

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

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

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“01” березня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

РИТОР Ірини Анатоліївни
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи: «Одержання комплексу ферментів для природоохоронних технологій культивуванням *Geotrichum candidum*»

керівник роботи КРАСІНЬКО В.О., доцент, к.т.н.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи геометричний об'єм ферментера 63 м³, коефіцієнт заповнення становить 0,65, цільовий продукт ферменти пероксидазного комплексу, виробничий штамп *Geotrichum candidum*

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

5. Перелік графічного матеріалу технологічна схема 1 аркуш формату А2 та апаратурна схема 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Розділ 1. Характеристика цільового продукту	01.03.24-06.03.24	
	Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	07.03.24 -14.03.24	
	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування.	15.03.24 -22.03.24	
	Розділ 4. Біосинтез цільового продукту	23.03.24 -29.03.24	
	Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	01.04.24 -13.04.24	
	Розділ 6. Специфікація обладнання	14.04.24 -19.04.24	
	Розділ 7. Опис технологічної схеми	20.04.24 28.04.24	
	Розділ 8. Контроль виробничого біосинтезу	29.04.24 -12.05.24	
	Розділ 9. Обґрунтування стадій виділення і очищення	13.05.24 -17.05.24	
	Розділ 10. Екологізація виробництва целюлази	18.05.24- 28.05.24	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Ірина РИТОР _____
(ім'я та прізвище)

Вікторія КРАСІНЬКО _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Представлено проект виробництва пероксидазного комплексу ферментів для природоохоронних технологій культивуванням *Geotrichum candidum*.

У даній роботі представлена технологія виробництва пероксидазного ферментного комплексу, здійснено техніко-економічний розрахунок, а саме розраховано потребу підприємства Львівського виробництва дріжджів ЗАТ «Ензим» для обробки сягає 50 тис. тонн/рік на одну тону продукції припадає близько **20** м³ стічної води. Тривалість культивування біологічного агента становить 144 год., температура 30°C.

Технологія виробництва складається з допоміжних робіт (приготування мийних засобів: каустичної соди та хлорантоїну, підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживного середовища). Технологічний процес включає в себе 5 стадії підготовки посівного матеріалу (у коблах на качалках, інокуляторі 10л, 63л, 630л, 3600л) та виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 63м³. Тривалість культивування біологічного агента становить 144 год., температура 30°C. Обґрунтовано вибір та підібрано обладнання для здійснення післяферментаційних стадій, а саме концентрування та розлив препарату у пляшки (2, 5 та 10л).

Наведені методи визначення активності ферментів. Графічна частина роботи присвячена розробці технологічної та апаратурної схем виробництва.

Обсяг кваліфікаційної роботи – 84 сторіноки. Містить 6 рисунки, 17 таблиць, 1 схема. Робота виконана на основі 61 літературних джерел та технологічної схеми формату А2 та апаратурної схеми формату А2.

Ключові слова: *Geotrichum candidum*, стічні води, пероксидази.

ABSTRACT

A project for the production of a peroxidase complex of enzymes for environmental technologies by cultivation of *Geotrichum candidum* was presented.

This paper presents the technology for the production of peroxidase enzyme complex, a feasibility study is carried out, namely, the need of the enterprise of Lviv yeast production CJSC "Enzym" for processing reaches 50 thousand tons is calculated. tons/year per ton of products accounts for about 20 m³ of wastewater. The duration of cultivation of the biological agent is 144 hours, the temperature is 30°C.

The production technology consists of auxiliary works (preparation of detergents: caustic soda and chlorantoin, preparation of aeration air, preparation and sterilization of the nutrient medium). The technological process includes 5 stages of seed preparation (in cobbles on rolling pins, inoculators 10 L, 63 L, 630 L, 3600 L) and production biosynthesis in a fermenter with a volume of 63 m³. The duration of cultivation of the biological agent is 144 hours, the temperature is 30°C. The selection and selection of equipment for the implementation of post-fermentation stages, namely concentration and bottling of the drug (2, 5 and 10 liters) were substantiated.

Methods for determining the activity of enzymes are given. The graphic part of the work is devoted to the development of technological and hardware schemes of production.

The volume of the qualification work is 84 pages. Contains 6 figures, 17 tables, 1 diagram. The work was carried out on the basis of 61 literary sources and the technological scheme of A2 format and the hardware scheme of A2 format.

Key words: *Geotrichum candidum*, wastewater, peroxidases.

ЗМІСТ	
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСУ ФЕРМЕНТІВ	9
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ <i>GEOTRICHUM CANDIDUM</i>	12
2.1. <i>Обґрунтування вибору Geotrichum candidum та поживного середовища для його культивування</i>	12
2.3. <i>Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки Geotrichum candidum</i>	15
2.3. <i>Таксономічний статус Geotrichum candidum</i>	17
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	18
3.1 <i>Потреба у пероксидазному комплексі ферментів</i>	18
3.2. <i>Розрахунок потужності для виробництва пероксидазного комплексу</i>	20
3.3. <i>Розрахунок кількості циклів та геометричного об'єму ферментера</i>	22
3.4. <i>Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу (Geotrichum candidum)</i>	23
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ПЕРОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСУ ФЕРМЕНТІВ	27
4.1. <i>Шляхи катаболізму ростового субстрату Geotrichum candidum</i>	27
4.2. <i>Біотрансформація ростового субстрату у комплекс ферментів</i>	29
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	32
5.1. <i>Підготовка персоналу</i>	32
5.2. <i>Підготовка обладнання та інвентарю</i>	33
5.3. <i>Вибір типу ферментера</i>	34
5.4. <i>Підготовка виробничих приміщень</i>	36
5.5. <i>Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря</i>	39
5.6. <i>Попередня підготовка компонента поживного середовища</i>	42
5.7. <i>Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника</i>	42
5.8. <i>Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища</i>	42
5.8.1 <i>Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках</i>	42
5.8.2 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 10 л</i>	43
5.8.3 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 63 л</i>	44
5.8.4 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 630 л</i>	44
5.8.5 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для</i>	45

<i>культивування в інокуляторі об'ємом 6300 л</i>	45
5.8.6 Приготування та стерилізація поживного середовища для	46
<i>культивування у ферменері об'ємом 63000 л</i>	46
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	47
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	50
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	58
8.1. <i>Мікробіологічний контроль</i>	58
8.2. <i>Концентрація біомаси</i>	59
8.3. <i>Концентрація джерела вуглецю</i>	59
8.4. <i>Концентрація джерела азоту</i>	61
8.5. <i>Ферментативна активність</i>	63
8.6. <i>Карта постадійного контролю</i>	64
РОЗДІЛ 9. ОБГРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ	68
9.1. <i>Виділення та очищення субстанції цільового продукту</i>	68
9.1.1. <i>Концентрування препарату</i>	69
9.1.2. <i>Фасування готового концентрату</i>	70
9.2. <i>Розрахунок матеріальних потоків після ферментаційних процесів</i>	70
РОЗДІЛ 10. ЕКОЛОГІЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА ПЕРОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСУ ФЕРМЕНТІВ <i>GEOTRICHUM CANDIDUM</i>	72
ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА:	76

ВСТУП

Промислові скиди неочищених стоків у водойми та викиди в повітря погіршили якість води та повітря відповідно. Величезна кількість забруднюючих речовин, що утворюються в результаті промислової діяльності, становить загрозу для навколишнього середовища та екологічної рівноваги. Феноли та галогеновані феноли, поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ), хімічні речовини, що руйнують ендокринну систему (EDC), пестициди, діоксини, поліхлоровані біфеніли (ПХБ), промислові барвники та інші ксенобіотики є одними з найважливіших забруднювачів.

Пероксидази є важливими класом ферментів, які здатні каталізувати окислювальні реакції з використанням перекису водню. Це ферменти, які здатні перетворювати різноманітні сполуки за вільнорадикальним механізмом, утворюючи таким чином окислені або полімеризовані продукти. Вони відіграють важливу роль у природоохоронних технологіях, зокрема у процесах очищення води та знешкодження забруднюючих речовин. Вибір методу утилізації промислових стічних вод залежить від концентрації забруднювальних речовин, від об'ємів стічних вод, від систематичності їх утворення та від необхідного ступеня їх очистки. Очищення стічних вод дріжджового виробництва має багато варіантів залежно від технології виготовлення дріжджів (а також їх виду: харчові, хлібні, товарні).

Актуальність роботи: оскільки пероксидазне перетворення поліютантів супроводжується зниженням їх токсичності внаслідок втрати біологічної активності, зниження біодоступності, або видалення з водної фази, особливо коли забруднююча речовина знаходиться у воді, то розроблення біотехнології одержання ферментів пероксидазного комплексу для природоохоронних процесів є актуальним.

					НУХТ БТЕК 04.03.38 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ритор І. А.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					7	83
Реценз.						Кафедра БТМ 7		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Новизною кваліфікаційної роботи є розробка апаратурної та технологічної схем виробництва пероксидазних комплексів ферментів для очищення стічних вод Львівського виробництва дріжджів ЗАТ «Ензим».

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСУ ФЕРМЕНТІВ

У природоохоронних технологіях все частіше використовуються ферменти, здатні каталізувати розщеплення різних забруднюючих речовин. Зокрема, такими ферментами є марганець-залежна пероксидаза та лігнінпероксидаза.

Лігнінпероксидаза (LiP) — це гемвмісний фермент, який може окислювати ароматичні сполуки з високим редокс-потенціалом. Вона має високе окисно-відновне значення і перспективне промислове застосування завдяки своїй універсальності в деградації ксенобіотиків і сполук, які містять як фенольні, так і нефенольні компоненти.[1].

Марганець-залежна пероксидаза (MnP) належить до сімейства оксидоредуктаз, які діють на пероксид як акцептор. Каталіз MnP проходить через низку необоротних окисно-відновних реакцій, що відбуваються за механізмом пінг-понгу з кінетикою другого порядку. На першому етапі каталітичного циклу $H_2 O_2$ або органічний пероксид потрапляє в активний центр MnP. Кисень у $H_2 O_2$ зв'язується з іоном Fe(III) у кофакторі гему, утворюючи пероксидний комплекс заліза. Два електрони переходять від Fe^{3+} до пероксиду, розриваючи кисень-пероксидний зв'язок і утворюючи $H_2 O$ та Fe(IV) оксопорфіриновий радикальний комплекс (MnP Сполука I). Потім цей комплекс зв'язується з іоном Mn(II), який віддає електрон і утворює Mn(III) і MnP Сполуку II (Fe(IV) оксопорфіриновий комплекс). Далі MnP Сполука II окислює ще один іон Mn(II) до Mn(III), відновлюючись при цьому до Fe(III) у гемі та вивільняючи другу молекулу води. Існує багато відхилень від цього традиційного каталітичного циклу [2].

НУХТ БТЕК 04.03.38 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Ритор І. А.		
Перевір.		Красінько В.О.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСУ ФЕРМЕНТІВ				
		Літ.	Арк.	Акрюшів
			9	83
Кафедра БТМ 9				

Сфера застосування

Лігнінпероксидаза має перспективне застосування в біопереробці, текстильній промисловості, енергетиці, біоремедіації, косметології та дерматології [1].

Марганець-залежна пероксидаза (MnP) каталізує деполімеризацію рослинного лігніну як компонент комплексу лігнінолітичних ферментів. Вона широко застосовується в сільському господарстві та для захисту навколишнього середовища, оскільки розкладає органічні забруднювачі, такі як поліциклічні ароматичні вуглеводні, хлорфеноли, промислові барвники та нітроароматичні сполуки, що є шкідливими для здоров'я людини [3].

Фізико-хімічні властивості

MnP є мономерним білком з молекулярною масою 37 кДа та ізоелектричною точкою 3,55. Оптимальний рН для його активності коливається від 4,0 до 7,0 з піком при рН 5,5. Найбільш активний він при температурі 5–70°C, з оптимумом між 50 і 60°C. За температури вище 65°C активність ферменту швидко знижується [4]. У нативному білку гем-заліз має високоспінову, п'ятикоординатну форму та стан заліза з координатою залишку His у позиції п'ятого ліганду [5]. MnP має 5 зв'язків S–S, включаючи додатковий зв'язок Cys341–Cys348, який сприяє формуванню сайту зв'язування Mn(II) [6].

Лігнінпероксидаза є першим відкритим ферментом, що розкладає лігнін. Вона є мономерним гемопротеїном з молекулярною масою близько 40 кДа. LiP виділили з гриба *P. chrysosporium* у 1983 році, і вона може розкласти модельні сполуки лігніну та природний лігнін з деревини. LiP - це секретовані глікопротеїни з гемом як кофактором, які містять залізо, але не мідь, цинк, марганець, молібден чи кобальт. Її активність залежить від перекису водню, але високі концентрації H_2O_2 можуть бути шкідливими. Лігнінпероксидаза найчастіше зустрічається у грибів білої гнилі, таких як *P. chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta* та *Phlebia radiata*.

Завдяки своєму високому окисно-відновному потенціалу, LiP може окислювати як фенольні, так і нефенольні субструктури лігніну навіть без медіаторів, що робить її більш ефективною. Подібно до MnP, LiP утворює проміжну сполуку I та катіон-радикал оксоферилового заліза порфірину при взаємодії з H_2O_2 , завершуючи каталітичний цикл після двох послідовних одноелектронних відновлень [7].

На основі вищезазначеного можна зробити висновки, що дані ферменти одні із найпоширеніших ферментів розкладання лігніну та мають великий потенціал застосування в галузі сільського господарства, обробці стічних вод та забарвлення барвників.

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ *GEOTRICHUM CANDIDUM*

2.1. Обґрунтування вибору *Geotrichum candidum* та поживного середовища для його культивування

Geotrichum candidum можна використовувати як продуцент для добування MnP та LiP.

Пероксидази - це гемові білки, що здатні каталізувати окислення великої кількості субстратів шляхом реакції з перекисом водню [8].

У таблиці 2.1 наведена порівняльна характеристика продуцентів пероксидаз. *Geotrichum candidum* – має ряд переваг, а саме найменший час культивування (144 год), використовує дешевий склад поживного середовища, а також досягає найбільшої концентрації пероксидаз. Підсумовуючи, можна зазначити, що серед розглянутих продуцентів пероксидаз, найбільш доцільно в якості біологічного агента буде обрати *Geotrichum candidum* через найбільші показники концентрації біомаси, найменший час культивування та відносно дешевим складом поживного середовища для його культивування.

Порівняльна характеристика продуцентів, наведена в таблиці 2.1, є недостатньою. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента було проведено порівняння вартості поживних середовищ (таблиця 2.2). Дані, представлені в таблиці 2.2, показують, що середовище для культивування *Geotrichum candidum* є найдешевшим, ніж середовище для культивування *Agrocybe sp. ACCC51110* та *Pleurotus eryngii* MCC58. Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент розраховували умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3). Узагальнивши всі дані, можна зробити висновок, що доцільніше використовувати *Geotrichum candidum*. Середовище для культивування має майже найнижчу собівартість за 1 л, а саме 1,78 грн/л.

