл	Особливість підготовки
5948	11 896	у реакторі об'ємом 15 л

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає додаткову стадію з приготування та стерилізації 20% розчину NaOH.

Крім того необхідно передбачити такі реактори:

– для приготування та стерилізації композиції реактори об'ємами 10, 100 і 1000 л;

– для приготування та стерилізації 20% NaOH необхідний реактор на 15 л,

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Узагальнений перелік обладнання, використовуваного для біосинтезу глюконової кислоти наведено у табл. 6.1. Відповідне обладнання представлено у графічній частині (апаратурна схема).

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання. Виробництво глюконової кислоти

Позиція	Найменування позиції	Кількість	Характеристика обладнання
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник ВЕНТС ТТ 100. Потужність: 187 – 520 м ³ /год [29].
Ф-2	Фільтр грубого очищення	1	Фільтр грубої очистки повітря ВЕНТ-ФІЛЬТР. Температура: до +80 °С. Максимальний тиск: до 15 бар [31].
К-3	Компресор стиснення	1	Компресор Mast SH-8 Продуктивність компресора: 690 л/хв. Тиск компресора: 10 бар. Споживана потужність: 5,5 кВт. Габарити: 750x600x820 мм [32].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач. DAIKIN FDXM35F9/RXM35R9. Потужність: 3,4 кВт. Робочий діапазон: -15~+18°С. Габарити: 750x620x200 мм [33].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер Повітряний Лідер. Виробник: Україна. Матеріал: нержавіюча сталь. Робочий тиск: 16 бар. Об'єм: 900 л. Робоча температура: 5.. +40 °С [34].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник-нагрівач. DAIKIN FDXM35F9/RXM35R9. Потужність: 3,4 кВт. Робочий діапазон: -10~+46°С. Габарити: 750x620x200 мм [33].
Ф-7	Фільтр головного очищення	1	Фільтр тонкого очищення стисненого повітря Alter Air F7-F9. Виробник: Україна. Робочий перепад тиску: 450 Па [35].

					НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ					
Розроб.	Тимченко А.Р.							Літ.	Арк.	Акрушіт 50
Консульт.								Кафедра БТМ		
Керівник	Ковшар І.Д.									
Н. Контр.										
Зав. каф.	Стабніков В.П.									

Продовження табл. 6.1

РЗ-8	Реактор-змішувач для підготовки 2,5 % р-ну сульфатної кислоти	1	Реактор-змішувач DIN-AE 1000 об'ємом 1000 л. Виробник: Німеччина. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Наявна пропелерна мішалка (120 об/хв). Габарити: 0.7 м x 2.6 м [36].
РЗ-9	Реактор-змішувач для підготовки р-ну цитрату	1	Реактор-змішувач 15 м ³ . Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Наявна турбінна мішалка. Габарити: 2.3 м x 3.54 м [37].
РЗ-10	Реактор-змішувач для підготовки подрібнених качанів	1	Реактор-змішувач ЦКТ 5000 Виробник: Термо-Паб. Об'єм: 5000 л. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 304 Розміри: Н = 3580 [38]
Д-11	Дробарка	1	Дробарка Лан-3. потужність, 2,5 кВт, Продуктивність: 320 кг/год [39]
РЗ-12	Реактор-змішувач для ферментативного гідролізу	1	Реактор-змішувач . Виробник: Німеччина. Об'єм: 25000 л Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Наявна пропелерна мішалка Габарити: Н=6.25 м [40].
Ц-13	Центрифуга	1	Центрифуга GN LW224FC Виробник: GN separation. максимальна швидкість: 10000 об./хв. матеріал: сталь SUS2304/ SUS2205 [41]
РЗ-14	Реактор-змішувач для фільтрату гідролізату кукурудзяних качанів	1	Реактор-змішувач ASCA 10000 л. Виробник: Asca Metallwarenfabrik Behälter- und Apparatebau (DE). Матеріал корпусу: нержавіюча сталь.. Габарити: 1.5 м x 6.0 м [42].
Ф-15	Фільтр-прес	1	Фільтр-прес COLOMBO 36. Продуктивність: 0,8 м ³ /год. Виробник: ROVER POMPE. Потужність: 0,45 кВт [43]
РЗ-16	Реактор-змішувач для стерилізації фільтрату гідролізату кукурудзяних качанів	1	Реактор-змішувач ASCA 10000 Ltr. Виробник: Asca Metallwarenfabrik Behälter- und Apparatebau (DE). Матеріал корпусу: нержавіюча сталь.. Габарити: 1.5 м x 6.0 м [42].

Продовження табл. 6.1

РЗ-17	Реактор-змішувач для підготовки композиції А	1	Реактор-змішувач Comqina. Робочий тиск: 1-5 бар. Об'єм: 10 л. Матеріал: AISI 304 нержавіюча сталь [44].
I-18	Інокулятор	1	Інокулятор BLBIO-XGJ-2-A, Об'єм: 15 літрів. Виробник: «BLBIO». Корпус виготовлений з нержавіючої сталі AISI 316L та боросилікатного скла. Оснащення: турбінна мішалка 20-200 об/хв, рубашка для контролю температури, датчики для вимірювання рН, рО ₂ , розчиненого кисню (DO), температури, витратомір, манометр, барботер та контролер рівня рідини. Потужність: 2 кВт. Габаритні розміри: 800x600x650 мм [45].
ІФ-19, ІФ-20, ІФ-21 ІФ-22	Індивідуальний фільтр	4	Фільтр Filson. Потік повітря: 3660 м ³ /год. Робочий тиск: до 250 psi. Діаметр пор: менше 4 мкм. Температура експлуатації: -20...+350 °С [46].
Д-23, Д-24, Д-25, Д-26 Д-27 Д-28 Д-29 Д-30 Д-31	Ваговий дозатор для компонентів середовища	8	Дозатор ваговий FOYER FZ-5000-II вібрлотковий прямої дії. Виробник: Україна. Діапазон зважування: 0,01-10 кг. Потужність: 360 Вт. Габарити: 640 x 650 x 1570 мм [47].
РЗ-32	Реактор-змішувач для підготовки композиції А		Реактор-змішувач DIN-AE 100 об'ємом 100 л. Виробник: Німеччина. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Наявна пропелерна мішалка (120 об/хв). Габарити: 0.7 м x 1.9 м [36].
ВН-33 ВН-34 ВН-35 ВН-36 ВН-37	Відцентровий насос для перекачування	5	Насос харчовий Г2-ОПА. Виробник: Україна. Продуктивність: 6,3 м ³ /год. AISI 304 нержавіюча сталь, Потужність: 0,73 кВт [48].
ВН-38 ВН-39 ВН-40 ВН-41 ВН-48 ВН-49	Відцентровий насос для перекачування	6	Насос відцентровий LEO 3.0.. Бренд: Leo. Продуктивність: 20 л/хв. [49]

Закінчення табл. 6.1

I-42	Інокулятор	1	Інокулятор. Виробник: «Comqiana», Данія. Виготовлений із нержавіючої сталі 316. Об'єм: 160 л. Оснащений: барботером, сорочкою і датчиками рН, рО ₂ та температури. Швидкість обертання турбінної мішалки: 320 об/хв. Габаритні розміри інокулятора складають 600 x 700 x 1650 мм [50].
P3-43	Реактор-змішувач для підготовки композиції А	1	Реактор-змішувач DIN-AE 1000 об'ємом 1000 л. Виробник: Німеччина. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Наявна пропелерна мішалка (120 об/хв). Габарити: 0.7 м x 2.6 м [36].
P3-44	Реактор-змішувач для підготовки композиції В	1	Реактор-змішувач Medimex HLR-5. Об'єм: 5 л. Виробник: Medimex, Швейцарія. Матеріал: 316 L нержавіюча сталь. Тиск: 300 бар. Температурний діапазон: 0-350 °С. Габарити: 0,60 м x 0,70 м [51]
ПА-45	Посівний апарат	1	Посівний апарат FS-MO 1250 об'ємом 1250 л. Виробник: SPEIDEL. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Сорочка і пропелерна мішалка. Датчики температури, кисню і рН. Габарити: 1,0 м x 1,95 м [52]
Ф-46	Ферментер	1	Ферментер HG-FJ-10000L, об'ємом 10 м ³ . Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Манометр: в комплекті регульованого клапана тиску. Передбачено місце для вставлення термодатчика / термометра. Тиск: 0,2 Мпа. Габарити: 1.5 м x 6.1 м [53].
P3-47	Реактор-змішувач 15 л для приготування і стерилізації натрію гідроксиду (концентрація 6%)	1	Реактор-змішувач PA-15, Об'єм: 15 л. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 304 [54].
ВН-50	Відцентровий насос для перекачування культуральної рідини у збірник	1	Насос харчовий Г2-ОПА. Виробник: Україна. Продуктивність: 6,3 м ³ / год. AISI 304 нержавіюча сталь, Потужність: 0,73 кВт [48].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.