					НУХТ БТЕК 04.03.38 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ритор І. А.			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Акрівів
Перевір.		Красінько В.О.					12	83
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.						12		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Підсумовуючи можна сказати, що *Geotrichum candidum*, у порівнянні з іншими продуцентами, є більш продуктивний та перспективний, оскільки умовна вартість 1 мг є найнижчою.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів пероксидаз

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Активність пероксидаз, Од/мл	Умови культивування	Література
<i>Geotrichum candidum</i>	Стічні води від виробництва оливок Глюкоза – 5; Дріжджовий екстракт-1,08;	LiP: 0,0584; MnP: 0,078	pH 6,0 (± 0,1), 144 год, 30°C, 100 об/хв	Ayed L., Asses N., Chammem N., Hamdi M. Improvement of green table olive processing wastewater decolorization by <i>Geotrichum candidum</i> . <i>Desalination and Water Treatment</i> . 2015, 57 (37): 17322 – 17332. doi: 10.1080/19443994.2015.1084596
<i>Agrocybe</i> sp. ACCC51110	Глюкоза – 5 (в 1 л пшеничного екстракту); Солодовий екстракт – 2,5; Дріжджовий екстракт – 1; Пептон – 1	LiP: 0,382 ± 0,016; MnP: 0,627 ± 0,016	pH 7,0 (± 0,1), 168 год., 24°C, 100 об/хв	Xu J. Z., Zhang J. L., Hu K. H., Zhang W. G. The relationship between lignin peroxidase and manganese peroxidase production capacities and cultivation periods of mushrooms. <i>Microbial Biotechnology</i> . 2012, 6 (3): 241–247. doi: 10.1111/j.1751-7915.2012.00365.x.
<i>Pleurotus eryngii</i> MCC58	Абрикосові відходи – 5; NH ₄ NO ₃ – 4; K ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O – 0,75; KH ₂ PO ₄ – 0,8; Дріжджовий екстракт – 2; ZnSO ₄ · 7H ₂ O – 0,002; MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,5; FeSO ₄ · 7H ₂ O – 0,005; CuSO ₄ · 7H ₂ O – 0,02; CaCl ₂ · 2H ₂ O, 0.06; MnSO ₄ · H ₂ O – 0,05	LiP: 0,57 ± 0,015; MnP: 0,56 ± 0,015	pH 6,0 (± 0,1), 288 год., 28 ± 0,5°C, 100 об/хв	Akpınar M., Urek R. O. Extracellular ligninolytic enzymes production by <i>Pleurotus eryngii</i> on agroindustrial wastes. <i>Preparative Biochemistry and Biotechnology</i> . 2014, 44 (8): 772 – 781. doi: 10.1080/10826068.2013.867870.

**Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів
пероксидаз**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1-4)*
<i>Geotrichum candidum</i>	Глюкоза	5	98	0,49	1
	Дріжджовий екстракт Стічні води від виробництва оливок	1,08	1198	1,29	1
	Вартість 1 л середовища – 1,78 грн				
<i>Agroclybe</i> sp. АССС51110	Глюкоза	5	98	0,49	1
	Солодовий екстракт	2,5	1274	3,185	1
	Дріжджовий екстракт	1	1198	1,198	1
	Пептон	1	3600	3,6	1
Вартість 1 л середовища -8,473 грн					
<i>Pleurotus eryngii</i> МСС58	Абрикосові відходи	5	-	-	-
	NH ₄ NO ₃	4	50	0,2	3
	K ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	0,75	420	0,3	1
	KH ₂ PO ₄	0,8	43,5	0,03	2
	Дріжджовий екстракт	2	1198	2,4	1
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,002	128	0,000256	1
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	82	0,041	4
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,005	15	0,000075	1
	CuSO ₄ · 7H ₂ O	0,02	190	0,0038	1
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,06	65	0,0039	4
MnSO ₄ · H ₂ O	0,05	95	0,00475	1	
Вартість 1 л середовища – 2,98 грн					

Примітка.* - Ціни наведено станом на лютий 2023 рік.

1 - <https://prom.ua/ua/>; 2- <https://flagma.ua/uk/> ; 3- fajnij-sad.com.ua; 4- <https://www.systopt.com.ua/>.

Умовна вартість одержання пероксидаз

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація цільового продукту, ОД/мл	Умовна вартість 1 ОД цільового продукту, грн/ОД	Тривалість культивування, год	Концентрація цільового продукту утвореного за годину, ОД/год
<i>Geotrichum candidum</i>	1,78	LiP: 0,0584; MnP: 0,078	30,479 22,82	144	0,000406 0,00054
<i>Agrocybe</i> sp. ACCC51110	8,473	LiP: 0,382 MnP: 0,627	22,18 13,51	168	0,00227 0,0037
<i>Pleurotus eryngii</i> MCC58	2,98	LiP 0,57 MnP: 0,56	5,23 5,32	288	0,00198 0,001944

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки

Geotrichum candidum

Морфолого-культуральні ознаки

Колонії швидко ростуть, плоскі, від білого до кремового кольору, сухі, схожі на замшу, без зворотного пігменту. Гіфи гіалінові, септовані, розгалужені і розпадаються на ланцюжки гіалінових, гладких, одноклітинних, від субкулястих до циліндричних артроконідій. Артроконідії мають розмір 6-12 x 3-6 мкм і вивільняються шляхом відділення подвійної перегородки [9].



Рис. 2.1. Утворення артроконідій *Geotrichum candidum* [9].

Geotrichum candidum дуже швидко росте на поширених середовищах. Наагарі з солодовим екстрактом при 25 мкм розміром. Рихлі клітини, що брунькуються, і бластоспори не утворюються.

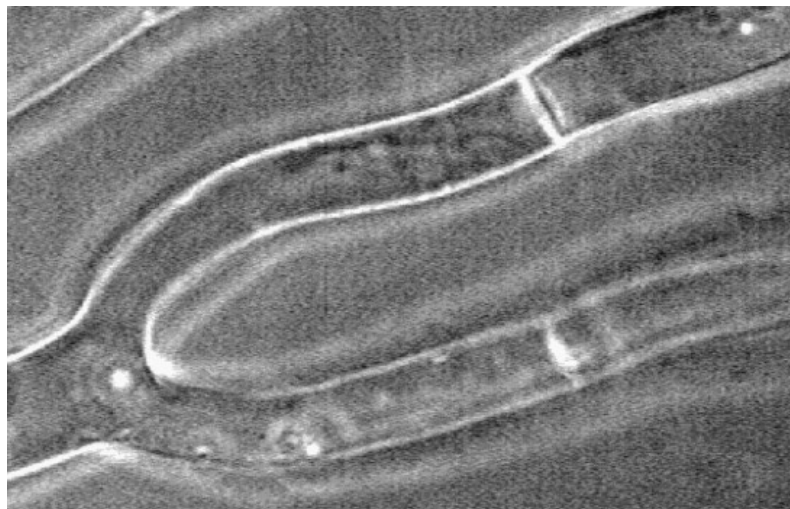


Рис.2.2. Дихотомічно розгалужені гіфи *Geotrichum candidum* після 2 днів у глюкозному бульйоні. Збільшення $\times 1000$ [10].

Види роду *Geotrichum* особливо добре характеризуються реакцією росту на d d - маніт. Порівняно з іншими дріжджами, вони можуть засвоювати лише деякі сполуки вуглецю. Здатність зброджувати цукор у *G. candidum* рідко зустрічається, за винятком слабкої або уповільненої ферментації d - глюкози або d -галактози, але бродіння лактози не відбувається.

Фізіолого-біохімічні ознаки

Geotrichum candidum росте при температурі від 5 до 38 °С; оптимальна температура становить 25 °С. Крім того, допускається широкий діапазон значень рН; значення від 5,0 до 5,5 є оптимальними. Для молочної промисловості варто відзначити низьку стійкість до солі.

Майже всі *G. candidum* -ксилоза, целобіоза , саліцин , арбутин , сорбіт та ізоляти з сирного середовища засвоюють глюкозу, галактозу , сорбозу , ксилозу та гліцерин. Лактат є хорошим джерелом вуглецю, але лактоза не метаболізується. Крім того, властива здатність рости без вітамінів *G. Candidum* [10].

2.3. Таксономічний статус *Geotrichum candidum*

- *Geotrichum candidum*

Домен: *Eukaryota*

Царство: *Fungi*

Відділ: *Ascomycota*

Підвідділ: *Saccharomycotina*

Клас: *Saccharomycetes*

Підклас: *Saccharomycetidae*

Порядок: *Saccharomycetales*

Родина: *Dipodascaceae* [11].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1 Потреба у пероксидазному комплексі ферментів

Одним із найважчих видів стічних вод для очищення є стік харчової промисловості. Це пов'язано з високим вмістом БПК та ГПК у таких водах, і як наслідок з необхідністю застосування двоступеневого біологічного очищення. Так, наприклад, стічні води дріжджового виробництва вважаються дуже багатими на органічні речовини. Крім цього вони характеризуються підвищеними концентраціями сульфатів, сполук фосфору, меланоїдів, азоту та присутністю живих клітин дріжджів. рН таких вод – кислий. Є неприємний запах [12].

Вода забруднюється цими речовинами під час виробництва дріжджів. Процес полягає в наступному: дріжджі виділяють із культурального середовища, промивають водою, згущують за допомогою сепараторів та відокремлюють від рідини на вакуум-фільтрах. Найбільша концентрація солей та дріжджових клітин міститься у стічних водах, що утворюються після сепарації [12].

Очищення стічних вод дріжджового виробництва має багато варіантів залежно від технології виготовлення дріжджів (а також їх виду: харчові, хлібні, товарні) [12].

Стічні води дріжджових заводів мають рН 4,3–5,5, містять завислі речовини 380–910 мг/дм³, характеризуються стійким темно-коричневим кольором, високою концентрацією органічних та мінеральних сполук і не задовольняють вимогам норм скидання їх у систему каналізації для подальшого очищення на очисних спорудах [13].

Загальна характеристика стічних вод підприємств харчової промисловості, які мають найбільший об'єм та рівень забрудненості, наведена в таблиці 3.1 [14].

					НУХТ БТЕК 04.03.38 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ритор І. А.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					18	83
Реценз.						Кафедра БТМ 18		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Характеристика стічних вод харчової промисловості

Підприємство	Кількість стічних вод на од.продукції, м ³ /т	БСК _{повне} , мгО ₂ /дм ³	Основний тип забруднень
М'ясокомбінати	40	1400 - 1500	Білки, жири
Молокозаводи	4,5	1200	Білки, жири
Заводи згущеного та сухого молока	3	100	Білки, вуглеводи
Сироробні заводи	4,5	2400	Білки, жири,
Цукрові заводи	2,2	3200 - 7700	Вуглеводи, білки, сапоніни
Крохмале-паточні заводи	95	2000	Вуглеводи
Олієкстракційні заводи	2,5	1600	Жири
<i>Дріжджові заводи</i>	<i>20</i>	<i>14400</i>	<i>Органічні та мінеральні сполуки</i>
Спиртові заводи	40	5000	Спирти, органічні кислоти
Консервні заводи	3	1500	Білки, жири

Шляхів вирішення проблеми стічних вод є багато, але пріоритетним має бути створення безвідходних технологій. Цей напрямок є здебільшого, напрямком майбутнього, адже впровадження таких технологій вимагає значних капіталовкладень. Крім того, абсолютно безвідходною технологія бути не може [15].

Безпосереднє скидання стічних вод у природні водойми, навіть при дотриманні санітарно-гігієнічних вимог, є небажаним. Це пов'язано як із поступовим погіршенням якості води в природних водоймах, так і з тим, що зі зміною фонового стану водного джерела для дотримання вимог ГДК необхідно буде проводити очистку промислових стічних вод [15].

Серед інших заходів щодо вирішення проблеми промислових стічних вод віддають перевагу тим, які є найбільш раціональними в економічному

розумінні. Вибір методу утилізації промислових стічних вод залежить від концентрації забруднювальних речовин, від об'ємів стічних вод, від систематичності їх утворення та від необхідного ступеня їх очистки [15].

Лігнінолітичні позаклітинні ферменти, в тому числі лігнінпероксидаза, актуальні внаслідок їх високого окисно-відновного потенціалу і перспективи промислового застосування. Перспектива застосування пероксидази лігніну охоплює такі сектори, як біопереробка, текстильна, енергетики, біоремедіації, косметології та дерматології. Літання потенціалів приписується лігнінопероксидазі через її універсальність у деградації ксенобіотики та сполуки як з фенольними, так і з нефенольними складові. Останніми роками лігнінолітичні ферменти були вивчені; дослідження лігнінпероксидази здається, хоча і відстає в порівнянні з іншими лігнінолітичними ферментами, які мають позаклітинну природу, включаючи лакказу та пероксидазу марганцю. Це твердження стає більш вираженим, коли розглядається застосування лігнінпероксидази. Деякі артикульовані застосування включають делігніфікацію сировина для виробництва етанолу, очищення текстильних стоків і знебарвлення барвників, вугільна деполімеризація та ін [16].

3.2. Розрахунок потужності для виробництва пероксидазного комплексу

Для подальшого розрахунку необхідно зрозуміти, яка необхідна кількість ферменту потрібна для оптимальної очистки стічної води дріжджового виробництва. Так згідно даних статті [17], можна зробити висновок про зменшення кількості забарвлених завислих речовин у досліджуваному розчині за використання пероксидазного комплексу ферментів. Згідно даних цієї статті для ***розкладання 382,02 мг/л субстрату необхідно було 78 Од/л ферменту.***

Оскільки, у стічній воді дріжджових заводів кількість завислих речовин коливається від 380–910 мг/дм³[13], свій подальший розрахунок вестимемо за мінімальним значенням фенольних сполук у стічній воді. Виробництво для забезпечення потреб для очистки обираємо Львівського виробника дріжджів ЗАТ «Ензим». Згідно відкритих джерел,[18] у 2004 році „Ензим збільшив обсяги виробництва на 3% до 41,3 тис. тонн. На даний час цифра річного виробництва

сягає 50 тис. тонн/рік. На одну тону продукції припадає близько 20 м^3 стічної води.