Технологічний процес біосинтезу глюконової кислоти *Aspergillus niger* складається із допоміжних та основних робіт. До стадій допоміжних робіт (ДР) належать: підготовка стерильного аераційного повітря, приготування титрувального розчину NaOH, підготовка 2,5 % розчину сульфатної кислоти, приготування цитратного буферу, приготування розчину гідролізату целюлози, приготування і стерилізація розчину кальцію карбонату підготовка і стерилізація поживного середовища. До стадій основного технологічного процесу (ТП) відносять: приготування посівного матеріалу та промисловий біосинтез.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря відбирають за допомогою повітрязабірника (ПЗ-1) у найвищій точці – на висоті 13 м (висота поверху – 8 м, кількість поверхів – 1, косий дах будівлі (~1,5 м), + 2-3 метри), де розміщують обладнання для стиснення та очищення повітря.

ДР 1.2. Очищення повітря від грубих часток

Попереднє очищення повітря проводять у фільтрі (Ф-2), що забезпечує ступінь очищення до 90%, затримуючи при цьому частинки діаметром 50 мкм.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Стискання повітря здійснюють у компресорі (К-3), щоб забезпечити аерацію та подолати гідравлічний тиск стовпа рідини у ферментері. Умови процесу: тиск – 0,35 МПа, температура – до 250°C.

ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи

Стиснене повітря, утворене при компресуванні, (від ДР 1.3) надходить до теплообмінника-охолоджувача (Т-4), де охолоджується до температури 25-30°C. Згодом зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де проходить усунення пульсацій руху повітря. На даному етапі показник вологості зменшується до 60%.

					НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тимченко А. Р.			РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушіт 5 4
Консульт.								
Керівник		Ковшар І. Д.						
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В. П.						
					Кафедра БТМ			

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Охоложене повітря (від ДР 1.4) надходить до теплообмінника-нагрівача (Т-6), де нагрівається до температури 45-50°C. На даному етапі показник вологості зменшується до 50%.

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Нагріте повітря (від ДР 1.5) надходить до головного фільтра очистки (Ф-7), який ставлять біля ферментаційних відділень. На даному етапі ступінь очищення складає 95%.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 1.6) через трубопроводи подається безпосередньо в індивідуальні фільтри кожного з інокуляторів до ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 5.7, ТП 6.1. Ступінь кінцевої очистки повітря складає 99,999% та КУО – 0.

ДР 2. Приготування титрувальних розчинів

ДР 2.1.1. Приготування і стерилізація 20%-го розчину NaOH для підлужнення культуральної рідини у ферментері об'ємом 10,0 м³.

Для приготування 11 896,0 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 1784,4 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у реактор-змішувач (РЗ-48) об'ємом 15 л і за допомогою лічильника додають 10 111,6 мл питної води, перемішують до повного розчинення. Стерилізують у такому реакторі при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3 Підготовка 2,5 % розчину сульфатної кислоти

ДР 3.1. Приготування 2,5 % розчину сульфатної кислоти для кислотної обробки кукурудзяних качанів

Для того, аби приготувати 750 л 2,5 %-го розчину H₂SO₄ потрібно у реактор-змішувач (РЗ-8) об'ємом 1000 л додати 730,86 л води дистильованої через лічильник і додати за допомогою лічильника при постійному перемішуванні 19,132 л 98 %-го розчину H₂SO₄ (Кх).

ДР 4 Підготовка цитратного буферу.

ДР 4.1 Приготування цитратного буферу.

Для того, щоб приготувати 11,25 м³ цитратного буферу, потрібно у реактор-змішувач (РЗ-9) на 15 м³ додати через лічильник 8,437 м³ води дистильованої, через ваговий дозатор подати 2565 кг цитрату натрію та 247,5 кг лимонної кислоти. Вмикають перемішувач і додають 37 % розчин NaOH до встановлення рН на рівні 6,5. Стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 5. Приготування розчину гідролізату кукурудзяних качанів

ДР 5.1 Кислотна обробка кукурудзяних качанів

Подрібнених 1500 кг качанів на дробарці Д-11 подають через ваговий дозатор у реактор-змішувач (РЗ-10) на 5 м³. Через лічильник у реактор подають 750 л 2,5 %-го розчину сульфатної кислоти (у співвідношенні 2:1) від ДР 3.1. до проведення повного кислотного гідролізу.

ДР 5.2 Ферментний гідроліз

У реактор-змішувач (РЗ-12) на 25 м³ подають отримані від ДР 5.1 1125 кг гідролізованої маси, розчиняють у 11,25 м³ попередньо підготованого цитратного буферу (від ДР 4.1), додають через лічильник 8,75 м³ води питної (рН 4,8) і фермент целюлазу (15 МО/г). Отриманий розчин перемішують, нагрівають до температури 50 °С і витримують 48 год.

ДР 5.3 Центрифугування

Отриманий розчин від ДР 5.3 перекачують у центрифугу (Ц-13) і центрифугували при 10000 об/хв протягом 10 хв, щоб видалити нерозчинні у воді тверді речовини та отримати гідролізат, який збирають у реакторі-змішувачі (РЗ-14).

ДР 5.4 Стерилізація розчину гідролізату кукурудзяних качанів

Розчин гідролізату від ДР 5.3 стерилізують у реакторі-змішувачі (РЗ-16) на 10 м³ при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

ДР 6. Приготування і стерилізація розчину кальцію карбонату

ДР 6.1. Приготування і стерилізація розчину кальцію карбонату для культивування у колбах

Зважують на вагах 18,0 г CaCO_3 (із розрахунку 30,0 г/л поживного середовища на 100 г глюкози), переносять у колбу на 200 мл, доливають через лічильник 100 мл води дистильованої, перемішують і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7. Приготування і стерилізація поживних середовищ

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

ДР 7.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На терезах зважують 43,2 г глюкози і 1,44 г дріжджового екстракту. Наважку переносять у колбу на 1 л, додають за допомогою мірного циліндру 500 мл води питної, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

ДР 7.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На аналітичних вагах зважують 0,144 г MgSO_4 і 0,0007 г MnSO_4 . Наважки переносять у колбу на 500 мл, за допомогою мірного циліндру додають 100 мл води питної, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На аналітичних вагах зважують 0,072 г KH_2PO_4 і 0,144 г NaH_2PO_4 . Наважки переносять у колбу на 500 мл, за допомогою мірного циліндру додають 120 л води питної, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.1.4. Змішування композицій А, Б, В

У колбу об'ємом 1000 мл в асептичних умовах зливають простерилізовані композиції А (від ДР 5.1.1), Б (від ДР 5.1.2) і В (від ДР 5.1.3). Після завершення процесу здійснюють мікробіологічний контроль.

ДР 7.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 15 л

ДР 7.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 432,0 г глюкози і 14,4 г дріжджового екстракту. Наважку переносять у реактор-змішувач (РЗ-17) на 10 л, додають через лічильник 4,8 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40 С. Отриманий розчин перекачують насосом у інокулятор (І-19) об'ємом 15 л і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

ДР 7.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 1,44 г $MgSO_4$ і 0,072 г $MnSO_4$. Наважки переносять у колбу на 2 л, за допомогою мірного циліндру додають 1,0 л води питної, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 0,72 г KH_2PO_4 і 1,44 г NaH_2PO_4 . Наважки переносять у колбу на 2 л, за допомогою мірного циліндру додають 1,0 л води питної, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 160 л

ДР 7.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 4,28 кг глюкози і 142,68 г дріжджового екстракту. Наважку переносять у реактор-змішувач (РЗ-32) на 100 л, додають через лічильник 62,8 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40 С. Отриманий розчин перекачують насосом (ВН-13) у інокулятор (І-43) об'ємом 100 л і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

ДР 7.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 14,26 г $MgSO_4$ і 71,34 г $MnSO_4$. Наважки переносять у колбу на 2 л, за допомогою мірного циліндру додають 1,0 л води питної, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 7,13 г KH_2PO_4 і 14,26 г NaH_2PO_4 . Наважки переносять у колбу на 2 л, за допомогою мірного циліндру додають 1,34 л води питної, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 1,25 м³

ДР 7.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 36,06 кг глюкози і 1,2 кг дріжджового екстракту. Наважки переносять у реактор-змішувач (РЗ-43) на 1000 л, додають через лічильник 543,0 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40 °С. Отриманий розчин перекачують відцентровим насосом (ВН-17) у посівний апарат (ПА-45) об'ємом 1,25 м³ і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

ДР 7.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 120,2 г $MgSO_4$ і 6,01 г $MnSO_4$. Наважки переносять у колбу на 2 л, за допомогою мірного циліндру додають 1,0 л води питної, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.4.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 60,1 г KH_2PO_4 і 120,2 г NaH_2PO_4 . Наважки переносять у реактор-змішувач (РЗ-44) на 5 л, за допомогою мірного циліндру додають 2,8 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ТП 8. Підготовка посівного матеріалу

ТП 8.1. Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру *Aspergillus niger* СИМ M276 зберігають у пробірці на середовищі казеїн-пептоновому агарі з глюкозою [16] за температури 4 °С з пересівом 1-2 рази на місяць на свіже поживне середовище. Усі роботи із колекційною культурою проводять із дотриманням правил асептики.

ТП 8.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру *Aspergillus niger* розсівають на чашки Петрі із казеїн-пептоновим агаром з глюкозою для одержання ізольованих колоній. Вирощують у термостаті при температурі 30 °С (24 год).

ТП 8.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах

Отримані ізольовані колонії *A. niger* із чашок Петрі (від ТП 8.2) пересівають петлею у пробірки зі скошеним казеїн-пептоновим агаром з глюкозою (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). У пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування становить 24 години, температура 30 °С. Кожні 4 год із пробірок відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 8.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 1 л із стерильною композицією А (від ДР 7.1.4), додають розчин кальцію карбонату (від ДР 6.1.), перемішують і розливають по 144 мл у 5 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *A. niger* (від ТП 8.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою відбирають отриману суспензію бактерій і вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з 1 пробірки.

Культивують на качалках (500 об/хв) при температурі 33 °С упродовж 36 год і здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 8.5. Вирощування в інокуляторі об'ємом 15 л

У інокулятор (І-18) із поживним середовищем (від ДР 7.2.1), подають композиції Б і В від ДР 7.2.2 та ДР 7.2.3, вмикають перемішувачий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.1.1) рН середовища за показником датчика рН до 6,0. Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 8.4). Культивують при температурі 33 °С упродовж 36 год. Підтримання рО₂ на заданому рівні здійснюють за перемішування 500 об/хв.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 8.6. Вирощування в інокуляторі об'ємом 160 л

У інокулятор (І-42) із поживним середовищем (від ДР 7.3.1) подають композиції Б і В від ДР 7.3.2 та ДР 7.3.3, вмикають перемішувачий пристрій і доводять 20%-им розчином NaOH (від ДР 2.1.2) рН середовища за показником датчика рН до 6,0. Через трубу перетискування подають з інокулятора посівний матеріал (від ТП 8.5). Культивують при температурі 33 °С упродовж 36 год. Підтримання рО₂ на заданому рівні здійснюють за перемішування 500 об/хв.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 8.7. Вирощування в інокуляторі об'ємом 1,25 м³

У посівний апарат (ПА-45) із поживним середовищем (від ДР 7.4.1) містять композиції Б і В від ДР 7.4.2 та ДР 7.4.3, вмикають перемішувачий пристрій і доводять 20%-им розчином NaOH (від ДР 2.1.3) рН середовища за показником датчика рН до 6,0. Через трубу перетискування подають з інокулятора посівний матеріал (від ТП 8.6). Культивують при температурі 33 °С

упродовж 36 год. Підтримання pO_2 на заданому рівні здійснюють за перемішування 500 об/хв.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 9. Виробничий біосинтез

ТП 9.1. Виробничий біосинтез (отримання культуральної рідини)

У простерилізований виробничий ферментер (Ф-46) об'ємом 10 м³, подають із РЗ-16 розчин гідролізату кукурудзяних качанів (від ДР 5.4). Вмикають перемішуючий пристрій і доводять 20%-им розчином NaOH (від ДР 2.1.4) рН середовища за показником датчика рН до 6,0. Через трубу перетискування подають з інокулятора посівний матеріал (від ТП 8.7). Культивують при температурі 33 °С упродовж 72 год. Підтримання pO_2 на заданому рівні здійснюють перемішуванням 500 об/хв. Загальний час культивування складає 72 год.

Кожні 4 год із ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації глюконової кислоти (76,67 г/л).

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Протягом процесу культивування періодично (кожні 4 год) відбирають проби поживних середовищ, посівного матеріалу, культуральної рідини для мікробіологічного контролю, а також для контролю показників росту і біосинтезу: концентрації глюконової кислоти та біомаси бактерій, контролю рівня джерела вуглецю (глюкози) у середовищі.

8.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль необхідно проводити протягом усього процесу росту і біосинтезу, щоб підтвердити стерильність протягом культивування *Aspergillus niger* SHM M276.

Мікробіологічний контроль здійснюють для підтвердження стерильності поживних середовищ для вирощування інокуляту і після закінчення стерилізації середовищ для біосинтезу, а також для виявлення чужорідної мікрофлори в інокуляті та культуральній рідині. Контроль здійснюють відбором проб простерилізованого поживного середовища, яке висівають на чашки Петрі із сусло-агаром (СА) / глюкозо-картопляним агаром (ГКА) для ідентифікації дріжджів і грибів та на м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій.

Підготовка чашок Петрі. У простерилізовані чашки Петрі наливають розплавлений агар об'ємом 20 – 30 мл. Чашки залишають для рівномірного застигання поживного середовища і чекають протягом 2 – 3 діб за температури 30 °С перевернутими кришками донизу.

Посів здійснюють стерильною піпеткою, відбираючи 0,1 мл від об'єму проби і наносять суспензію на поверхню обраного агаризованого поживного середовища. Суспензію рівномірно розмазують на поверхні середовища за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або стерильного шпателя Дригальського. Чашки інкубують у термостаті при 28 – 30 °С протягом 1 – 2 діб (МПА) та 24 – 26 °С протягом 3 – 5 діб (СА або ГКА) [55].

					НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тимченко А. Р.			РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.								63
Керівник		Ковшар І.Д.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

Після закінчення часу інкубації чашки досліджують на наявність сторонньої мікрофлори. На чашках із посівами інокуляту культуральної рідини мають бути ідентифіковані виключно колонії *A. niger* і не має бути сторонньої мікробіоти (рис. 8.1).

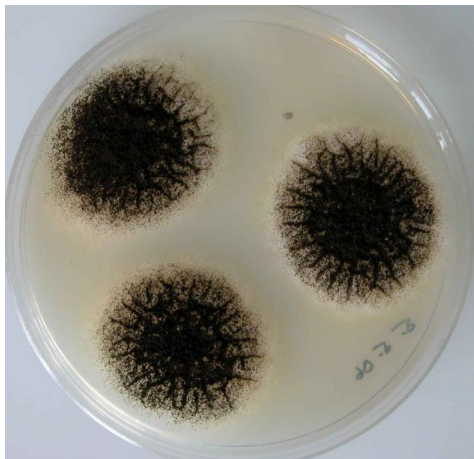


Рис. 8.1. Колонії *A. niger* на чашці із глюкозо-картопляним агаром [56]

У світловому мікроскопі мікроскопіюють клітини *Aspergillus niger*. В асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять 10 мкл культуральної рідини на предметне скло. Краплю, яка містить клітини мікроорганізму, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (мазком близько 1 см). Мазок сушать при кімнатній температурі до повного випаровування вологи.

За відсутності у зразку контамінації під час мікроскопіювання можна побачити клітини *A. niger* (рис 8.2). Клітини можуть утворювати септований міцелій та одноклітинні, кулястої форми конідієносії. Голівка конідієносія нагадує кульбабу.