Загальна кількість стічної води на рік становить:

$$1 \text{ тонна} - 20 \text{ м}^3$$

$$50 \text{ тис. тонн} - x \text{ м}^3$$

$$X = 50 \text{ тис. тонн} \times 20 \text{ м}^3 = 1000000 \text{ м}^3 \text{ стічної води за рік виробництва}$$

Враховуючи великі об'єми для очистки, а також аналогічні ферментні засоби аналогічної дії, пропонуємо для початку забезпечити невеликий відсоток від загального об'єму, а саме **0,1%**. Тоді, об'єм стічної води, який потребує очищення становить:

$$1000000 \text{ м}^3 - 100\%$$

$$x \text{ м}^3 - 0,1 \%$$

$$X = \frac{0,1\% \times 1000000 \text{ м}^3}{100\%} = 1000 \text{ м}^3$$

Тоді, знайдемо кількість завислих речовин в 1000 м^3 стічної води:

$$1 \text{ л стічної води} - 0,00038202 \text{ кг}$$

$$1000000 \text{ л} - \text{кг}$$

$$X = 1000000 \text{ л} \times 0,00038202 \text{ кг} \approx 382 \text{ кг завислих речовин}$$

Знаючи оптимальну кількість ферменту та об'єм стічної води для очищення можемо розрахувати потребу в даному ферменті:

$$78 \text{ Од/л} - 0,00038202 \text{ кг}$$

$$x \text{ Од} - 382 \text{ кг}$$

$$X = \frac{382 \text{ кг} \times 780 \text{ Од}}{0,00038202 \text{ кг}} \approx 78000000 \text{ Од} - \text{необхідно для очистки } 1000 \text{ м}^3 \text{ стічної води}$$

Для одержання такої кількості одиниць пероксидазного комплексу ферментів об'єм культуральної рідини має становити:

$$78 \text{ Од} - 1 \text{ л}$$

$$78000000 \text{ Од} - X \text{ л}$$

$$X = \frac{78000000 \text{ Од} \times 1 \text{ л}}{78 \text{ Од}} = 1000000 \text{ л} \approx 1000 \text{ м}^3 \text{ рік}$$

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

$$V_{\text{кр.}} = 1000000 / (1 - (0,3 + 0,1)) = 1666666 \text{ л} \approx 1700 \text{ м}^3$$

Тобто, для накопичення 78000000 Од ферменту необхідно 1700м³ культуральної рідини.

3.3. Розрахунок кількості циклів та геометричного об'єму ферментера

Зважаючи на те, що отримуватимемо пероксидазний комплекс ферментів, а річний об'єм культуральної рідини дорівнює 1700м³/рік – доцільним є здійснення культивування упродовж 330 календарних днів. Весь інший час виробництво може бути переорієнтоване на випуск іншої продукції. Згідно статті, продуцент *Geotrichum candidum* досягає найбільшої концентрації ферменту (78 Од/л) [17].

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) 330, тоді кількість культуральної рідини (КР) за цикл становитиме:

$$V_d = V_{гп} / T_{рд} = 1666666 / 330 \approx 5050 \text{ л доба}$$

Кількість КР за цикл буде становити:

$$V_{кр} = V_d \times T_{цф} = 5050 \times 155 = 782750 \text{ л цикл}$$

де, $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (144 год) та час підготовки ферментера до роботи (11 год).

Тривалість підготовчих робіт та сам виробничий біосинтез складатимуть 155 год (див. *табл. 3.2*).

Таблиця 3.2.

Тривалість біосинтезу пероксидазного комплексу ферментів

Процес	Час операції, год
Мийка та огляд апарату	1,5
Перевірка на герметичність	2
Підігрів апарату	0,5
Стерилізація апарату	2
Охолодження апарату	2
Завантаження середовища	1
Засів культури	0,5
Ферментація	144
Вивантаження культуральної рідини	1,5
Разом	155

Тоді таку кількість культуральної рідини можна отримати у ферментері геометричний об'єм якого має становити:

$$V_r = V_{цк} / K_3 = 782750 / 1,3 \approx 602115 \text{ м}^3$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$K_{зф} = V_{цк}/V_{ф} = 35876 / 60000 = 0,59$, що не перевищує заданого значення.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу (*Geotrichum candidum*)

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 35876$ літрів культуральної рідини. При її одержанні потрібно враховувати втрати внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10% до 15%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб.1} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 35876 / (1 - 0,15) = 42207 \text{ л,}$$

де $E_{ф}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 42207 \text{ л}$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,6-0,7$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{ф}$), що становить

$$V_{ф} = V_{роб.1} / K_{зап} = 42207 / 0,6 = 70345 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 63000 \text{ л}$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап1} = V_{роб.1} / V_{сф} = 42207 / 63000 = 0,67.$$

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

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 42207 / (1 + 0,1) \approx 38370 \text{ л}$, де $X_{ф} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 42207 - 38370 = 3837 \text{ л.}$$

Для одержання 3837л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять

від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.2} = V_{пм1}/(1-E_{па}) = 3837/(1-0,10) \approx 4263 \text{ л.}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити $V_{пс2} = V_{роб.2}/(1+X_{па}) = 4263/(1+0,1) = 3875 \text{ л}$, де $X_{па} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 4263 - 3875 = 388 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 4263 \text{ л}$ можна одержати під час культивування дріжджів у посівному апараті

$$V_{па2} = V_{роб.2}/K_{зап} = 4263/0,6 = 7105 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} \approx 6300 \text{ л}$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з2} = V_{роб.2}/V_{сф} = 4263/6300 = 0,68.$$

Для одержання 388 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме

$$V_{роб.3} = V_{пм2}/(1-E_{ін}) = 388/(1-0,10) = 431 \text{ л.}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$V_{пс3} = V_{роб.3}/(1+X_{ін}) = 431/(1+0,1) \approx 392 \text{ л}$, де $X_{ін} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 431 - 392 = 39 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.3} = 431 \text{ л}$ можна одержати під час

культивування дріжджів в інокуляторі геометричним об'ємом:

$$V_{ін3} = V_{роб.3} / K_{зап} = 431 / 0,6 = 718 \text{ л.}$$

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

$$K_{з3} = V_{роб.3} / V_{сф} = 431 / 630 = 0,68.$$

Для одержання 39 л посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в малому інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.4} = V_{пм3} / (1 - E_{ін}) = 39 / (1 - 0,10) \approx 43,3 \text{ л.}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде становити $V_{пс4} = V_{роб.4} / (1 + X_{ін}) = 43,3 / (1 + 0,1) = 39,4 \text{ л}$, де $X_{ін} = 0,10$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить $V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 43,3 - 39,4 = 3,9 \text{ л}$.

Кількість інокуляту $V_{роб.4} = 43,3 \text{ л}$ можна одержати під час культивування дріжджів в малому інокуляторі геометричним об'ємом 63л.

$$V_{ін4} = V_{роб.4} / K_{зап} = 43,3 / 0,6 = 72,2 \text{ л.}$$

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

$$K_{з4} = V_{роб.4} / V_{сф} = 43,3 / 63 = 0,68.$$

Для одержання 3,9 л посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в малому інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.5} = V_{пм4} / (1 - E_{ін}) = 3,9 / (1 - 0,10) \approx 4,33 \text{ л.}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде становити $V_{пс5} = V_{роб.5}/(1+X_{ін}) = 4,33/(1+0,1) = 3,94$ л, де $X_{ін} = 0,10$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм5} = V_{роб.5} - V_{пс5} = 4,33 - 3,94 = 0,39 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.5} = 4,33$ л можна одержати під час культивування дріжджів в малому інокуляторі геометричним об'ємом 10л.

$$V_{ін5} = V_{роб.5}/K_{зап} = 4,33/0,6 = 7,22 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 10$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з5} = V_{роб.5}/V_{сф} = 4,33/10 = 0,43.$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{пм5} = 0,39$ л можна одержати культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$. Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме $N_{колб} = V_{пм5}/(V_{колб} \cdot K_{зк}) = 390/750 \cdot 0,2 = 2,6 \approx 3$. Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 3 качалочні колби. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу пероксидазного ферментного комплексу буде відбуватись у ферментері об'ємом 63 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у п'ять етапів.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ПЕРОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСУ

ФЕРМЕНТІВ

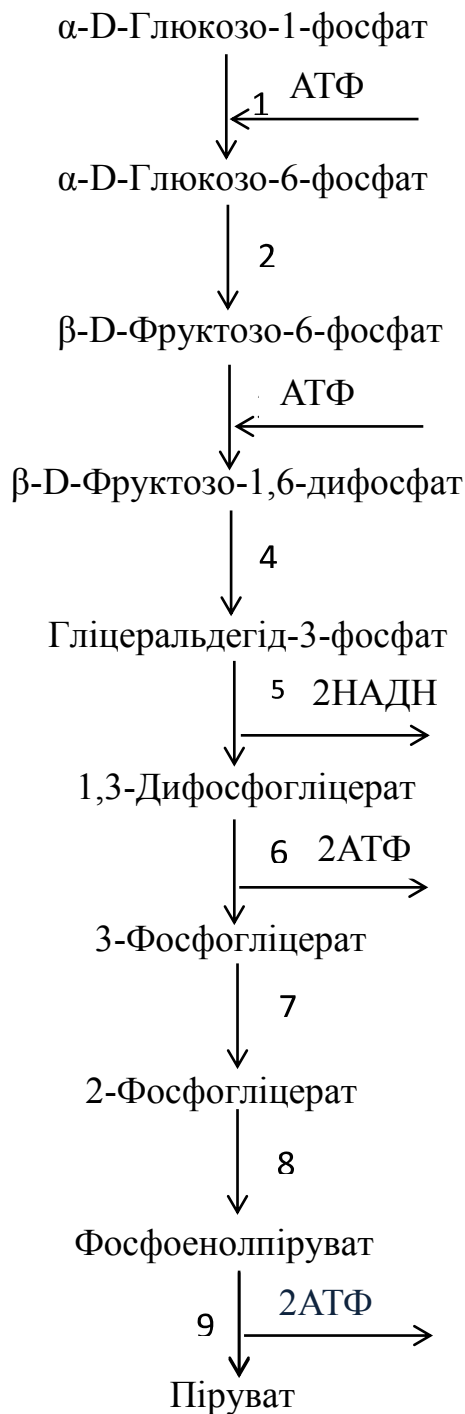
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату *Geotrichum candidum*

Джерелом вуглецю та енергії при вирощуванні *Geotrichum candidum* є глюкоза.

Оскільки, у KEGG немає штаму *Geotrichum candidum*, але мікроорганізм належить до родини *Saccharomycetes*, обираємо схему катаболізму у *Saccharomyces eubayanus*.

Глюкоза з допомогою глюкозоспецифічного ферменту (КФ 2.7.1.69) перетворюється на глюкозу 6-фосфат, яка за впливом глюкозо-6-фосфат ізомераз (КФ 5.3.1.9) переходить у β -D-фруктозу 6-фосфат. Фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11) стимулює перетворення β -D-фруктози 6-фосфат у β -D-фруктозу 1,6-фосфат. Дія фруктозодифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на β -D-фруктозу 1,6-фосфат розщеплює її на гліцеральдегід 3-фосфат та діоксіацетонфосфат, останній під дією тріозофосфатізомераз (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід 3-фосфат. Гліцеральдегід 3-фосфат залучається до подальшого катаболізму, під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) перетворюючись на гліцерат 1,3-фосфат, що під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у гліцерат 3-фосфат. Фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12) каталізує перетворення гліцерат 3-фосфат у гліцерат 2-фосфат. Енолаза (КФ 4.2.1.11) приводить до переходу гліцерат 2-фосфату у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату за участю піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

					НУХТ БТЕК 04.03.38 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ритор І. А.			РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ПЕРОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСНОГО ФЕРМЕНТІВ	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Красінько В.О.					27	83
Реценз.						Кафедра БТМ 27		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						



Шлях катаболізму *Saccharomyces eubayanus*. Ферменти: 1 – фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 3 – 6-фосфотрикіназа (КФ.2.7.1.11); 4 – фруктозодифосфатальдоза (КФ.4.1.2.13); 5 – гліцеральдегід 3- фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 6 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 7 – 2,3-дифосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.11); 8 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 9 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у комплекс ферментів

Під час росту *Geotrichum candidum* з використанням глюкози як джерела вуглецю, внаслідок катаболізму субстрату утворюються різні продукти.

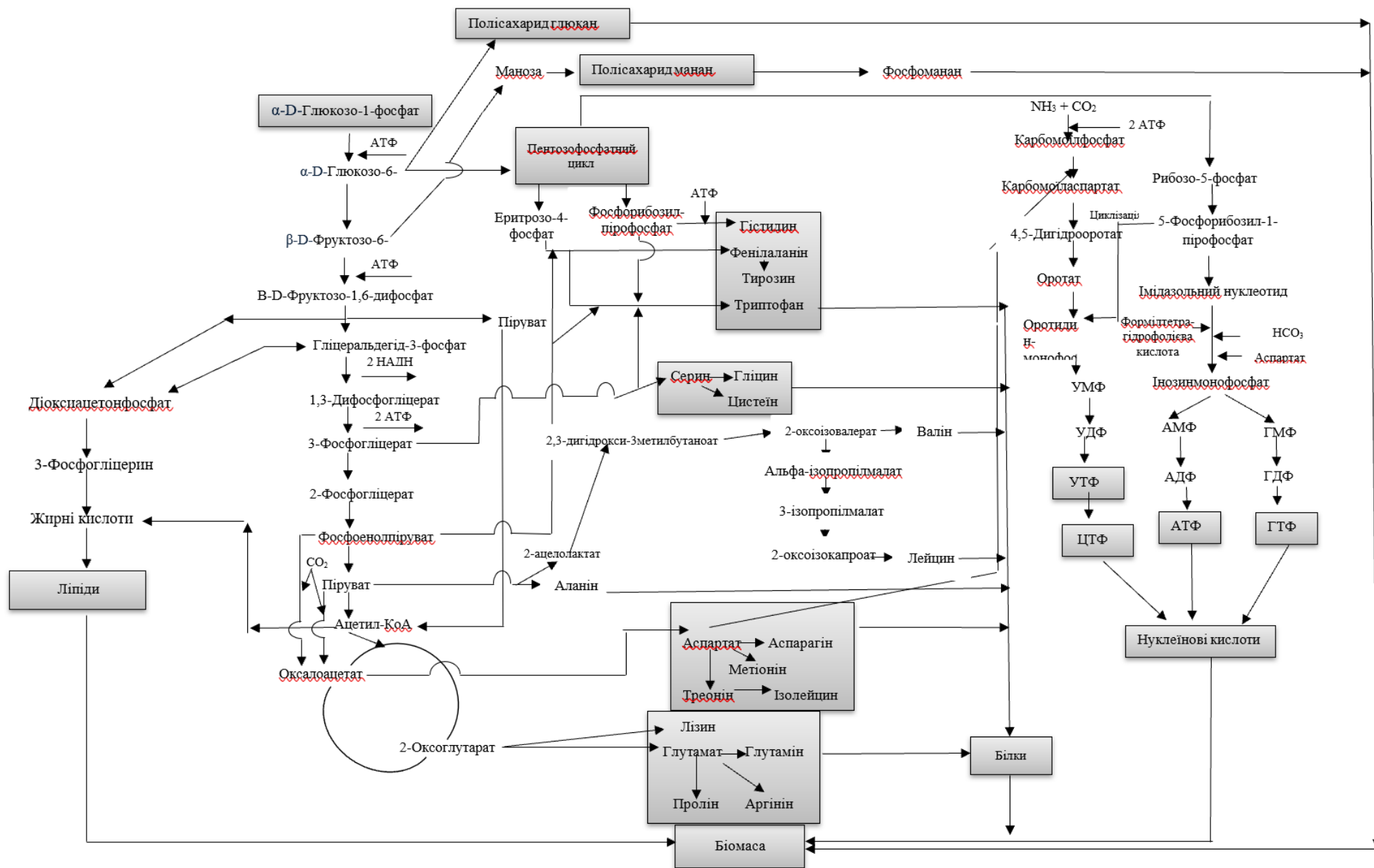
Глюкоза розщеплюється за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (гліколіз). Глюкоза фосфорилується за участю АТФ і перетворюється на глюкозо-6-фосфат. Глюкозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу, де утворюються попередники ароматичних амінокислот – еритрозо-4-фосфат та фосфорибозилпірофосфат.

Піруват утворюється з фосфоенолпірувату за допомогою піруваткінази (КФ. 2.7.1.40). Частина пірувату, що утворилася відновлюється до лактату, а частина окиснюється до ацетил-КоА. Ацетил-КоА вступає у повний цикл трикарбонових кислот.

Ацетил-КоА вводиться в ЦТК в результаті цитрат-синтазної реакції, в якій оксалоацетат і ацетил-КоА конденсуються з утворенням цитрату, даний етап каталізується ферментом цитратсинтазою (КФ 2.3.3.1). Фермент ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42) каталізує реакції перетворення ізоцитрату на 2-оксоглутарат. Далі під дією 2-оксоглутаратдегідрогенази з 2-оксоглутарату утворюється сукциніл-КоА, який перетворюється на сукцинат за участю ферменту сукцинаттіокінази. Сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1) окиснює сукцинат до фумарату[5]. Фермент фумараза (КФ 4.2.1.2) приєднує воду до фумарату з подальшим утворенням малату. За участю ферменту малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37) відбувається дегідрування малату до оксалоацетату. Всі реакції циклу трикарбонових кислот є оборотними, окрім утворення сукциніл-КоА.

Ферменти: 1 – фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 3 – 6-фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11); 4 – фруктозодифосфатальдоза (КФ.4.1.2.13); 5 – гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 6 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 7 – 2,3-дифосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.11); 8 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 9 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40). [КФ: 2.2.1.6], редуктоізомераза

кетолової кислоти [КФ: 1.1.1.86], редуктоізомераза кетолової кислоти [КФ: 1.1.1.86], дигідроксиоксила дегідратаза [КФ: 4.2.1.9], амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом [КФ: 2.6.1.42],ізопропілмалатсинтаза [КФ: 2.3.3.13], мала субодиниця 3-ізопропілмалат/(r)-2-метилмалатдегідратази [кф: 4.2.1.33 4.2.1.35], мала субодиниця 3-ізопропілмалат/(r)-2-метилмалатдегідратази [кф: 4.2.1.33 4.2.1.35], 3-ізопропілмалатдегідрогеназа [кф: 1.1.1.85], амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом [кф: 2.6.1.42]



РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Підготовка персоналу

Універсальний стандарт ДСТУ ISO 9001:2009 (ISO 9001:2008) містить вимоги стосовно персоналу, що розглядають його компетентність у виконанні робіт, що впливають на відповідність продукції вимогам [19].

Згідно з пунктом 6.2.1, персонал, який працює в межах системи управління якістю (СУЯ), повинен мати відповідну освіту, професійну підготовку, навички та досвід. Він може впливати на відповідність продукції вимогам безпосередньо чи опосередковано [19].

Пункт 6.2.2 вимагає визначення необхідного рівня компетентності персоналу, здійснення навчання та оцінку його результативності. Організація повинна також забезпечити обізнаність персоналу з важливістю їхньої діяльності та внеску в досягнення цілей у сфері якості, а також вести відповідну документацію щодо освіти, підготовленості, навичок і досвіду. Порівнюючи ці вимоги з ліцензійними вимогами та вимогами GMP ЄС, можна зробити висновки, що підприємства з виробництва лікарських засобів та біотехнологічні виробництва повинні забезпечувати належну кваліфікацію і компетентність персоналу, здійснювати навчання та оцінювати його ефективність. Крім того, вони повинні мати затверджені навчальні програми, охоплюючи теорію і практику забезпечення якості та GMP, і періодично оцінювати ефективність навчання [19].

Виконання цих вимог є ключовим для успішного впровадження фармацевтичної та біотехнологічних систем якості та подальшого їх функціонування. Тому, дослідження методів та засобів підготовки персоналу важливо для формування та підтримки системи якості цих підприємств [19].

					НУХТ БТЕК 04.03.38 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ					
Розроб.		Ритор І. А.						Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В. О.							32	83
Реценз.								Кафедра БТМ 32		
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В. П.								

5.2. Підготовка обладнання та інвентарю

Підготовка обладнання, яка входить у склад гігієнічної підготовки виробництва, має за мету досягнення необхідного рівня чистоти та стерильності.

Очищення обладнання починається з процесу промивання. Спочатку обладнання промивається водою протягом двох хвилин, після чого воду зливають у нейтралізаційний бак, а рідину - у систему зливу рідини. Потім обладнання промивають розчином каустичної соди з концентрацією 1-2% протягом 10 хвилин при температурі 40°C, а розчин повертають у бак для нейтралізації. Промивання питною водою варто проводити під час перекачування води в нейтралізаційний бак [20].

Якщо на поверхні обладнання є важкознятні забруднення, їх можна промити 1% розчином соляної кислоти при температурі 20°C, після чого розчин слід повернути в бак для нейтралізації [20].

Сучасні підприємства використовують механізовані системи очищення обладнання, такі як гідромонітори. Для механічного очищення обладнання, резервуарів і ємностей застосовують мийки ММ-4А і гідромонітори Г-13А. Їх спускають в обладнання через люк в опорній системі і працюють під тиском 0,6. Внутрішні поверхні очищаються під дією струменя гарячої рідини з тиском 0,1 МПа. ММ-4А складається з нерухомого корпусу, корпусу, що обертається, приводного механізму, редуктора і соплового пристрою зі струменевою кермою. Корпус, що обертається, має різьбовий стакан для приєднання шланга. Миюча рідина з максимальною температурою 80 °С приводить в рух робоче колесо гідротурбіни, яке через вертикальний вал в черв'ячному редукторі обертає сопловий пристрій, що складається з двох сопел з вихідним діаметром 11 мм зі швидкістю 0,03-0,04 с-1. Перед виходом з сопел струминна рідина проходить через струминний заспокоювач, який збільшує діапазон струменя до 0,6...1,0 МПа [20].

5.3. Вибір типу ферментера

Після визначення методу культивування та фізіолого-біохімічних характеристик продуцента підберемо необхідне оснащення для ферментера, яке забезпечить створення цих умов. При виборі типу біореактора враховуються характеристики продуцента, склад живильного середовища та економічні фактори. Культуру *Geotrichum candidum* слід культивувати глибоко-періодично у ферментаторах. Культури вимагають ретельного перемішування і аерації. Основна вимога до ферментера – можливість здійснювати процес культивування продуцента в асептичних умовах, з інтенсивною аерацією та процесами масообміну всередині біореактора.

Використовуються ферментатори з мішалкою і аерацією середовища. Усередині таких ферментаторів встановлені форсунки, дифузори, барботери для подачі повітря. Забезпечуються дотримання всіх параметрів зростання мікроорганізму і створюються сприятливі умови біосинтезу цільового продукту. Для дотримання цієї вимоги ферментатори повинні витримувати жорстку стерилізацію і працювати протягом всього культивування під невеликим надмірним тиском [21].

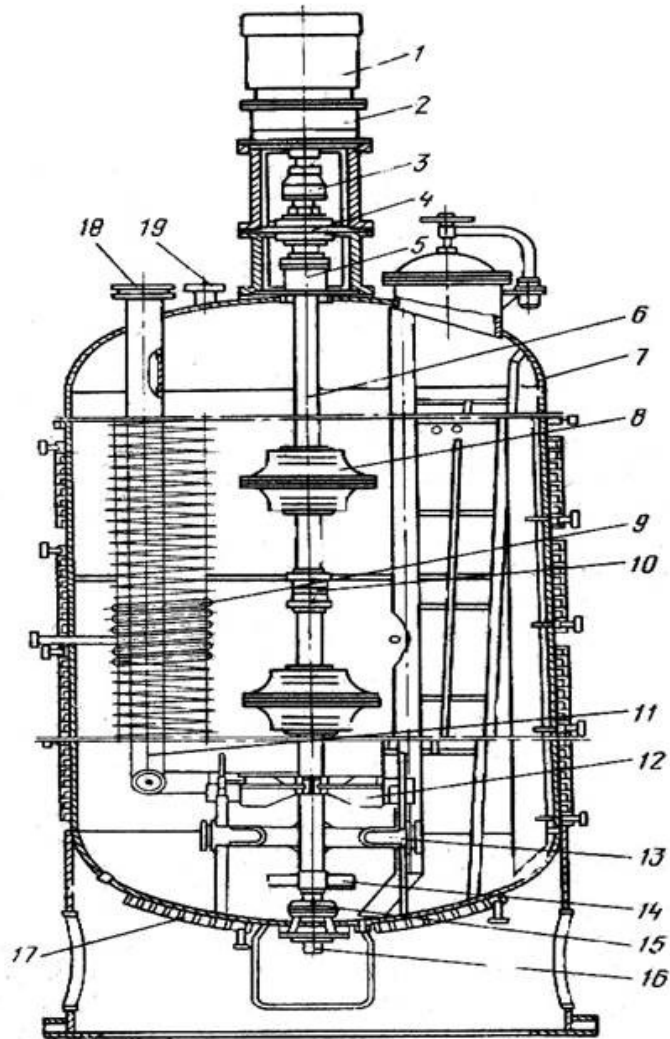


Рис. 5.1. Ферментатор з механічним перемішуванням барботерного типу:

1 - електродвигун, 2 - редуктор; 3 - муфта; 4 - підшипник; 5 - сальник; 6 - вал; 7 - корпус; 8 - турбінна мішалка; 9 - змієвиковий теплообмінник; 10 - муфта; 11 - труба для підведення повітря; 12 - лопаткова мішалка; 13 - барботер; 14 - гвинтова мішалка; 15 - опорний підшипник; 16 - штуцер для спуску; 17 - сорочка; 18 - завантажувальний штуцер; 19 - штуцер для подачі повітря.

Ферментер призначений для роботи під надлишковим тиском 0,25 МПа і стерилізації при температурі 130-140°C, а також може працювати під розрідженням. У процесі вирощування мікроорганізмів тиск всередині ферментера знаходиться в межах 50 кПа, а витрата стерильного повітря не перевищує 1 м³/(м³*год). Висота стовпа рідини в апараті коливається від 5 до 6

м, проте при висоті апарату понад 8 м дані параметри також можуть змінюватися [22].

5.4. Підготовка виробничих приміщень

Санітарно-гігієнічні роботи є невід'ємною частиною передпроцесних заходів на біотехнологічних підприємствах. Головна мета цих заходів - забезпечення мінімального рівня забруднення в усіх частинах виробничого процесу: в поживному середовищі, технологічному повітрі на поверхнях обладнання, яке контактує з культуральною рідиною, а також забезпечення чистоти на виробничих ділянках, де чистота та асептика впливають на якість продукції. Роботи санітарно-гігієнічного призначення також впливають на створення безпечних умов праці та збереження здоров'я працівників [20].

Санітарна підготовка виробництва включає проведення щоденного позмінного та генерального прибирання виробничих приміщень та централізовану підготовку обладнання. Для досягнення необхідного рівня санітарного стану виробництва здійснюється комплекс робіт з усіма учасниками технологічного процесу. Це включає підготовку персоналу, як потенційного джерела контамінації, через навчання та контроль знань. Додатково здійснюється обробка виробничих приміщень за допомогою мийних, дезінфікуючих та мийно-дезінфекційних засобів для зниження загального рівня забруднення та мікробної контамінації. Обладнання проходить багатостадійну обробку, включаючи миття, дезінфекцію, ополіскування та стерилізацію. Комунікації також піддаються миттю та стерилізації [20].

Для виконання цих процедур використовуються відомі в біотехнологічній практиці дезінфікуючі засоби, такі як розчин хлораміну, їдкий натр, а також інші дезінфектанти та детергенти. Для стерилізації апаратури та комунікацій використовується термічна стерилізація насиченою водяною парою, яка є загальновизнаним методом. Для миття внутрішніх частин обладнання, забруднених органічними речовинами, застосовується розчин каустичної соди [20].

Дезінфекція, або знезаражування, - це комплекс заходів, спрямованих на ефективне усунення збудників інфекційних хвороб та їхніх переносників у навколишньому середовищі, що включає комах (дезінсекція) і гризунів (дератизація). Дезінфекційні заходи поділяються на кілька видів: профілактичні, поточні, прикінцеві дезінфекційні засоби, а також фізичні, механічні, термічні та променеві методи знезаражування, а також хімічні методи дезінфекції. Метою дезінфекції є зменшення кількості мікроорганізмів до прийняттого рівня, хоча вона не завжди повністю їх знищує. Таким чином, вона є одним із видів знезараження. Основними перевагами дезінфекційних засобів є [23]:

- хороша розчинність у воді;
- швидка дія;
- відносно низька вартість;
- багатоцільове призначення;
- широкий спектр антимікробної дії;
- екологічна безпека;
- відсутність різких запахів;
- низький рівень токсичності;
- належний рівень миючих властивостей;

Недоліки:

- вузький антивірусний спектр дії;
- відсутність спороцидного ефекту при нормальних температурах навколишнього середовища;
- наявність вираженого піноутворення, що не дозволяє використовувати їх в аерозолях ;
- вироблення стійкості у мікроорганізмів при тривалому застосуванні;
- чутливість до дії неорганічних та органічних речовин, температури, світла, рН тощо.

Генеральне прибирання проводиться перед початком виробничого процесу, а щоденне – перед кожною робочою зміною (1-3 рази на добу). Після

розрахунку кількості необхідних прибирань визначається приблизна площа оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту 2,5 м. Підлогу необхідно мити та дезінфікувати кожного дня, а стіни, двері та вікна - не рідше одного разу на місяць. Для знезараження повітря виробничих приміщень використовують різні бактерицидні лампи - джерела ультрафіолетового випромінювання [24].

Кількість і потужність бактерицидних ламп необхідно підбрати із розрахунку не менше $2 \pm 0,5$ Вт потужності випромінювача на 1 м³ об'єму приміщення при прямому опромінюванні та не менше 1 Вт/м³ – для екранованих бактерицидних ламп [24].

Бактерицидні випромінювачі вмикаються на 1-2 години до початку роботи, коли у приміщенні немає людей. Оскільки ультрафіолетові випромінювачі утворюють у повітрі токсичні продукти (озон, окиси азоту), під час їх роботи необхідно вмикати вентиляцію. Стельові бактерицидні лампи вмикаються на 1 годину після кожного генерального прибирання [24].

У *табл. 5.1.* наведено кілька мийно-дезінфікуючих засобів, які пропонуємо для даного біотехнологічного виробництва. Вони мають різний спектри антимікробної дії, корозійну активність, дію на організм людини, стабільність.