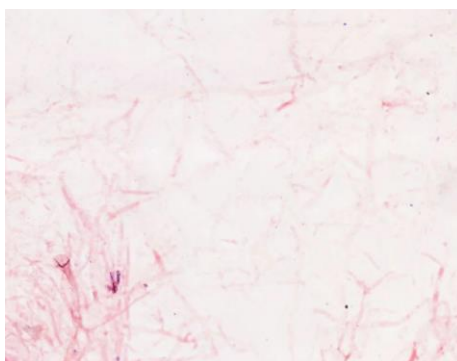


Рис. 8.2. Клітини *A. niger* у світловому мікроскопі [56]

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.2.1. Визначення концентрації біомаси бактерій

Концентрацію біомаси вимірюють за допомогою аналізу маси сухих клітин. Культуральну рідну фільтрують через целюлозний фільтрувальний папір Whatman № 1 (пористість 11 мкм), попередньо висушений протягом 24 h при 105 °С. Нерозчинні зважені речовини (НЗР), що зберігалися на фільтрі, сушили протягом 24 годин у духовці при 105 °С і отриману суху масу зважували для визначення концентрації завислих речовин. Таким чином, суха маса містить грибкову біомасу, утворену під час росту *A. niger*, а також початкову суспендовану дріжджову біомасу, що містилася в необроблених твердих відходах. Біомасу грибів оцінювали шляхом віднімання загальної кількості НЗР із загальної маси, зібраної на фільтрі [57].

8.2.2. Визначення концентрації глюконової кислоти

Відібрали проби культуральної рідини, що центрифугували при 13000 об/хв, протягом 5 хвилин з подальшою фільтрацією через фільтри 0,22 лм перед аналізом. Глюконову кислоту аналізували за допомогою ВЕРХ (LC-20АТ, UV/VIS детектор SPD-20А, Shimadzu, Kyoto, Japan) з колонкою Aminex HРХ-87Н (Bio-rad, Hercules, CA, США) при 55°С з використанням рухомої фази 5ММ Н₂SO₄ зі швидкістю 0,4 мл/хв і довжиною хвилі детектування 210 нм [10].

8.2.3. Визначення концентрації джерела вуглецю (глюкози) у середовищі

Відібрали проби культуральної рідини, що центрифугували при 13000 об/хв, протягом 5 хвилин з подальшою фільтрацією через фільтри 0,22 лм перед аналізом.

Визначали кількість глюкози в зразку за допомогою біосенсора. Тести проводили в трьох примірниках, а результати представляли як середнє значення та стандартне відхилення. Операції полягали в заповненні реакційної

камери, що містить іммобілізовані ферменти, розчином субстрату. Роблять ін'єкції 20 мкл зразку і залишають тривати протягом 10 хвилин. Далі відкривався вихідний клапан, і утворений продукт перекачувався в систему виявлення.

Система працює при кімнатній температурі. Операції полягали в заповненні реакційної камери, що містить іммобілізовані ферменти, розчином субстрату (поліаніліну), активованого 2,5% (об./об.) розчином глутаральдегіду зі зворотним холодильником протягом 2 годин. Після ретельного промивання 0,1 моль/л фосфатним буфером, рН 6,0, порошок висушували під динамічним вакуумом і зберігали при кімнатній температурі до використання для іммобілізації ферментів [58].

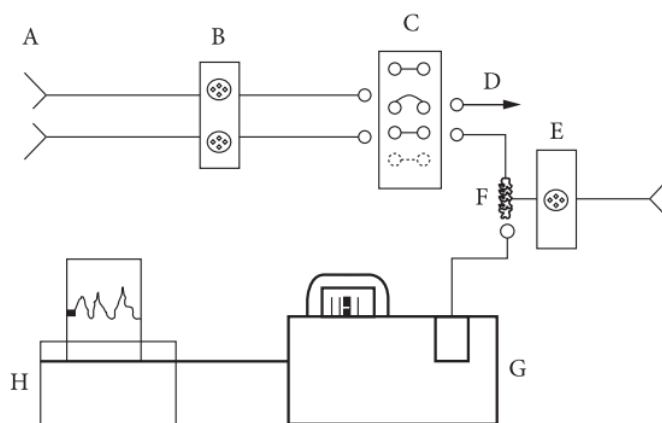


Рис. 8.3. Біосенсор для визначення глюкози. А: субстрат або буфер введення; В: насос; С: комутаційний клапан; D: вихід підкладки або буфера; Е: повітряний насос; F: реакційна камера; G: спектрофотометр; Н: пристрій для запису.

20 мкл ін'єкцій зразків глюкози (0,05 до 6,0 мг/мл) запустили реакції, які залишили тривати протягом 10 хвилин. Далі відкривався вихідний клапан, і утворений продукт перекачувався в систему виявлення. Час перебування тестували від 1 до 30 хвилин. Тільки вимірювання вище 0,4 ЕУ вважалися для встановлення нижньої межі виявлення. Показання нижче цього значення вважалися шумом. Робочу стабільність біосенсора перевіряли послідовними ін'єкціями зразків глюкози з наступними промиваннями з фосфатним буфером [58].

Дані щодо проведення постадійного контролю виробництва глюконової кислоти *Aspergillus niger* SIIM M276 наведено у табл. 8.1.

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю виробництва глюконової кислоти

Номер позиції (контрольної точки) та її назва	Об'єкт, обраний для контролю та показник	Засоби та методики контролю	Періодичність здійснення контролю та відбору аналізованих проб	Нормоване значення показника контрольованого об'єкту
1	2	3	4	5
Кт 1.1 <i>Забір атмосферного повітря</i>	Повітрязабірник Висота забору повітря	-	Під час купівлі та при встановленні	H = 13 м
Кт 1.2 <i>Очистка від грубих домішок</i>	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через фільтр грубої очистки	E = 90%
Кт 1.3 <i>Стиснення повітря</i>	Стиснене повітря Тиск, температура	Манометр, термометр	Після компресування	P = 0,35-0,5 МПа, t = 120-250°C
Кт 1.4 <i>Охолодження і видалення зайвої вологи</i>	Охоложене повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	t = 25-35°C, W = 60%
Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після нагрівання	t = 40-50°C, W = 50%
Кт 1.6 <i>Очищення у головному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через головний фільтр	E = 95%
Кт, Км 1.7 <i>Очищення в індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження через індивідуальний фільтр	E = 99,999%, КУО - 0

Кт, Кх, Км 2.1.4 <i>Приготування і стерилізація 20%-го розчину натрію гідроксиду для підлужнення середовища у ферментері об'ємом 10,0 м³</i>	Розчин натрію гідроксиду Тиск, температура, час, концентрація, асептичність	Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °C τ = 40 хв, C = 6%, відсутність мікробіоти
Кт, Кх 3.1 <i>Підготовка 2,5 % розчину сульфатної кислоти</i>	Підживлювальний розчин сульфатної кислоти концентрація	концентрація	визначення концентрації після завершення стерилізації	C = 2,5%,
Кт, Кх, Км 4.1 <i>Приготування цитратного буферу.</i>	Цитратний буфер Тиск, температура, час, асептичність	Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °C τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Кх 5.2 <i>Ферментний гідроліз</i>	Утворення гідролізату температура, час	датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод	Тривалість, температура визначають безперервно	t = 50 °C τ = 48 год
Кт 5.3 <i>Центрифугування</i>	Очищення гідролізату	годинник, фізико-хімічний метод	Тривалість визначають безперервно	n = 10000 τ = 10 хв
Кт, Кх, Км 5.4 <i>Стерилізація розчину гідролізату кукурудзяних качанів</i>	Розчин гідролізату Тиск, температура, час, концентрація, асептичність	Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	P = 0,05 МПа, t = 112 °C τ = 20-30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 6.1. <i>Приготування і стерилізація розчину кальцію карбонату для інокулятора об'ємом 10 м³</i>	Розчин кальцію карбонату Тиск, температура, час, асептичність	Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод,	Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °C τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

Кт, Км 7.1.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках (композиція А)</i>	Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $t = 112$ °С $\tau = 20-30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.1.2 і 7.1.3 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках (композиція Б і В)</i>	Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.2.1, 7.3.1 <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ для інокулятора об'ємом 10 і 100 л (композиція А)</i>	Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $t = 112$ °С $\tau = 20-30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.2.2, 7.2.3, 7.3.2, 7.3.3 <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ для інокулятора об'ємом 10 і 100 л (композиція Б і В)</i>	Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.4.1 <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ для інокулятора об'ємом 1,0 м³ (Композиція А)</i>	Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $t = 112$ °С $\tau = 20-30$ хв, відсутність мікробіоти

Кт, Км 7.4.2, 7.4.3 <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ для інокулятора об'ємом 1,0 м³ (Композиція Б і В)</i>	Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	P = 0,05 МПа, t = 131°C τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 8.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>Aspergillus niger</i> SHM M276 температура, час, мікробіологічна чистота	Холодильник, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожні 3-4 місяці	t = 2 – 4 °С, τ = 3 – 4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 8.2 <i>Одержання робочої культури</i>	Робоча культура <i>Aspergillus niger</i> SHM M276 на чашках Петрі температура, час, мікробіологічна чистота	Термостат, мікробіологічний контроль	Температура контролюється під час вирощування безперервно, а після вирощування – мікробіологічний контроль	t = 30 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 8.3 <i>Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах</i>	Робоча культура <i>Aspergillus niger</i> SHM M276 у пробірках температура, час, мікробіологічна чистота	Термостат, мікробіологічний контроль	Температура контролюється під час вирощування безперервно, а після вирощування – мікробіологічний контроль	t = 30 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 8.4 <i>Вирощування інокуляту у колбах на качалках</i>	Посівний матеріал температура, час, частота обертів мішалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, спектрофотометр, мікробіологічний контроль	Температура і частота обертів контролюється під час вирощування безперервно, а після вирощування – мікробіологічний контроль та визначення концентрації біомаси	t = 33 °С, τ = 36 год, w = 500 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл. 8.1

<p>Кт, Км 8.5, 8.6, 8.7 <i>Вирощування інокуляту у посівних апаратах об'ємом 10, 100 л і 1,0 м³</i></p>	<p>Посівний матеріал температура, час, рН, частота обертів мішалки, частота розчиненого кисню, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури, рО₂ і рН, годинник, тахометр, ротаметр, спектрофотометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, концентрація кисню і частота обертів мішалки контролюється під час вирощування продуцента безперервно, а після вирощування – мікробіологічний контроль (також кожні 4 год) та визначення концентрації біомаси</p>	<p>t = 33 °С, τ = 36 год, рН = 6,0, w = 500 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 9.1 <i>Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10,0 м³</i></p>	<p>Культуральна рідина температура, час, рН, частота обертів мішалки, частота розчиненого кисню, концентрація біомаси і рибофлавіну, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури, рО₂ і рН, годинник, тахометр, ротаметр, центрифуга, спектрофотометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, концентрація кисню і частота обертів мішалки контролюється під час вирощування продуцента безперервно, а після вирощування і кожні 4 год – мікробіологічний контроль та визначення концентрації біомаси та рибофлавіну</p>	<p>t = 33 °С, τ = 72 год, рН = 5,9 – 6,1, w = 500 об/хв, Ср = 76,67 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

РОЗДІЛ 9 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва глюконової кислоти на місяця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Промислове виробництво глюконової кислоти штамом *Aspergillus niger* СИМ М276 включає в себе 1) допоміжні стадії:

- приготування миючих і дезинфікуючих розчинів;
- приготування та стерилізація розчинів титрувальних агентів;
- приготування 2,5 % розчину сульфатної кислоти;
- приготування цитратного буферу;
- приготування розчину гідролізату кукурудзяних качанів
- ферментний гідроліз;
- центрифугування;
- фільтрація розчину гідролізату кукурудзяних качанів;
- стерилізація розчину гідролізату кукурудзяних качанів;
- приготування і стерилізація розчину кальцію карбонату для інокулятора об'ємом 10 м³;
- приготування і стерилізація композицій поживних середовищ для вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу

і 2) виробничі стадії:

- підготовка посівного матеріалу;
- біосинтез глюконової кислоти .

У табл. 9.1 класифіковано утворення різних видів відходів під час виробництва глюконової кислоти.

					НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ			72
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Тимченко А.Р.						
Консульт.								
Керівник		Ковшар І.Д.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

Етапи утворення відходів під час глюконової кислоти

Етап утворення відходів		Тип і характеристика утворюваних відходів
Допоміжні стадії	приготування робочих розчинів миючих та дезінфікуючих засобів	Мийний / дезінфікуючий засоби PRIMA МК та НОВОХЛОП-ЕКСТРА після використання і промивна вода, що містить залишки цих засобів, потрапляють у каналізаційні стоки. Пластикові ємності від цих засобів сортуються і відправляються у пункти переробку пластику.
	приготування і стерилізація розчинів титрувальних агентів	6%-го розчини соляної кислоти і натрію гідроксиду використовуються як регулятори рН, тому рідких відходів не утворюється. 2,5 % розчин сульфатної кислоти і розчин кальцію карбонату повністю витрачаються на кислотний гідроліз та вирощування інокуляту/біосинтез відповідно. Дані розчини можуть стати відходами тільки у разі відхилення від заданої концентрації або контамінації. Пластикові ємності відправляються у пункти переробку пластику.
	підготовка 2,5 % розчину сульфатної кислоти	
	приготування цитратного буферу	
	приготування і стерилізація розчину кальцію карбонату для інокулятора об'ємом	
	центрифугування	Тверді відходи – у вигляді нерозчинних частинок після приготування гідролізату кукурудзяних качанів. Оскільки це частинки органічного походження, вони можуть безпечно утилізовані разом із іншим органічним сміттям.
	приготування розчину гідролізату кукурудзяних качанів	У випадку невідповідності режиму стерилізації можуть утворитися рідкі відходи. Тверді відходи утворюються у випадку відбраковки сировини групою вхідного контролю. Пластикові ємності відправляються у пункти переробку пластику.
	фільтрація розчину гідролізату кукурудзяних качанів	
стерилізація розчину гідролізату кукурудзяних качанів		
Приготування і стерилізація композицій поживних середовищ для вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу		
Виробничі стадії	Підготовка посівного	

	<p>матеріалу</p> <p>Біосинтез глюконової кислоти</p>	<p>Газоподібні відходи. Утворюються значні об'єми відпрацьованого повітря, оскільки для росту і біосинтезу клітинам <i>Aspergillus niger</i> необхідне очищене повітря. Газоподібні відходи пропонується використовувати повторно після очистки аби знизити навантаження на сичтєму вентиляції і конфдиціювання та зекономити. Культуральна рідина надходять на наступну стадію вирощування або після біосинтезу в збірник, тому рідких відходів не утворюється.</p>
--	--	--

9.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва глюконової кислоти

9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.

Виробництво бета-галактози охоплює 220 днів. Для чистоти виробничих приміщень підлога миється щодня (220 разів). Генеральне прибирання виконується вічі на місяць (оброблюються стіни, підлога, вікна). Обладнання обробляють робочим розчином *ДЕЗЕКОН ОМ*, у кількості 2 365 200 л, а для обробки стін/підлоги/вікон і дверей – робочий розчин *НОВОХЛОП-ЕКСТРА*, в кількості 5328 л.

Таблиця 9.2

Характеристика рідких відходів виробництва бета-галактозидази

Назва рідких відходів	Склад відходів	Об'єм відходів на 1 цикл виробництва, л	Клас небезпеки
0,8 % <i>ДЕЗЕКОН ОМ</i>	дидецилдиметиламоніум хлориду, амі-нопропільдодецилпропандіамін, полігексаметиленбігуа-нід гідрохлорид	2 365 200	IV
0,25 % <i>НОВОХЛОП-ЕКСТРА</i>	гіпохлорид натрію	5328	III
	Усього:	2 370 528	

Для очищення розрахованого об'єму стічних вод пропонується обрати установку біологічної очистки стічних вод, яка складається із корпусу із каналами підведення та відведення рідини та послідовно розміщеними у вигляді переливного каскаду, блоків анаеробного біореактора, аеробного біореактора, біореактора доочищення, при цьому блок анаеробного біореактора та блок біореактора доочищення забезпечені носіями прикріпленої мікрофлори, пристроїв рециркуляції активного мулу між блоками.