Таблиця 5.1

Запропоновані мийні засоби та їх концентрації

Назва мийного /дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття/дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %
Каустична сода [57]	Обладнання, інвентар, комунікації, тара	1,0
Біомой [58]	Обладнання, інвентар, комунікації, тара	0,3
Дезекон [59] (композиція з 4-ьох амонієвих солей)	Підлога, стіни, вікна, двері	0,2
Хлорантоїн [60] (дихлоранти)	Підлога, стіни, вікна, двері	0,2

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для біотехнологічного виробництва

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, Грн/л(кг)	Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, Грн/л	Витрати роб.розчину, л/м ²	Ефективність використання дез.розчину, Е _{дз} , Грн/м ²
Каустична сода	Обладнання, інвентар, комунікації, тара	1,0	64	64	0,1	6,4
Біомой	Обладнання, інвентар, комунікації, тара	0,3	350	105	0,1	10,5
Дезекон (композиція з 4-бох амонієвих солей)	Підлога, стіни, вікна, двері	0,2	360	72	0,1	7,2
Хлорантоїн (дихлоранти)	Підлога, стіни, вікна, двері	0,2	724	145	0,1	14,5

*Для запобігання розвитку та поширенню стійких мікроорганізмів рекомендується використовувати обрані миючі засоби по чергово кожні три місяці.

5.5. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Geotrichum candidum росте при температурі від 5 до 38 °С; оптимальна температура становить 25 °С. Крім того, допускається широкий діапазон значень рН значення від 5,0 до 5,5 є оптимальними [25]. *Geotrichum candidum* є аеробом та факультативним анаеробом [26]. це означає, що він може рости як в аеробних умовах, за наявності кисню, так і в анаеробних умовах, коли кисню немає або його мало.

Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізують за допомогою фільтрів грубої очистки (головні фільтри) та індивідуальних фільтрів (фільтрів високої ефективності).

Повітряні фільтри використовуються для підтримки заданої чистоти повітря, відповідно до технологічних вимог. У зв'язку з цим їх поділяють, залежно від ефективності дії фільтрувальної здатності, на 3 класи [27]:

- грубого очищення (вловлюють частинки розміром більше 10 мкм),
- тонкого очищення (вловлюють частинки розміром більше 1 мкм);
- «абсолютні» фільтри високого очищення.

Повітряний фільтр використовують з метою підтримки певної чистоти повітря, яка відповідає встановленим технологічним вимогам. На сьогоднішній день повітряні фільтри ділять на три основні класи це фільтри тонкої, грубої очистки, а також «абсолютні» фільтри, які відрізняються найбільш високим ступенем очищення [27].

Фільтр тонкого очищення забезпечує найбільш високоефективну затримку забруднюючих частинок для системи аерації. Фільтруючим елементом може виступати фільтруючі елементи патронного типу (ФЕП) призначені для оснащення патронних (картриджних) фільтрів, що самоочищаються, які можуть застосовуватися в різних галузях промисловості для очищення повітя. ФЕП може виготовлятися з різних матеріалів, що фільтрують, на основі целюлози, синтетичних волокон (поліефірні, поліпропіленові волокна), а також суміші целюлозних і синтетичних волокон [28].

Фільтруючі матеріали відрізняються ефективністю очищення та можуть підбиратись відповідно до вимог споживачів, виходячи з конкретних умов експлуатації. Ефективність стандартних ФЕП більшість видів пилів становить, зазвичай, щонайменше 99,9%. Для уловлювання дрібнодисперсних аерозолів (плазмове, лазерне різання металів тощо) може бути використаний високоефективний синтетичний матеріал з ефективністю очищення не менше 99,9% щодо частинок розміром 0,5 – 1 мкм [28].

Технологічна схема стиснення та очищення повітря

Перша підсистема. Атмосферне повітря засмоктується турбокомпресором через забірну шахту на висоті 20-30 м, де найменша концентрація забруднюючих часточок. Спочатку повітря потрапляє у фільтр

попереднього очищення, де звільняється від грубих аерозолів (пилу). Фільтр попереднього очищення не тільки захищає компресор від забруднення, але й значно зменшує кількість забруднень, які можуть потрапити до другої підсистеми [29].

Друга підсистема. Повітря потрапляє в компресор і далі стискається. Щоб забезпечити випадання вологи в краплевловлювачі, повітря «переохолоджують до температури 25-40 °С в теплообмінному апараті. Потім повітря потрапляє в ресивер, де тиск в системі стабілізується і вирівнюється. Після ресивера повітря нагрівається до 70-90°С, щоб забезпечити роботу фільтрів другого і третього рівнів. При такій температурі пари не конденсуються на волокнах фільтрів. Тому повітря після краплевловлювача нагрівається в теплообміннику і частково змішується з гарячим повітрям після компресора. Кількість змішаного повітря визначається умовами відносної вологості і не повинна перевищувати 40% [29].

Третя підсистема. Складається з двох фільтрів і систем очищення, одного на другому рівні і одного на третьому рівні. Фільтр другого рівня (основний фільтр), як правило, розташований на території заводу поруч з робочим місцем. Головний фільтр очищає повітря від усіх ферментаторів на заводі. З головного фільтра повітря подається колекторами до індивідуальних фільтрів третього рівня, встановлених у кожному ферментаторі, незалежно від його потужності [29].

Спочатку повітря всмоктується через повітрязабірник на висоті 20-30 метрів. Далі повітря очищується за допомогою фільтра попереднього очищення (фільтр грубого очищення). Після попереднього очищення повітря потрапляє в теплообмінник (де воно переохолоджується до температури 25-40 °С, щоб видалити надлишок вологи з повітря). Потім повітря потрапляє в ресивер, де тиск в системі стабілізується і вирівнюється. Після ресивера повітря нагрівається до 70-90°С, щоб забезпечити надійну роботу фільтра. При такій температурі пара не конденсується на волокнах фільтра. Потім повітря потрапляє у двофільтрову систему з головним фільтром та індивідуальними

фільтрами. Основний фільтр очищає всі ферментатори, тоді як індивідуальні фільтри встановлюються безпосередньо в кожному ферментаторі.

5.6. Попередня підготовка компонента поживного середовища

Перед стерилізацією стічна вода дріжджового виробництва, спочатку підкислюється концентрованим розчином хлоридної кислоти, для досягнення рН 6. Після попередньої підготовки стічна вода подається на стерилізацію даної композиції.

5.7. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Оскільки, при розробці даного виробництва не очікується інтенсивне піноутворення під час виробничого культивування, тому необхідність окремого приготування піногасника відсутня. Дане виробництво плануємо забезпечити виробничим ферментером з автоматичним механічним піногасником.

5.8. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого біосинтезу *Geotrichum candidum* використовується середовище такого складу (г/л) [30]:

- *Стічні води
- Глюкоза - 5
- Дріжджовий екстракт – 1,08

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 63 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,65. Підготовка посівного матеріалу здійснюється у 5 етапів.

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

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (0,39 л). Після аналізу складу поживного середовища, умовно поділяємо його на наступні композиції, залежно від режиму стерилізації компонентів:

Композиція А: стічні води, глюкоза і дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Розрахунок кількостей компонентів для приготування середовища об'ємом 0,39 л для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках (табл.5.3.).

Таблиця 5.3.

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування в посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 0,39л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Стічні води від виробництва дріжджів		0,34	А	0,39
Глюкоза	5	1,95		
Дріжджовий екстракт	1,08	0,42		
Вода		0,05		
Разом:		0,39		0,39

5.8.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 10 л

Для цієї стадії необхідно 4,33 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.4.1. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в (табл.5.4). Стерилізація даної композиції буде відбуватись безпосередньо в інокуляторі.

Для того щоб здійснити засів поживного середовища в інокулятор необхідно внести 0,39 л посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції буде становити 3,94 л.

Таблиця 5.4.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4,33 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 4,33л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Стічні води від виробництва дріжджів		3,096	А	3,94
Конденсат		0,344		
Глюкоза	5	19,5		
Дріжджовий екстракт	1,08	4,212		
Вода		0,5		
Разом:		3,94		3,94

5.8.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 63 л

Для цієї стадії необхідно 43,3 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.4.1. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в (табл.5.5). Стерилізація даної композиції буде відбуватись безпосередньо в інокуляторі.

Для того щоб здійснити засів поживного середовища в інокулятор необхідно внести 3,9 л посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції буде становити 39,4 л.

Таблиця 5.5.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 43,3 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 43,3л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Стічні води від виробництва дріжджів		34,83	А	39,4
Конденсат		3,87		
Глюкоза	5	216,5		
Дріжджовий екстракт	1,08	46,764		
Вода		0,7		
Разом:		39,4		39,4

5.8.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 630 л

Для цієї стадії необхідно 431 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.4.1. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в (табл.5.6). Стерилізація даної композиції буде відбуватись безпосередньо в інокуляторі. Окремо у збірнику – змішувачі робимо розчин глюкози та дріжджового екстракту, який після перекачуємо до інокулятора та подальшої стерилізації композиції.

Для того щоб здійснити засів поживного середовища в інокулятор необхідно внести 39 л посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції буде становити 392 л.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 431 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 431л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Стічні води від виробництва дріжджів		346,5	А	392
Конденсат		38,5		
Глюкоза	5	2155		
Дріжджовий екстракт	1,08	465,48		
Вода		7		
Разом:		392		392

5.8.5 Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 6300 л

Для цієї стадії необхідно 4263 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.4.1. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в (табл.5.7). Стерилізація даної композиції буде відбуватись безпосередньо в інокуляторі. Окремо у збірнику – змішувачі робимо розчин глюкози та дріжджового екстракту, який після перекачуємо до інокулятора та подальшої стерилізації композиції.

Для того щоб здійснити засів поживного середовища в інокулятор необхідно внести 388 л посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції буде становити 3875 л.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4263 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 4263л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Стічні води від виробництва дріжджів		3424,5	А	3875
Конденсат		380,5		
Глюкоза	5	21315		
Дріжджовий екстракт	1,08	4604,04		
Вода		70		
Разом:		3875		3875

5.8.6 Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування у ферменері об'ємом 63000 л

Для цієї стадії необхідно 42207 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.4.1. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в (табл.5.8). Стерилізація даної композиції буде відбуватись безпосередньо у виробничому ферменері. Окремо у збірнику – змішувачі робимо розчин глюкози та дріжджового екстракту, який після перекачуємо до ферментера та подальшої стерилізації композиції.

Для того щоб здійснити засів поживного середовища у виробничий ферменер необхідно внести 3837 л посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції буде становити 38370 л.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 42207 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 42207л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Стічні води від виробництва дріжджів		28503	А	38370
Конденсат		3167		
Глюкоза	5	211035		
Дріжджовий екстракт	1,08	45583,56		
Вода		700		
Разом:		38370		38370

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в *табл. 6.1.*

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник А1И 021.000 («Теплотех- Комплект»). Температура повітря до 150 ° С; тиск до 0,6 МПа Виробник: Україна
Ф – 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтруючий матеріал – поліестер, швидкість фільтрування 3 м ³ /год, E = 80 %[31].
К – 3	Компресор	1	Компресор серії «ВКП F Industrial» . Виробник «Лідер» (Україна), потужність від 8 кВт до 15 кВт, продуктивність 1,2-2,2 м ³ /хв[32].
ТО – 4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Витрата: до 640 м ³ /год Робочий тиск: 140 атм. Температура: -195 ° С- +220 ° С Нержавіюча сталь AISI 316 Виробник: Швеція [33].
Р – 5	Ресивер	1	Ресивер повітряний 900л. РВ 900.800-04 (Україна), об'єм 900 л [34].
ТН – 6	Теплообмінник-нагрівач	1	Кількість повітря, м ³ /год: 7500 Необхідна теплова потужність, кВт (від –100С до +200С): 80 кВт Виробник: Україна[35].
Ф – 7	Фільтр тонкої очистки	1	Компактний кишеньковий фільтр класу F9 («New filter»). Фільтрувальний матеріал: мікроскловолокно; E>95% [36].

НУХТ БТЕК 04.03.38 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Ритор І. А.		
Перевір.		Красінко В.О.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ				
		Літ.	Арк.	Акрушів
			47	83
Кафедра БТМ ₄₇				

33-8	Збірник - змішувач	1	Збірник-змішувач об'ємом 10л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі AISI 304 . Виробник: Україна [37]
33-9	Збірник - змішувач	1	Збірник-змішувач об'ємом 100л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі AISI 304 . Виробник: Україна [38]
33-11	Збірник - змішувач	1	Збірник-змішувач об'ємом 1000л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі AISI 304 . Виробник: Україна [39]
33-13	Збірник - змішувач	1	Збірник-змішувач об'ємом 5000л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі AISI 304 . Виробник: Китай [40]
ОВД – 10 ОВД – 12	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Дозатор марки ДВСВ-50. Дозатор напівавтоматичний (гравітаційного типу). Виробник: Україна[41].
НВ-14 НВ-25	Насос відцентровий	2	Циркуляційний насос Grundfos Насос відцентровий герметичний , матеріал чугун. Продуктивність від 3,2 м ³ /год, Максимальний тиск – 10бар. Виробник: Данія[42].
ІН-15	Інокулятор	1	Мобільний лабораторний реактор робочим об'ємом 10 л для рідких продуктів. Оснащений магнітною мішалкою австрійської фірми ZETA. Комплектація датчиками: рН, розчиненого кисню O ₂ , рівню рідини та температури. Клапани мембранні, ручні. Кришка з оглядовим відкидним вікном Dn100 з двірником та підсвічуванням, запобіжним клапаном, клапаном подачі продукту, мийними голівками та резервними штуцерами. Корпус обладнаний теплообмінною паровою та теплоізолюючою сорочками.[43].

Закінчення таблиці 6.1

ІН-17	Інокулятор	1	<p>Біореактор геометричний об'єм 63л, швидкість перемішування 20–1500об/хв.</p> <p>Контроль температури, рН, тиску</p> <p>Необхідне контрольно-вимірювальне обладнання</p> <p>Система аерації</p> <p>Габарити реактора: 1437x856x1580</p> <p>Маса:210кг</p> <p>Матеріал корпусу: сталь AISI 316 L</p> <p>Виробник: Україна [44].</p>
ІН-19	Інокулятор	1	<p>Біореактор геометричний об'єм 630л, швидкість перемішування 20–1500об/хв.</p> <p>Контроль температури, рН, тиску</p> <p>Необхідне контрольно-вимірювальне обладнання</p> <p>Система аерації</p> <p>Габарити реактора: 1500x1135x3122</p> <p>Маса:630кг</p> <p>Матеріал корпусу: сталь AISI 316 L</p> <p>Виробник: Україна [45].</p>
ІН-21	Інокулятор	1	<p>Біореактор геометричний об'єм 6300л, швидкість перемішування 20–1500об/хв.</p> <p>Контроль температури, рН, тиску</p> <p>Необхідне контрольно-вимірювальне обладнання</p> <p>Система аерації</p> <p>Матеріал корпусу: сталь AISI 316 L</p> <p>Виробник: Китай [46].</p>
Ф-16 Ф-18 Ф-20 Ф-22 Ф-24	Індивідуальний фільтр очистки повітря	5	<p>Стерилізуючі фільтри з політетрафторетилену. Ступінь очищення повітря фільтром становить 99,9999 %.[47].</p>
ФР-23	Ферментер	1	<p>Виробничий ферментер геометричний об'єм 63000л, швидкість перемішування 20–1500об/хв.</p> <p>Контроль температури, рН, тиску</p> <p>Необхідне контрольно-вимірювальне обладнання</p> <p>Система аерації</p> <p>Габарити реактора: 1500x1135x3122</p> <p>Матеріал корпусу: сталь AISI 316 L</p> <p>Виробник: Китай [48].</p>

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

Повітря, що використовується для аерації у процесі культивування посівного матеріалу в інокуляторі та в процесі біосинтезу в ферментері, має бути стерильним та мати температуру 30–35°C.