Послідовне застосування принаймні двох аеробних реакторів забезпечує процес якісної глибокої біологічної очистки стічних вод. А виконання анаеробного біореактора, відповідно до корисної моделі, дозволить забезпечити постійне перемішування рідини (суміші активного мулу і стічних вод) при надходженні різних по своєму складу стічних вод. При цьому в анаеробному біореакторі відбувається постійне усереднення стічних вод, їх подрібнення великобульбашковим аератором та попередня очистка з використанням носіїв прикріпленої мікрофлори. Це знижує навантаження на адаптацію активного мулу до нерівномірності по часу і складу стічних вод, що надходять, та нівелює нерівномірність навантаження на активний мул в наступній зоні очищення (аеробному біореакторі). Крім цього, перемішування сприяє постійному перебуванню суміші активного мулу і стічних вод у завислому стані, що мінімізує осад мулу на дно камер.

Виконання корпусу у вигляді переливного каскаду дозволить установці працювати як багатосекційний переливної анаеробний септик, що в разі відсутності електроенергії забезпечить очистку стічних вод і видалення очищеної води без ризику затоплення установки в цілому і виносу активного і поверхневого мулу разом зі стічними водами. Крім цього, наявність в аеробній камері зони попереднього відстоювання, виключає ризик вимивання активного і поверхневого мулу при різкій або залповій подачі стічних вод.

Установка для біологічної очистки стічних вод працює наступним чином. Побутові або господарські стічні води через канал підведення 2 потрапляють до камери 5 блока анаеробного біореактора, в якій за допомогою встановленої корзини-уловлювача 7 відокремлюються нерозчинні відходи, які регулярно видаляють та утилізують. Крім цього, камера 5 забезпечена великобульбашковим аератором 8, який виконує функцію подрібнення і перемішування стічних вод, що надішли, і зворотного активного мулу із камер 10, 11 аеробного біореактора при рециркуляції. При надходженні нової порції стічних вод,

попередньо очищені і змішані зі зворотним активним мулом стоки через, наприклад, придонний канал 4 з камери 5 перетікають в камеру 6, в якій встановлено носій прикріпленої мікрофлори 9. У фазі аерації в камерах 10, 11 аеробного біореактора між камерами 5 та 6 відбувається перемішування стічних вод, що надійшли, та зворотного активного мулу, з підтриманням суміші у завислому стані, що максимально усереднює концентрацію стічних вод, які надійшли на установку, і мінімізує можливість донних відкладень.

Усереднені та попередньо очищені стічні води із камери 6 блока анаеробної очистки шляхом перетікання надходять до першої 10 із послідовно розміщених камер блока аеробного біореактора, в якій в режимі примусової неперервної або переривчастої аерації (відповідно до з.п.ф. 2) та одночасної рециркуляції пристроями 17 активного мулу із камери 10 до камери 5 або камери 6 блока анаеробного біореактора, відбувається основне біологічне очищення стічних вод. Далі стічні води надходять до наступної послідовно розміщеної камери для доочищення за тим же принципом - неперервної або переривчастої аерації та рециркуляції активного мулу. При цьому, після надходження суміші стічних вод до останньої камери 11 блока аеробного біореактора, у всіх попередніх камерах встановлюється однаковий рівень рідини, різниця обсягу якого між рівнем води і рівнем переливних отворів забезпечує необхідний обсяг для прийняття залпового скиду стічних вод, та настає фаза денітрифікації, при якій в усіх камерах припиняється аерація та рециркуляція активного мулу. Після завершення очищення, в останній послідовно розміщеній камері (на кресленні - це камера 11), аерацію припиняють, а очищену воду відстоюють в зоні попереднього відстоювання 13, обмеженій щонайменшу одним похилим ребром 14. Очищена та попередньо відстояна рідина будь-яким відомим засобом (переливанням або примусовими засобами 18) переміщується в камеру блока біореактора доочищення 15, в якій, за рахунок проходження очищеної води через носії прикріпленої мікрофлори 16, відбувається фінішне біологічне доочищення води та подальше виведення освітленої

та очищеної води через канал відведення 3. Переміщення відстояної рідини із камери 11 блока аеробного біореактора до камери біореактора доочищення обмежується мінімально встановленим рівнем залишку рідини в камері 11 [59].

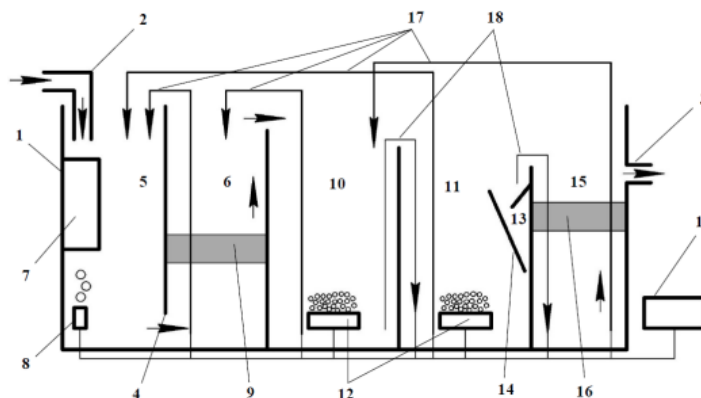


Рис. 9.1 Установа очищення стічних вод

1 - корпус, 2 - канал підведення стічних вод, 3 - канал відведення очищеної рідини, 4 - придонний канал, 5, 6 - камери. 7 - корзина-уловлювач 8 - великобульбашковий аератор 9 - носій прикріпленої мікрофлори, 10, 11 - камери блоку аеробного біореактора, 12 – аератор, 13 - зона попереднього відстоювання, 14 - похиле ребро, 15 - блок біореактора доочищення, 16 - носій прикріпленої мікрофлори, 17 - пристрій рециркуляції активного мулу, 18 - примусові засоби послідовної подачі рідини, 19 - програмно-апаратний модуль.

9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Після використання мийних / дезінфікуючих засобів, приготування титрувальних агентів і компонентів кислотного гідролізу кукурудзяних качанів, а також приготування поживних середовищ, залишаються тверді відходи у вигляді пластику різних типів.

Таблиця 9.3

Характеристика твердих відходів виробництва

Назва твердих відходів	Тип пластику	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, кг	Клас небезпеки
Пластикова тара	Поліпропілен	2,0	IV
Упаковка складових поживного середовища	Полівінілхлорид, поліпропілен, поліетилен	1,0	IV
	Усього:	3,0	

Всю пластикову тару, що залишилась на прикінці циклу виробництва глюконової кислоти сортують, і відправляються до спеціалізованих пунктів переробки вторинної сировини.

9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Газоподібні відходи, що утворилися під час і після вирощування інокуляту / біосинтезу глюконової кислоти складаються із вуглекислого газу і аерозольних часточок.

Тривалість вирощування інокуляту в складає 3х36 годин (3х2160 хв), біосинтезу – 72 год (4320 хв). Швидкість подачі стерильного повітря для підтримання аеробних умов культивування складає 1 л/л КР·хв. Для 3 інокуляторів на 15 л, 160 л, 1250 л і ферментеру об'ємом 10 м³, приблизний об'єм відпрацьованого повітря складає: $15 \times 2160 + 160 \times 2160 + 1250 \times 2160 + 10000 \times 4320 = 32400 + 345\,600 + 2\,700\,000 + 43\,200\,000 = 46\,278\,000$ л (46278,0 м³).

Коли починає обертатися мотор 5, відсік очищення повітря 30, сполучений із мотором 5 валом 7, також починає обертатися. Після того як відсік очищення повітря 30 набере певні обороти, на внутрішній поверхні зовнішнього корпусу 31 кожної ступені очищення 34, всередині відсіку очищення повітря 30 за рахунок впливу відцентрової сили утворюється фільтруюча плівка з рідини 53. В той же час, обертання лопатевого колеса 23, яке розташоване на виступаючій частині внутрішньої системи 33, створює перепад тиску між тиском повітря у відсіку очищення повітря 30 і тиском навколишнього середовища. Завдяки перепаду тиску забруднене повітря входить в камеру подачі забрудненого повітря 11 через повітрязабірний відсік 10 і проходить через вхід для забрудненого повітря 13. Після чого забруднене повітря проходить через вхід для забрудненого повітря 15 і попадає в відсік очищення повітря 30. Забруднене повітря, яке поступає в відсік очищення повітря 30, проходить через впускні отвори 45 і поступає в камеру очищення 51 однієї із ступіней очищення 34 відсіку очищення повітря 30, де забруднене

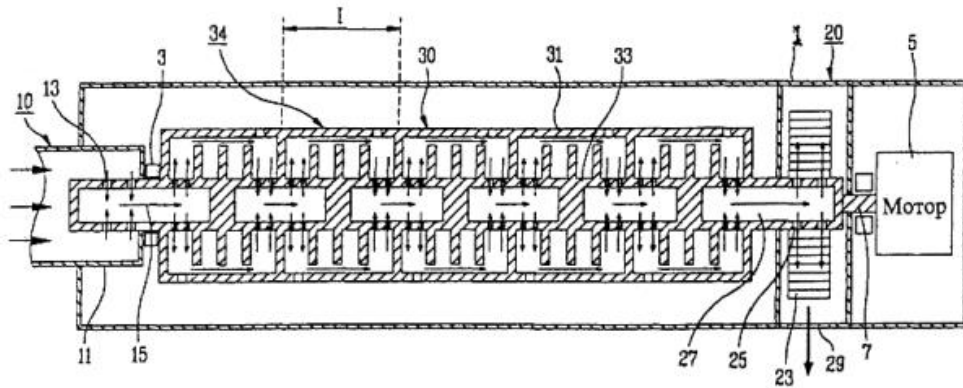
повітря очищується за рахунок прямого контакту з фільтруючою плівкою з рідини 53.