Перед тим, як повітря потрапляє до ферментеру, воно проходить повну очистку та стерилізацію, в результаті якої відбувається видалення мікроорганізмів. Очищене повітря потрапляє до ферментеру через барботер.

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря здійснюється повітрозбірником (ПЗ-1), що розташований на висоті приблизно 20-30 метрів. Потім повітря через повітрозабірну шахту за допомогою компресора потрапляє до фільтру попереднього очищення (ФГО-2).

ДР 1.2. Очищення від пилу і механічних часток.

На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром 150-300 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення використовують фільтри грубої очистки – ФЯП. Вони складаються з рамки, виготовленої з оцинкованої сталі, усередині якої розміщений об'ємний фільтруючий матеріал (поліуретан) (ФГО-2). Ефективність очищення повітряними фільтрами ФЯП становить 80%.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Стиснення повітря здійснюється у компресорі (К-3) при тиску 0,35–0,5 МПа, при цьому температура може підніматися до 200°C.

					НУХТ БТЕК 04.03.38 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ритор І. А.			РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					50	83
Реценз.						Кафедра БТМ 50		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР 1.4. Охолодження та видалення вологи

Повітря "переохолоджують" до температури 25–40 °С в теплообміннику-охолоджувачі (ТО-4). Під час охолодження стисненого повітря випадає 50 – 70 % вихідної вологості, яка відділяється за допомогою вологовідділювачів.

ДР 1.5 Стабілізація та нагрівання повітря

Для забезпечення надійної роботи головного і індивідуального фільтрів, повітря нагрівають до температури до 60°С в теплообміннику-нагрівачі (ТН-5).

ДР 1.6. Очищення в головному фільтрі

Подальше очищення повітря відбувається у головному фільтрі (Ф-7). Для головних фільтрів використовується фільтр ФТО-750 з ефективністю $E = 99,92$ %.

ДР 1.7. Очищення в індивідуальному фільтрі

Для індивідуального очищення повітря використовується фільтр тонкої очистки. Стерилізацію фільтруючого матеріалу проводять парою при температурі 145 °С. Отримуємо стерильне аераційне повітря зі ступенем очищення – 99,9999 %.

ДР 2. Попередня підготовка компонента поживного середовища

ДР 2.1. Підкислення стічної води перед подальшою стерилізацією

Перед початком стерилізації загальний об'єм *стічної води від виробництва дріжджів** (а саме ≈ 32312 л), завантажують до збірника – змішувача об'ємом 50 м³. Після цього, шляхом подачі концентрованого розчину хлоридної кислоти, за допомогою автоматизованої системи, доводять рН до оптимального значення, а саме рН – 6. Після чого розчин подається на подальшу стадію стерилізації.

***СВВД – стічна вода від виробництва дріжджів.**

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках наведений у табл. 5.3 (розділ 5). Розрахунок здійснений для приготування середовища об'ємом 0,39 л. Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 3.1.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 2 г глюкози та 0,4 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл. За допомогою мірного циліндра наливають 0,05 л води питної та перемішують. Після у колбу вносять мірником 0,3 л СВВД від ДР2.1, перемішують. Після колбу закривають ватно-марлевою пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 112°C, 30 хв.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 10 л.

На даному етапі необхідно отримати 4,33 л поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії (0,39 л) кількість води для приготування поживного середовища становитиме 3,94л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л наведений у табл. 5.4 (розділ 5). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 20 г глюкози та 4 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л. За допомогою мірного циліндра наливають 0,5 л води питної та перемішують. За допомогою автоматизованого лічильника для води відміряють 3 л СВВД (від ДР2.1) в інокулятор. Потім додають решту композиції з колби та перемішують. Стерилізація композиції А буде відбуватися безпосередньо в інокуляторі. подача пари відбувається через барботер апарату. Одночасно в сорочку апарату подають глуху пару. Стерилізацію проводять при температурі 112°C, 30 хв.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 63 л.

На даному етапі необхідно отримати 43,3 л поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії (3,9 л) кількість води для приготування поживного середовища становитиме 39,4л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 63 л наведений у табл. 5.5 (розділ 5). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 216 г глюкози та 47 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1л. За допомогою мірного циліндра наливають 0,7 л води питної та перемішують. За допомогою автоматизованого лічильника для води відміряють 35 л СВВД (від ДР2.1) в інокулятор. Потім додають решту композиції з колби та перемішують. Стерилізація композиції А буде відбуватися безпосередньо в інокуляторі. Подача пари відбувається через барботер апарату. Одночасно в сорочку апарату подають глуху пару. Стерилізацію проводять при температурі 112°C, 30 хв.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 630 л.

На даному етапі необхідно отримати 431 л поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії (39 л) кількість води для приготування поживного середовища становитиме 392 л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 630 л наведений у табл. 5.6 (розділ 5). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 2155 г глюкози та 465 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у збірник – змішувач об'ємом 10 л. За

допомогою автоматизованого лічильника наливають 7 л води питної та перемішують. За допомогою автоматизованого лічильника для води відміряють 346 л СВВД (від ДР2.1) в інокулятор. Потім самопливом додають решту композиції зі збірника та перемішують. Стерилізація композиції А буде відбуватися безпосередньо в інокуляторі. подача пари відбувається через барботер апарату. Одночасно в сорочку апарату подають глуху пару. Стерилізацію проводять при температурі 112°C, 30 хв.

ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 6300 л.

На даному етапі необхідно отримати 4263 л поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії (388 л) кількість води для приготування поживного середовища становитиме 3875 л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6300 л наведений у табл. 5.6 (розділ 5). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 3.5.1 Приготування та стерилізація композиції А

На об'ємно – ваговому дозаторі зважують 21315 г глюкози та 4604 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у збірник – змішувач об'ємом 100 л. За допомогою автоматизованого лічильника наливають 70 л води питної та перемішують. За допомогою автоматизованого лічильника для води відміряють 3424 л СВВД (від ДР2.1) в інокулятор. Потім самопливом додають решту композиції зі збірника та перемішують. Стерилізація композиції А буде відбуватися безпосередньо в інокуляторі. подача пари відбувається через барботер апарату. Одночасно в сорочку апарату подають глуху пару. Стерилізацію проводять при температурі 112°C, 30 хв.

ДР 3.6. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера 63 м³

Для цієї стадії необхідно отримати 42207 л поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії (3837 л) кількість води для приготування поживного середовища становитиме 38370 л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого культивування у ферментері об'ємом 63 м³ наведений у табл. 2.6 (розділ 2). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 3.6.1 Приготування та стерилізація композиції А

На об'ємно – ваговому дозаторі зважують 211035 г глюкози та 45583 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у збірник – змішувач об'ємом 1000 л. За допомогою автоматизованого лічильника наливають 700 л води питної та перемішують. За допомогою автоматизованого лічильника для води відміряють 28503 л СВВД (від ДР2.1) у виробничий ферментер. Потім самопливом додають решту композиції зі збірника та перемішують. Стерилізація композиції А буде відбуватися безпосередньо у ферментері. подача пари відбувається через барботер апарату. Одночасно в сорочку апарату подають глуху пару. Стерилізацію проводять при температурі 112°C, 30 хв.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1 Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Geotrichum candidum* зберігають у пробірках на скошеному картопляно–декстрозному агарі та пересівають кожні два місяці в стерильних умовах. Пробірки з культурою витримують при 4°C.

ТП 4.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Робочу культуру отримують пересівом колекційної культури з пробірок на чашки Петрі із агаризованим середовищем в асептичних умовах і вирощуванні при температурі 30°C протягом 72 год.

ТП 4.3 Вирощування культури на агаризованому середовищі

Отримані конідії (від ТП 4.2) пересівають у пробірки на скошеному картопляно–декстрозному агарі та вирощують протягом 72 год при 30°C.

ТП 4.4 Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу, у стерильні 3 качалочні колби об'ємом 750мл, в асептичних умовах наливають по 150 мл поживного середовища від ДР 3.1.1.

У пробірку з робочою культурою *G. candidum*, вирощеною на картопляно–декстрозному агарі, вносять 5 мл стерильної дистильованої води, суспендують, піпеткою відбирають одержану суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію, одержану з однієї пробірки.

Вирощування *G. candidum* здійснюють у колбах на качалці (150 об/хв) при температурі 30°C протягом 48 год. Після цього посівний матеріал з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 1 л. Далі з колби відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю.

ТП 4.5. Вирощування в інокуляторі 10 л

У попередньо простерилізований інокулятор зі стерильною композицією А 3,94 л (від ДР3.2.1) через засівну колбу, стерильно вносять 0,39 л посівного матеріалу (від ТП4.4). Перед подачею ПМ композицію А в інокуляторі охолоджують шляхом подачі холодної води в сорочку апарата. Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку (100 об/хв), подачу повітря у барботер, температуру $30\pm 1^\circ\text{C}$ підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, тривалість культивування 48 год.

ТП 4.6. Вирощування в інокуляторі 63 л

У попередньо простерилізований інокулятор зі стерильною композицією А 39,4 л (від ДР3.3.1) через трубу перетискання, вносять 3,9 л посівного матеріалу (від ТП4.4). Перед подачею ПМ композицію А в інокуляторі охолоджують шляхом подачі холодної води в рубашку апарата. Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку (100 об/хв), подачу повітря у барботер, температуру $30\pm 1^\circ\text{C}$ підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, тривалість культивування 48 год.

ТП 4.7. Вирощування в інокуляторі 630 л

У попередньо простерилізований інокулятор зі стерильною *композицією А* 392 л (від ДРЗ.4.1) через трубу перетискання, вносять 39 л посівного матеріалу (від ТП4.5). Перед подачею ПМ *композицію А* в інокуляторі охолоджують шляхом подачі холодної води в рубашку апарата. Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку (100 об/хв), подачу повітря у барботер, температуру $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, тривалість культивування 48 год.

ТП 4.8. Вирощування в інокуляторі 3600 л

У попередньо простерилізований інокулятор зі стерильною *композицією А* 3875 л (від ДРЗ.5.1) через трубу перетискання, вносять 388 л посівного матеріалу (від ТП4.6). Перед подачею ПМ *композицію А* в інокуляторі охолоджують шляхом подачі холодної води в сорочку апарата. Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку (100 об/хв), подачу повітря у барботер, температуру $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, тривалість культивування 48 год.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1 Виробниче культивування

Виробниче культивування здійснюють у ферментері об'ємом 63 м^3 (робочий об'єм – 42207 л). У попередньо простерилізований виробничий ферментер зі стерильною *композицією А* 38370 л (від ДРЗ.6.1) через трубу перетискання, вносять 3837 л посівного матеріалу (від ТП4.8). Перед подачею ПМ *композицію А* у виробничому ферментері охолоджують шляхом подачі холодної води в сорочку апарата. Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку (100 об/хв), подачу повітря у барботер, температуру $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, тривалість культивування 144 год.

Культивування припиняють за досягнення в культуральній рідині активності ферменту: LiP: 0,0584 ОД/мл; MnP: 0,078 ОД/мл.

Кожні 8 год з ферментера відбирають 200 мл зразку культуральної рідини для мікробіологічного та техніко-хімічного аналізу.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється двома способами:

1) Прямий висів на агаризовані поживні середовища (проводиться шляхом посіву культур до ізолюваних колоній на чашки Петрі, в даному випадку: глюкозно-картопляний агар або ж сусло-агар.

2) Мікроскопіювання.

Спостереження проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою. Щоб приготувати препарат, стерильною петлею на чисте знежирене предметне скло, яке здійснено в асептичних умовах наносять невелику краплю культури. Використовують бактеріальну петлю, щоб розподілити краплю, яка містить мікроорганізми. Висушували мазок при кімнатній температурі. Потім за допомогою скляної палички наносять 1-2 краплі імерсійного масла на повністю сухий препарат. Після закінчення роботи з ватою, яка була змочена етиловим спиртом, видаляють залишки масла.

Мікроскопічний вигляд *Geotrichum candidum* показує бочкоподібні одноклітинні артроконідії (розміром 6-12 × 3-6 мкм), розташовані ланцюжками та дихотомічними розгалуженими гіфами.



Рис. 8.1. Мікроскопічний вигляд *Geotrichum candidum* [49].

					НУХТ БТЕК 04.03.38 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА				
Розроб.	Ритор І. А.			Літ.				Арк.	Акрушів
Перевір.	Красінько В.О.							58	83
Реценз.				Кафедра БТМ 58					
Н. Контр.									
Затверд.	Стабніков В.П.								

8.2 Концентрація біомаси

Супернатанти з культурального середовища були проаналізовані на активність лігніну-пероксидази (LiP) та марганцевої пероксидази (MnP).

Активність LiP була визначена колориметрично методом Tien and Kirk шляхом вимірювання збільшення поглинання на рівні 310 нм ($\epsilon_{310} = 9,300/\text{M см}$).

Реакційну суміш (2 мл), що містить 4 мМ вератрилового спирту в 10 мМ тартаратного буфера натрію (рН 3), інкубують 100 мкл культури при 30°C. Реакція була ініційована додаванням відповідної кількості 0,2 мМ H₂O₂. Заготовки містили буфер замість вератрилового спирту. Одна одиниця активності LiP визначалася як кількість ферментів, що каталізують утворення 1 мк/моль вератралдегіду в хвилину в умовах аналізу.

Активність MnP була виміряна шляхом моніторингу окислення 1 мМ MnSO₄ в 50 мМ малонатного буфера натрію (рН 4,5) в присутності 0,1 мМ H₂O₂, через збільшення поглинання при 468 нм ($\epsilon_{468} = 49,600/\text{M см}$). Одна одиниця активності MnP визначалася як кількість ферменту, необхідного для отримання збільшення поглинання одного в хвилину на мілілітр реакційної суміші. Заготовки містили всі реагенти, крім MnSO₄ [50].

8.3 Концентрація джерела вуглецю

Джерелами вуглецю у середовищі для культивування *Geotrichum candidum* є глюкоза.

Для визначення глюкози пропонують глюкозооксидазний метод.

Принцип методу. Фермент глюкооксидаза окислює глюкозу до глюконової кислоти з виділенням перекису водню, який у присутності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням червоного забарвлення. Який визначається фотометрично - здатний вимірювати оптичну щільність розчинів, в даному випадку, при довжині хвилі 520 нм [51].

Перелік необхідних матеріалів і реактивів:

- ✓ Натрію хлориду 9 г / л (ізотонічний розчин): готують, розчиняючи 0,9 г NaCl в 100 мл води.

- ✓ Цинку сульфат, 50 г / л: 5 г сульфату цинку ($ZnSO_4$) розчиняють у воді, об'єм доводять до 100 мл.
- ✓ Натр їдкий, 0,3 моль / л: готують, розчиняючи 1,2 г NaOH в 100 мл води, концентрацію перевіряють титруванням (вона повинна бути 0,3 н).
- ✓ Ортотолуїдін, 1% -ний розчин: 1 г препарату розчиняють в 100 мл абсолютного спирту. Розчин можна зберігати в холодильнику в склянці з притертою пробкою кілька місяців. Наявний у продажу препарат можна очистити перекристалізацією, для чого його розчиняють в абсолютному спирті, додають воду і випали кристали відсмоктують на фільтрі, потім сушать над хлоридом кальцію .
- ✓ Ацетатний буферний розчин рН 4,8: змішують 4 частини 0,25 н оцтової кислоти (перевірити титруванням) і 6 частин 0,25 н ацетату натрію (містить 34 г $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ в 1 літрі).
- ✓ Глюкозооксидаза — сухий препарат активністю 3000 од / мг або більше.
- ✓ Пероксидаза з хрому. 1 мг розчиняють в 5 мл ацетатного буфера, в холодильнику можна зберігати кілька днів.
- ✓ Робочий реактив: в 80 мл ацетатного буфера розчиняють 2 мг глюкозооксидази і 1 мг пероксидази, додають 1 мл 1% -ного розчину ортотолуїдіна, перемішують і доводять обсяг буферним розчином до 100 мл. Робочий реактив повинен бути прозорим, безбарвним або мати слабо-зелений відтінок, в цьому випадку він стійкий при зберіганні на холоді. Якщо ж забарвлення інтенсивна або через кілька годин після приготування починає випадати осад, це означає, що ортотолуїдін недостатньо чистий і його треба перекристалізувати.
- ✓ Калібрувальні розчини глюкози. Глюкозу попередньо висушують при температурі 37 ° С і зберігають в ексікаторі. Спочатку готують основний розчин з концентрацією 50 ммоль / л, для чого 180 мг речовини розчиняють в 20 мл насиченого розчину (приблизно 0,3% -ного) бензойної кислоти. З цього розчину готують робочі калібрувальні розчини, які містять 3, 6, 9, 12, 15, 18 і 21 ммоль / л, для чого беруть 0,6,

1,2, 1,8, 2,4, 3, 3,6 і 4,2 мл основного розчину і доводять насиченим розчином бензойної кислоти до об'єму 10 мл. Ці розчини містять глюкозу в тих же концентраціях, у яких вона буває в крові, що полегшує розрахунки при калібрування.

Умови проведення дослідю. У центрифужні пробірки вносять 1,1 мл розчину хлориду натрію, 0,4 мл розчину сульфату цинку і 0,4 мл 0,3 н розчину NaOH, перемішують, при цьому утворюється дуже тонкий гель гідрату окису цинку, в нього випускають 0,1 мл глюкозу або каліброваного розчину, знову перемішують і через 10 хвилин центрифугують при швидкості 3000 об. / хв протягом 10 хвилин. До 1 мл надосадової рідини додають 3 мл робочого реактиву і обережно перемішують. Поступово починає розвиватися забарвлення, яка при звичайній кімнатній температурі досягає максимуму через 13-15 хвилин, а потім поступово зменшується [52].

Розрахунок концентрації глюкози в пробах провести по формулі:

$C = E_d/E_k \cdot 10$, де C – концентрація глюкози, ммоль/л; E_d і E_k – оптичні щільності дослідної та калібрувальної проб відповідно, од. оптичної щільності

8.4 Концентрація джерела азоту

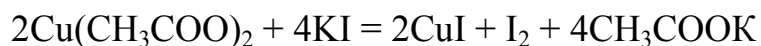
Джерелом азоту є дріжджовий екстракт.

У виробничій практиці широко використовується показник «амінний азот», який відображає в основному вміст аміногруп і низькомолекулярних пептидів.

Вміст амінного азоту в культуральному розчині визначали мідним способом. Визначення амінного азоту мідним способом засноване на здатності амінокислот і різних пептидів утворювати з комплексні розчинні сполуки з міддю, які потім визначають йодометричним методом.

Принцип методу. До визначеної кількості досліджуваного розчину, що містить суміш амінокислот і пептидів, приливають при слаболужній реакції надлишок суспензії фосфорнокислої міді у боратному буфері, в результаті після збовтування у розчин переходять мідні солі більшості амінокислот. Згодом

надлишок фосфату міді відфільтровують і до прозорого розчину додають оцтову кислоту і йодистий калій. У такому разі відбувається реакція:



Йод, який виділився, відтитрують слабким розчином гіпосульфіту. Кожен мілілітр 0,01 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ відповідає 0,28 мг амінного азоту.

Перелік необхідних матеріалів і реактивів:

- ✓ Розчин $\text{CuCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 27,3 г розчиняють у дистильованій воді в мірній колбі 1000 мл і доводять до мітки;
- ✓ Розчин ортофосфату натрію $\text{Na}_3\text{PO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 64,5 г $\text{Na}_3\text{PO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у 500 мл свіжокип'яченої дистильованої води. Додають 7,2 г NaOH , вливають у мірну колбу на 1000 мл і доводять до мітки;
- ✓ Боратний буферний розчин: 57,21 г бури розчиняють у 1500 мл дистильованої води, додають 100 мл 1 н. розчину HCl і доводять дистильованою водою до об'єму 2000 мл;
- ✓ Суспензія ортофосфату міді: змішують один об'єм розчину хлориду міді (№ 1) з двома об'ємами ортофосфату натрію і додають два об'єми боратного буферного розчину (суміш готують перед використанням);
- ✓ 1 н. розчин NaOH ;
- ✓ 80%-ва оцтова кислота: 77,44 мл крижаної оцтової кислоти доводять дистильованою водою до об'єму 100 мл;
- ✓ Розчин тимолфталейну: 0,25 г тимолфталейну розчиняють у 100 мл ректифікованого спирту;
- ✓ Йодид калію;
- ✓ 0,01 н. тіосульфату натрію (готують перед використанням з 0,1 н. розчину);
- ✓ Розчин крохмалю: збовтують 1 г розчиненого крохмалю в 5 мл дистильованої води; розчин вливають (невеликими порціями) у насичений розчин KCl (80 мл) і кип'ятять упродовж 5 хв, охолоджують до кімнатної температури, переводять у мірну колбу на

100 мл і доводять насиченим розчином KCl до мітки. Розчин крохмалю повинен бути нейтральний (рН 7,0).

Умови проведення досліду. 1–2 мл (10, якщо це фільтрат культуральної рідини) розчину, доведеного до нейтральної реакції, наливають у мірну колбу на 25 мл і додають 1-2 краплі тимолфталейну і по краплях 1 н. розчин NaOH до блідо-синього кольору. Потім у колбу додають 10–15 мл суспензії ортофосфату міді у боратному буфері, після цього доводять вміст колби до мітки дистильованою водою. Гарно збовтують і фільтрують через складчастий фільтр з малопористого фільтрувального паперу або ж центрифугують.

Фільтрат повинен бути зовсім прозорий, бо за наявності частинок осаду завищується кінцевий результат.

5–10 мл фільтрату відбирають у конічну колбу або у фарфорову чашку, додають 0,25–0,5 мл 80 % оцтової кислоти, 0,2–0,4 г KI. Йод, що виділився, відтитровують 0,01 н. розчином тіосульфату натрію $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, додаючи в кінці титрування 1-4 краплі крохмалю до зникнення синього кольору. Паралельно проводять контрольний дослід, де замість досліджуваного розчину беруть дистильовану воду. В підсумку, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{a - v \cdot 0,28}{n}$$

де X – вміст амонійного азоту, мг/л; а – кількість 0,01 н. розчину тіосульфату натрію, витрачена на титрування дослідного зразка, мл; v – кількість 0,01 н. розчину тіосульфату натрію, витрачена на титрування контролю, мл; n – кількість досліджуваного розчину, яку взята для аналізу, мл [53].

8.5 Ферментативна активність

Активність лігнін-пероксидази (LiP) та марганцевої пероксидази (MnP) аналізують у супернатанті культуральної рідини.

Активність LiP визначають колориметрично методом Tien and Kirk шляхом вимірювання збільшення поглинання на рівні 310 нм ($\epsilon_{310} = 9,300/\text{M см}$).

Реакційну суміш (2 мл), що містить 4 мМ вератрилового спирту в 10 мМ тартаратного буфера натрію (рН 3), інкубують з 100 мкл супернатанту

культуральної рідини при 30°C. Реакцію ініціюють додаванням відповідної кількості 0,2 мМ Н₂О₂. Контрольний варіант містить буфер замість вератрилового спирту. Одна одиниця активності LiP визначається як кількість ферментів, що каталізують утворення 1 мк/моль вератралдегіду в хвилину в умовах аналізу.

Активність MnP була виміряна шляхом моніторингу окислення 1 мМ MnSO₄ в 50 мМ малонатного буфера натрію (рН 4,5) в присутності 0,1 мМ Н₂О₂, через збільшення поглинання при 468 нм ($\epsilon_{468} = 49,600/\text{M cm}$). Одна одиниця активності MnP визначалася як кількість ферменту, необхідного для отримання збільшення поглинання одного в хвилину на мілілітр реакційної суміші. Заготовки містили всі реагенти, крім MnSO₄ [54].

8.6. Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1.

Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кт 1.2 Очищення від пилу і механічних часточок	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Стиснення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	P=0,35–0,5 МПа t=200 °C
Кт 1.4 Охолодження та видалення вологи	Охолоджене повітря	Термометр технічний	Під час проведення операції	t = 25-40°C W=50-70°
Кт 1.5 Стабілізація та нагрівання	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 60 °C
Кт 1.6 Очищення в головному фільтрі	Очищене повітря	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на тиждень	E = 99,92 %

Кт 1.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на місяць	E = 99,9999 %
Кх 2.1 Підкислення стічної води перед стерилізацією	Перевірка концентрації	Хімічний метод	Перед початком виробничого циклу	pH-6
Кт, Км 3.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 112 °C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 112 °C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 112 °C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 112 °C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.5.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 112 °C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти

Кт, Км 3.6.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$ $t = 112 \text{ }^\circ\text{C}$ $\tau = 30 \text{ хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 Підтримання колекційної культури	Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час збереження, мікробіологічний контроль після збереження	$t = 4 \text{ }^\circ\text{C}$ пересів 1 раз на 2 місяці відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	$t = 30^\circ\text{C}$, $\tau = 72 \text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.3 Вирощування культури на агаризованому середовищі	Тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	$t = 30^\circ\text{C}$, $\tau = 72 \text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безпосередньо під час виробничого процесу.	$t = 30^\circ\text{C}$, $\tau = 72 \text{ год}$, 150 об/хв, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 4.5 Вирощування в інокуляторі 10л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН - метр мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	$t = 30^\circ\text{C}$, $\tau = 48 \text{ год}$, 100 об/хв, Відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км, 4.6 Вирощування в інокуляторі 63л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН - метр мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48$ год, 100 об/хв, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 4.7 Вирощування в інокуляторі 630л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН - метр мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48$ год, 100 об/хв, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 4.8 Вирощування в інокуляторі 6300л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН - метр мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48$ год, 100 об/хв, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 5.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація ферменту	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, непрямий метод визначення біомаси, Визначення активності	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 8 год	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $\tau = 144$ год, 100 об/хв., рН6, LiP: 0,0584; MnP: 0,078 ОД/мл Відсутність сторонньої мікробіоти

РОЗДІЛ 9. ОБГРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ

9.1 Виділення та очищення субстанції цільового продукту

Після процесу ферментації культуральне середовище містить мікроорганізми, продукти їх життєдіяльності, залишки культурального середовища, піногасники, розчинні та нерозчинні речовини. Цільовими продуктами біосинтезу можуть бути самі мікроорганізми або їх метаболіти, розчинені в культуральному середовищі або містяться в клітинах мікроорганізмів [55].

При виборі методу виділення та концентрування продукту мікробіологічного синтезу необхідно враховувати наступні фактори:

1. Фізико-хімічні властивості культуральної рідини.
2. Властивості виділеного продукту, такі як термолабільність, стійкість до різних хімічних агентів тощо.
3. Вимоги до кінцевої форми продукту, включаючи ступінь чистоти і ступінь концентрування.
4. Технологічні та техніко-економічні показники, такі як вихід продукту, продуктивність обладнання, необхідність подальшої обробки тощо.

Всі методи виділення продуктів мікробіологічного синтезу з культуральної рідини поділяють на дві групи [55]:

- Екстракція, іонний обмін, адсорбція, кристалізація – якщо цільовий продукт в розчині.
- Осадження, фільтрування, центрифугування, сепарування – якщо цільовий продукт у вигляді твердої фази.

					НУХТ БТЕК 04.03.38 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ритор І. А.			РОЗДІЛ 9. ОБГРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					68	83
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Оскільки, даний препарат буде використовуватись як природоохоронний, а саме для очищення стічних вод. Пропонуємо, максимально зменшити собівартість продукту. Кінцева форма препарату матиме вигляд концентрату культуральної рідини, розливої у ПЕТ пляшки до подальшої реалізації.

9.1.1 Концентрування препарату

Для виділення продуктів мікробного синтезу з нативного розчину або біомаси в промислових умовах вибір методів обмежений і визначається фізико-хімічними властивостями цих продуктів [56].

Концентрація ферментних препаратів є ключовою для їх ефективного використання у промисловості. Ось деякі з основних методів концентрування ферментних препаратів (найбільш оптимальні для нашого виробництва):

- Ультрафільтрація: метод базується на використанні мембран з відомими розмірами пор. Молекули ферментів перевищують розміри пор, тому вони залишаються на мембрані, тоді як решта розчину проходить через неї. Це дозволяє отримати більш концентрований розчин ферменту.
- Вакуумне випарювання: метод концентрування рідких розчинів нелетких речовин шляхом часткового видалення розчинника під час кипіння рідини в умовах вакууму. Використання вакууму дозволяє проводити процес при нижчих температурах, що запобігає руйнуванню речовин, які можуть розкладатися.

Далі наведена таблиця 9.1, та загальна характеристику оптимальних методів концентрування.

Переваги та недоліки методів концентрування

Спосіб	Переваги	Недоліки
Ультрафільтрація	-концентрування та очищення	-відносно габаритне обладнання; -вартість обладнання;
Вакуум-випарювання	-велика продуктивність; -відносно малі габарити; -невисока вартість кінцевого продукту	-складність обладнання; -час проведення процесу

Вибір оптимального методу залежить від конкретних потреб дослідження або виробництва. Вакуумне – випарювання є оптимальним методом співвідношення часу проведення даного процесу, а також вартості кінцевого продукту.

9.1.2. Фасування готового концентрату

Для зменшення собівартості готового препарату, приймаємо рішення про розлив концентрату у ПЕТ пляшки. На *рисунку 3.1* загальний вигляд тари для розливу.