Вода (H₂O), що є основним компонентом рідини, поглинає тверді речовини, такі як, наприклад, пил і частинки, які містяться в забрудненому повітрі. Система очищення по винаходу проста і недорога в експлуатації, оскільки в ній використовується легкодоступна вода (H₂O), яка є основним компонентом рідини, і тільки невелика кількість хімічних речовин при необхідності.

Виступаючі кільця 43, які мають таку висоту, щоб камера очищення 51 не перекривалася ними, розміщені всередині камери очищення 51. Кожне з виступаючих кілець 43 проходить в радіальному напрямку. Виступаючі кільця 43 утворюють прямий канал між впускними отворами 45 і фільтруючою плівкою з рідини 53, по якому проходить потік забрудненого повітря, який входить через впускні отвори 45 і безпосередньо контактує з фільтруючою плівкою з рідини 53, що знаходиться всередині камери очищення 51. Радіальні кільця 43 на внутрішній системі 33 утворюють також канал вздовж фільтруючої плівки з рідини 53, по якому потік забрудненого повітря проходить таким чином, що він знаходиться в постійному контакті з фільтруючою плівкою з рідини 53 всередині камери очищення 51. В результаті забруднене повітря ретельно і повністю очищується в камері очищення 51.

Оброблене повітря, яке було очищене в одній із ступіней очищення, як описано вище, поступає у внутрішній перепускний канал 49 через випускні отвори 47, після чого прямує в наступну ступінь очищення 34 через впускні отвори 45 наступної ступені очищення 34 для подальшого очищення. По мірі проходження забрудненого повітря через ряд ступіней очищення 34 і передавальних ступіней з повітря віддаляються забруднення і воно очищується. Очищене повітря виходить через випускні отвори 47, розташовані в останньої ступені очищення 34 відсіку очищення повітря 30, і досягає вихідного каналу для передачі очищеного повітря 27. Очищене повітря, яке виходить з випускних

отворів однієї з ступіней очищення, проходить через вихідний канал для передачі очищеного повітря 27, вихід для очищеного повітря 25 і лопатеве колесо 23. Після чого очищене повітря поступає в навколишнє середовище через кінцевий вихід 29 для очищеного повітря або забирається за допомогою притоchno-вентиляційної системи [60].



Фиг.1

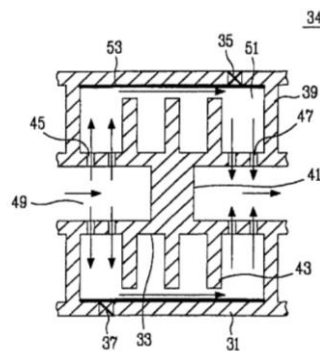


Рис. 9.2 Установка очищення відпрацьованого повітря

1 - зовнішній кожух 5 - мотор 10 - повітрязабірний відсік 11 - камера подачі забрудненого повітря 13 - вхід для забрудненого повітря 15 - вхідний канал для передачі забрудненого повітря 20 - повітровипускний відсік 23 - лопатеве колесо 25 - вихід для очищеного повітря 27 - вихідний канал для передачі очищеного повітря 30 - відсік очищення повітря 31 - зовнішній корпус 33 - внутрішня система 34 - ступінь очищення 35 - заливний отвір 37 - зливний отвір 39 - перша розділяюча перегородка 41 - друга розділяюча перегородка 43 - виступаючі кільця 45 - впускні отвори 47 - випускні отвори 49 - внутрішній перепускний канал 51 - камера очищення 53 - фільтруюча плівка з робочої рідини

Перелік літератури:

1. S. Anastassiadis, I. Morgunov. Gluconic Acid Production. *Recent Patents on Biotechnology*. 2007, 167-18; doi: [10.2174/187220807780809472](https://doi.org/10.2174/187220807780809472)
2. V. Singh, R. Kumar. Biotechnological production of gluconic acid: future implications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007. 713-722. doi: 10.1007/s00253-007-0851-x
3. S. Ramachandran, P. Fontanille, A. Pandey, C. Larroch. Fed-batch Production of Gluconic Acid by Terpene-treated *Aspergillus niger* Spores. *Appl Biochem Biotechnol*. 2008, 413-423. DOI 10.1007/s12010-008-8209-0
4. Yan Ma, Bing Li, Xinyue Zhang, Chao Wang, Wei Chen. Production of Gluconic Acid and Its Derivatives by Microbial Fermentation: Process Improvement Based on Integrated Routes. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2022, 1-12. doi: 10.3389/fbioe.2022.864787
5. Zhang H., Zhang J., Bao J. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. *Bioresource Technology*, 2016, 203:211-219. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.12.042
6. J. Sun, X. Lu, U. Rinas, P. Zeng. Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. *Genome Biol*. 2007, doi:10.1186/gb-2007-8-9-r182
7. T. Cairns, L. Barthel, V. Meyer. Something old, something new: challenges and developments in *Aspergillus niger* biotechnology. *Essays in biochemistry*. 2021, Volume 65, Issue 2. DOI: 10.1042/EBC20200139
8. R. W. Weber. *Aspergillus niger*. *On the cover*. 2011, Volume 107, Issue 3
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anai.2011.07.006>
9. S. Ramachandran, P. Fontanille, A. Pandey, C. Larroch. Fed-batch Production of Gluconic Acid by Terpene-treated *Aspergillus niger* Spores. *Appl Biochem Biotechnol*. 2008, 413-423. DOI 10.1007/s12010-008-8209-0

10. Hou W., Zhang M., Bao J. Cascade hydrolysis and fermentation of corn stover for production of high titer gluconic and xylonic acids. *Bioresource Technology*, 2018, 264: 395–399. doi:10.1016/j.biortech.2018.06.025.
11. S. Baker. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. *Medical Mycology September*. 2006, 17-21. DOI: 10.1080/13693780600921037
12. Taxonomy - *Aspergillus niger* [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.uniprot.org/taxonomy/425011>
13. Global Gluconic Acid Market Overview Source. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.marketresearch-future.com/reports/gluconic-acid-market-21714>
14. МАРЦІНЯК С. М. ДИСЕРТАЦІЯ КОМПЛЕКСНЕ ОРТОПЕДИЧНЕ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА ВІТАМІНД-ЗАЛЕЖНИЙ ТА ВІТАМІН-D-РЕЗИСТЕНТНИЙ РАХІТ. 2020. НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ТРАВМАТОЛОГІЇ ТА ОРТОПЕДІЇ НАМН УКРАЇНИ"
15. ПРОФІЛАКТИКА ТА ЛІКУВАННЯ АЛІМЕНТАРНОГО РАХІТУ. КЛІНІЧНА НАСТАНОВА МОЗ, ЗАСНОВАНА НА ДОКАЗАХ, 2023. МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО «ДЕРЖАВНИЙ ЕКСПЕРТНИЙ ЦЕНТР МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ» АСОЦІАЦІЯ ПЕДІАТРІВ УКРАЇНИ.
16. Інструкція Кальцію глюконат-Дарниця (стабілізований) розчин д/ін. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%9A%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D1%86%D0%B8%D1%8F%D0%B3%D0%BB%D1%8E%D0%BA%D0%BE%D0%BD%D0%B0%D1%82-%D0%B4%D0%B0%D1%80%D0%BD%D0%B8%D1%86%D0%B0-%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%B1%D0%B8%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D0%B8%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D0%B9/11282/>

17. Чисельність дітей та молоді в Україні на 2022 р. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://inmol.org/chyselnist-ditej-ta-molodi-v-ukraini/>
18. Державний реєстр лікарських засобів України. Кальцію глюканат <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&query=%CA%E0%EB%FC%F6%B3%FE%20%E3%EB%FE%EA%EE%ED%E0%F2>
19. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Aspergillus niger*. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/ang00010>.
20. Citrate cycle (TCA cycle) - *Aspergillus niger*. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/bsu00020>.
21. Pentose phosphate pathway - *Aspergillus niger (black aspergilli)* . [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/ang00030>.
22. Shindia A. A., EI-Sherbeny G. A., EI-Esawy A. E., Sheriff Y. M. M. M. Production of Gluconic Acid by Some Local Fungi, *Mycobiology*, 2006, 34:1, 22-29. DOI: <https://doi.org/10.4489/MYCO.2006.34.1.022>.
23. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.
24. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К. :НУХТ, 2009. – 336 с.
25. Лекція 3. Основи біотехнологічних виробництв (доповнено). [Електронний ресурс] – режим доступу: https://elib.lntu.edu.ua/sites/default/files/elib_upload/%D0%90%D0%B2%D0%B3%D1%83%D1%81%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%87/page5.html
26. Миючий засіб SUPRA SPEED [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://primaterra.ua/ua/p222462653-sredstvo-dlya-ochistki.html>
27. Миючий засіб PRIMA МК [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://primaterra.ua/ua/p613026578-sredstvo-dlya-udaleniya.html> [].
28. Дезінфікуючий засіб ДЕЗЕКОН ОМ [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-desekon-ombaltiachemi-kiev>

29. Дезінфікуючий засіб НОВОХЛОП-ЕКСТРА [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/novohlor-ekstra>
30. Повітрозабірник ВЕНТС ТТ 100. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://nikovent.com.ua/p1228862910-kanalnyj-ventilyator-vents.html?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwmt24BhDPARIsAJFYKk0UXlijGYPsT9E80umAT9HtOhrVFSPzObgkX90TmryJnB8LX7QKx6EaAlKVEALw_wcB
31. Фільтр грубої очистки повітря (панельний) [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-gruboy-ochistki-vozdruha-panelniy/>
32. Гвинтовий компресор Mast SH-8.[Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kma.ua/uk/reminnogo-privodu-/4940-gvintovij-kompresor-mast-sh-8.html>
33. DAIKIN FDXM35F9/RXM35R9.[Електронний ресурс] – режим доступу: https://daikin-market.kiev.ua/ua/daikin-fdxm35f9rxm35r.html?gclid=Cj0KCQjwmt24BhDPARIsAJFYKk1GUtMOyGcbh3u8vzHj1minP3gttBNc_j9rI11rrlUZKwa9m9dHUhwaAipeEALw_wcB&utm_source=google&utm_medium=shopping&utm_campaign=1740143197&utm_term=&utm_content=338968004333
34. Ресивер Повітряний Лідер [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tusk.ua/product/resiver-vozdushnyij-lider-16-bar-900-1-rv90081801-dlya-kompressora/?srsrtid=AfmBOoopHehtq9ECHTy9QfJyAgaxWwQysMIU0W0kh70Pa8yroLBRlRt>
35. Фільтр Alter Air F7-F9 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://shop.alterair.ua/product/panelnyye-vozdushnyye-filtry-dlya-tonkoj-ochistki-vozdruha-%28f7-f9%29/>
36. Pfaudler DIN AE Reactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.gmmpfaudler.com/uploads/files/A_Pfaudler-DIN-AE-Reactors-622-4E.pdf.
37. Реактор 15 м³ [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://prom.ua/p1417310394-reaktor-nerzhaveyushej->

stali.html?srsId=AfmBOoqpO9ZEi9lomU9C4pw0SZBmoIFPFDc8ZvQs7yxеKR
kf5V3vEqaG

38. ЦКТ 5000 літрів. [Електронний ресурс] – режим доступу:
<https://termopab.com/ckt-5000-litriv>

39. Дробарка Лан-3 [Електронний ресурс] – режим доступу:
<https://damilk.ua/ua/zernodrobilka-lan-3-chugun-dlja-zerna-i-pochatkov-kukuruzy.html>

40. Реактор 25 м³ [Електронний ресурс] – режим доступу:
<https://www.machineseeker.com.ua/m-m/i-17920371>

41. Центрифуга GNLW224FC [Електронний ресурс] – режим доступу:
<http://www.gnseparation.ru/clarifying-decanter-centrifuge>

42. ASCA 10000 L. [Електронний ресурс] – режим доступу:
<https://www.machineseeker.com.ua/asca-10000+ltr+-+stainless+steel+reactor/i-16090825>

43. Фільтр-прес COLOMBO 36 [Електронний ресурс] – режим доступу:
<https://prom-nasos.com.ua/ua/filtration/filter-presses/colombo-36-oil-ramniy-f-ltr-pres/>

44. Реактор-змішувач Comquina. [Електронний ресурс] – режим доступу:
<https://www.dosieren.net/en/products/pressure-tanks/pressure-tank-10-l-stainless-steel>

45. CATALOG-Bioreactor-System-Innova. [Електронний ресурс] – режим доступу:
<https://blanc-labo.fr/wp-content/uploads/2017/11/CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016.pdf>.

46. Санітарний індивідуальний повітряний фільтр Filson. [Електронний ресурс] – режим доступу:
<https://www.filsonfilters.com/sanitary-compressed-air-filter/>

47. Дозатор ваговий FOYER FZ-5000-II [Електронний ресурс] – режим доступу:
<https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/fz-5000-2>.

48. Насос харчовий Г2-ОПА. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://electrokom.kiev.ua/product/nasos-pishhevoj-g2-opa?srsltid=AfmBOopC-hfFhSoV9ze43cEsEvGNDLIP-6p4BQdDP9P6KDVCF3Qvp1U_.
49. Насос відцентровий LEO 3.0 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://sigma.ua/buy/nasos-ts-bezhnyu-0-55kvt-hsmax-30m-hmax-37m-qmax-20l-min-leo-3-0-775334/>
50. Інокулятор 160 л [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://comquima.com/en/reactors/used-160-liter-stainless-steel-316-reactor>
51. Реактор-змішувач Medimex HLR-5. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.foeth.com/en/reactors/stainless-steel-reactors/medimex-hlr-5-5-ltr-stainless-steel-reactor-412t1300/>
52. Посівний апарат FS-МО об'ємом 1250 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://brouwland.com/en/fermentation-vessels/829-speidel-fermentation-tank-fs-mo-1250-litres.html>
53. Ферментер HG-FJ-10000L. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.hgbeerequipment.com/products/fermentation-tank/more-than-2000l/10000L-10t-fermentation-tank.html>
54. Реактор-змішувач РА-15 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://wise-master.com/znizhki/reaktor-laboratornij-15-l-zagalnij-obyem>.
55. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
56. *Aspergillus niger*. Електронний ресурс. <https://www.gmbank.org/product-page/gmb0491>
57. Chuppa-Tostain G., Hoarau J., Watson M., Adelard L., Sing A. S. C., Caro Y., Grondin I., Bourven I., Francois J.-M., Girbal-Neuhauser E., Petit T. Production of *Aspergillus niger* biomass on sugarcane distillery wastewater: physiological aspects

and potential for biodiesel production. *Fungal Biol Biotechnol.* 2018, 5:1. doi: 10.1186/s40694-018-0045-6.

58. LOPES F. M., BATISTA K. de A., BATISTA G. L. A., FERNANDES K. F.. Biosensor for determination of glucose in real samples of beverages. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 2012. 32(1): 65-69.

59. Патент України на корисну модель № 143218. ЛОКАЛЬНА УСТАНОВКА БІОЛОГІЧНОЇ ОЧИСТКИ СТИЧНИХ ВОД / Сігорський С. В., Опубл. 10.07.2020, Бюл. № 13/2020.

60. Патент України на корисну модель № 72262. СПОСІБ (ВАРІАНТИ) І ПРИСТРІЙ РІДИННОГО ОЧИЩЕННЯ ПОВІТРЯ/ Михайлюк В. І. Опубл. 15.02.2005, бюл. № 2/2005

ДОДАТКИ

Додаток 1