Рис. 9.1 ПЕТ пляшка – загальний вигляд

9.2. Розрахунок матеріальних потоків післяферментаційних процесів.

Оскільки, даний природоохоронний препарат пропонується виготовляти у вигляді сконцентрованого розчину після виробничого біосинтезу, то основне значення для підрахунку матеріальних потоків є – саме об'єм культуральної рідини.

1. Вихідні дані:

- a. об'єм культуральної рідини з однієї ферментації - $V_{кр} = 35876$ л/цикл;
 b. На виході маємо отримати концентрований розчин 60% (від загального початкового об'єму):

$$35876 \text{ л} - 100\%$$

$$X \text{ л} - 60\%$$

$$X = \frac{60\% \times 35876 \text{ л}}{100\%} = 21526 \text{ л (кінцевий об'єм сконцентрованого засобу).}$$

2. Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці 3.4

Таблиця 9.2

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіям

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіям			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (разом 4%)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 1 Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 1 Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	35876 л	-	35876 л	Збірник культуральної рідини об'ємом 50000л
ТП 2 Вакуум – випарювання КР (концентрування)						
2	ТП 2 Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина	35876 л	-	21526 л	Вакуум – випарний апарат
		Концентрат	-	3%	20880 л	В збірник об'ємом 25000 л
ПМВ 3 Пакування, маркування, відвантаження						
3	ПМВ 3 Пакування, маркування, відвантаження	Розлив концентрату у пляшки	20880 л	1%	20671	Розлив у ПЕТ пляшки (2, 5 та 10 л)

РОЗДІЛ 10. ЕКОЛОГІЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА ПЕРОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСУ ФЕРМЕНТІВ *GEOTRICHUM CANDIDUM*

Аналіз технологічної схеми проєктованого біотехнологічного виробництва.

Рідкі відходи: рідкі відходи підприємства представляють собою промивну воду з залишками миючих засобів, що є виробничим відходом.

Газоподібні відходи: газоподібні відходи представляють собою повітря після культивування бактерій.

2. Розрахунок об'ємів стічних вод. Визначте загальний об'єм стічних вод, що утворюється в процесі виробництва. Зверніть увагу на:

- Водоспоживання виробничих потужностей.
- Можливі джерела забруднення води
- Типи стічних вод, які утворюються на виробництві.

Залишки мийно-дезінфікуючих засобів. Відомо, що для миття та дезінфекції обладнання за допомогою мобільної циркуляційної СІР-мийки необхідно приготувати робочі розчини із розрахунку 20-30% від об'єму ємкісного обладнання.

Відповідно до специфікації обладнання з курсового проєкту, з ємкісного обладнання маємо: збірник-змішувач 10л, 100л, 1000л, 50000; інокулятор на 10л, 63л, 630, 6300л для підготовки посівного матеріалу, та ферментер на 63000 л. Таким чином, потрібно розрахувати геометричний об'єм ємностей:

$$V_{\text{ємностей}} = 10+100+1000+50000+63+630+6300+63000=121113\text{л}$$

Тоді об'єм мийно-дезінфікуючих засобів становитиме:

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0,2 = 121113 \times 0,2 = 24223 \text{ л або}$$

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0,3 = 121113 \times 0,3 = 36334 \text{ л}$$

					НУХТ БТЕК 04.03.38 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ритор І. А.			РОЗДІЛ 10. ЕКОЛОГІЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА ПЕРОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСУ ФЕРМЕНТІВ <i>GEOTRICHUM CANDIDUM</i>	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Красінько В.О.					72	83
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
					72			

Приймаємо, що об'єм відпрацьованих залишків засобів дорівнює об'єму цих засобів, тобто 36334 л.

Відпрацьована вода після ополіскування обладнання. Об'єм води для ополіскування, так само як і мийно-дезінфікуючого розчину, становить 20-30% від об'єму ємнісного обладнання. Як розраховано вище, даний параметр дорівнює 36334 л.

Таким чином, в сумі орієнтовна кількість стічних вод за один цикл виробництва становитиме: 36334 л + 36334 л = 72668 л.

Оскільки цільовий продукт є сконцентрованою культуральною рідиною, рідких відходів після стадії ферментації у вигляді залишків культуральної рідини утворюватись не буде.

Середні витрати стічних вод підприємства

Оскільки стічна вода є компонентом поживного середовища, а сам кінцевий продукт є фактично концентратом культуральної рідини, то показник витрат на одиницю продукції відсутній. Натомість, у нас є розраховано витрати мийно - дезінфікуючих розчинів, наведено вище, які використовуємо на даному виробництві. Знаючи ці значення далі наведено підрахунок витрат стічних вод за одну добу даним підприємством

Середні за зміну витрати виробничих стічних вод, м³/добу, визначають за формулою:

$$Q_{\text{в}} = q_{\text{е}} \times n$$

$$Q_{\text{в}} = 72688 \text{ (л/цикл)}$$

Для перерахунку витрат стічних вод за добу необхідно врахувати час виробничого циклу

$$(72688 \times 24) / \tau_{\text{циклу}} = (72688 \times 24) / 155 = 11255 \text{ л/добу} \approx 11,3 \text{ м}^3/\text{добу}$$

Середні за зміну витрати побутових стічних вод:

$$Q_{\text{н}} = q_{\text{н}} \times N$$

де $q_{\text{н}}$ - норма відведення побутових стічних вод в м³/зм на одного робітника, яку приймають для гарячих цехів 0,045 м³/(зм люд), для холодних - 0,025 м³/(зм люд); N - кількість робітників, що працюють в зміну. Для

перерахунку даного показника на добу необхідно помножити на кількість змін на добу та на 24 і поділити на тривалість однієї зміни.

$$Q_n = 0,025 \text{ м}^3/(\text{зм люд}) \times 8 \text{ людей} = 0,2 \text{ м}^3/\text{зм}$$

Перерахунок даного показника на добу:

$$(0,2 \times 3 \times 24)/8 = 1,8 \text{ м}^3/\text{добу},$$

де 3 - кількість змін на добу;

24 - кількість годин у добі;

8 - тривалість однієї зміни, год.

Загальна витрата атмосферних стічних вод, що утворюються на підприємстві (Q_a). Орієнтовно можна прийняти у об'ємах у 5-30 разів меншому за витрати побутових стічних вод:

$$Q_a = Q_{\text{п}}/5 = 0,2/5 = 0,04 \text{ (м}^3/\text{добу)}.$$

Загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві (Q):

$$Q = Q_{\text{в}} + Q_{\text{п}} + Q_a = 72688 + 1,8 + 0,04 = 72689,84 \text{ м}^3/\text{добу}.$$

На основі вище написаного, отримаємо такі дані: за добу кількість стічних вод підприємства становить 72689,84 м³. Задля очищення такої кількості води можемо скористатись системою- Анаеробним Мембранним Біореактором (AnMBR).



Рис. 10.1. Анаеробний мембранний біореактор[61].

3. Розрахунок об'ємів газоподібних відходів. Оцініть види та кількість газоподібних відходів, що утворюються:

- Викиди в атмосферу від технологічного обладнання.

- Можливі джерела забруднення повітря (CO_2 , аміак, SO_2 , клітини мікроорганізмів, тощо).
- Технології для зменшення викидів.

Газоподібні відходи біотехнологічних виробництв утворюються на етапі отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу у вигляді відпрацьованого повітря, що містить аерозоль клітин продуцента. Об'єми відпрацьованого повітря приблизно дорівнюють об'ємам аераційного повітря. Відпрацьоване повітря через колектори подається на головні фільтри для очищення та знешкодження.

Тривалість процесу отримання посівного матеріалу складає 192 год, а виробничого біосинтезу – 144 год, а для аерації середовища використовують стерильне повітря зі швидкістю аерації – 1 л/лПС·хв і у виробничому приміщенні встановлено 4 ферментаційні апарати (4 посівні апарати об'ємом 10 л, 63л, 630л, 6300л) і ферментер 63 м³, коефіцієнт заповнення усіх апаратів дорівнює 0,6), приблизний об'єм відпрацьованого повітря за 1 цикл ферментації буде становити: $(10+63+630+6300) \times 0,6 \times 192 \times 60 + (63000 \times 0,6 \times 144 \times 60) = 374996736\text{л}$ (374997м³).

На основі вище написаного: повітря, яке потрапляє у атмосферу повинно бути чистим від можливих клітин бактерій. Задля цього можемо скористатися біоскрубером. Він поєднує переваги циклону і біофільтра. На першому етапі токсичні речовини, присутні у повітрі, разом із киснем розчиняються у воді. Цей процес призводить до очищення повітря, а забруднена вода направляється на подальше очищення.

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА:

1. Lamia Ayed, Nedra Asses, Nadia Chammen, Moktar Hamdi. Improvement of green table olive processing wastewater decolorization by *Geotrichum candidum*. 2016. 17322-17332 p.
2. Martinez A . Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. 2002. 425 p.
3. Wang X., Yao B., Su X. Linking Enzymatic Oxidative Degradation of Lignin to Organics Detoxification. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19, no. 11. P. 3373. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms19113373>
4. Ahmed M Abdel-Hamid , Jose Solbiati, Isaac K O Cann. Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. 2013. 1-18 p.
5. Adarsh Kumar and Ram Chandra. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. 2020. 3170 p.
6. *Irpex lacteus* , a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation / Č. Novotný et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000. Vol. 54, no. 6. P. 850–853. URL: <https://doi.org/10.1007/s002530000432>
7. Spectral characterization of manganese peroxidase, an extracellular heme enzyme from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. / Y. Mino et al. *Journal of Biological Chemistry*. 1988. Vol. 263, no. 15. P. 7029–7036. URL: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)68599-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)68599-0)
8. Manganese / D. C. Weatherburn et al. *Comprehensive Coordination Chemistry II*. 2003. P. 1–125. URL: <https://doi.org/10.1016/b0-08-043748-6/04123-2>
9. *Geotrichum candidum*. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.adelaide.edu.au/mycology/fungal-descriptions-and-antifungal-susceptibility/hyphomycetes-conidial-moulds/geotrichum-candidum>
10. Eliskases-Lechner F., Ginzinger W. The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneforms. *Le Lait*. 1995. Vol. 75, no. 6. P. 571–584. URL: <https://doi.org/10.1051/lait:1995644>

11. *Geotrichum candidum*. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/name/Geotrichum%20candidum>

12. Очищення стічних вод дріжджового виробництва [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.ecoflock.com.ua/ua/ochishhennya-stichnih-vod-drizhdzhovogo-virobnicztva.html>

13. Очищення стічних вод дріжджових заводів / [Каранов Ю., Кошель М., Добриловський Б., Башмакова С.] // Харчова і переробна промисловість. – 2000. – №7. – С. 22–23.

14. Красінько В. О. Шляхи інтенсифікації очищення стічних вод харчових виробництв від азотовмісних сполук та сапонінів / [Красінько В. О., Тетеріна С. М., Скокун Т. М.] // Економіка. Екологія. Управління : зб. наук. пр. – 2012. – № 1. – С. 157–162.

15. Поштаренко, А. В. "Вплив харчової промисловості на екологічну безпеку природних вод." Проблеми екологічної біотехнології 2 (2015).

16. Falade, A. O., Nwodo, U. U., Iweriebor, B. C., Green, E., Mabinya, L. V., & Okoh, A. I. (2017). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *MicrobiologyOpen*, 6(1), e00394. doi.org/10.1002/mbo3.394

17. Ayed L., Asses N., Chammem N., Hamdi M. Improvement of green table olive processing wastewater decolorization by *Geotrichum candidum*. *Desalination and Water Treatment*. 2015, 57 (37): 17322 – 17332. doi: 10.1080/19443994.2015.1084596

18. «Ензим» запустив виробництво мінеральних добрив [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://vgoles.ua/news/enzym-zapustyv-vyrobnystvo-mineralnyh-dobryv_3889.html

19. Лебединець, В. О. "Підготовка персоналу підприємства з виробництва лікарських засобів при впровадженні та в умовах функціонування системи управління якістю." *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації* 1 (2014): 28-35. [Електронний ресурс] //Режим доступу:https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/5279/1/%D0%A1%D1%82%D1%80%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%86%D1%8B%20%D0%B8%D0%B7%20UEC_1_2014-5.pdf

20. Ю.В. Карлаш. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В.Карлаш - К: НУХТ, 2013. – 143 с.

21. А. С. Пастушенко, Н. С. Храмов, О. І. Норинський. ПРОЦЕСИ І АПАРАТИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ВИРОБНИЦТВА. Миколаїв, 2016. URL: https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/2363/1/Protsesy_i_aparaty_biotekhnolohichnoho_vyrobnytstva.pdf

22. Ферментери для стерильного культивування мікроорганізмів. Vuzlit. URL: https://vuzlit.com/1556895/fermenteri_sterilnogo_kultivuvannya_mikroorganizmiv.

23. Shulga, M. O., N. Hrehirchak, and O. Slobodyan. "ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ САНІТАРНОЇ ПІДГОТОВКИ ПРИМІЩЕНЬ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА АМІНОКИСЛОТИ ТРИПТОФАНУ." *SWorldJournal* 11-01 (2022): 35-40. DOI: 10.30888/2663-5712.2022-11-01-054 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://sworldjournal.com/index.php/swj/article/view/swj11-01-054/2237>

24. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.

25. Boutrou R., Guéguen M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology*. 2005. Vol. 102, no. 1. P. 1–20. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.028>

26. Hudcová A., Valík Ľ., Liptáková D. Quantification of *Geotrichum candidum* growth in co-culture with lactic acid bacteria. *Czech Journal of Food Sciences*. 2010. Vol. 27, Special Issue 2. P. 18–27. URL: <https://doi.org/10.17221/205/2009-cjfs>

27. Таблиця класифікації повітряних фільтрів [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://envirco.in.ua/filterklass.html>

28. Фільтруючі елементи патронні типу ФЕП [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://folter.com.ua/catalog/fep>

29. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. - К.: НУХТ, 2009. - 336 с.
30. Ayed L., Asses N., Chammem N., Hamdi M. Improvement of green table olive processing wastewater decolorization by *Geotrichum candidum*. *Desalination and Water Treatment*. 2015, 57 (37): 17322 – 17332. doi: 10.1080/19443994.2015.1084596
31. Фільтруючий матеріал G4 від NEW FILTER [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtruyuchiyy-material-g4.html>
32. КОМПРЕССОРЫ [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://kompressor.kiev.ua/katalog/porshnevyye-kompressory/vkp-f-seriya-industrial76.html>
33. ТЕПЛООБМЕННИКИ ДЛЯ КОТЛОВ, ВЕНТИЛЯЦИИ, КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://termoprom.com.ua/teploobmenniki/po-naznacheniyu/teploobmenniki-dlya-kotlov-ventilyacii-kondicionirovaniya>
34. Ресивер[Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://harpromteh.all.biz/uk/resyver-povitryanyj-900l-rv-900800-04-resyver-g632669>
35. Система підігріву повітря [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php
36. Кишенькові фільтри F5 для вентиляції від NEW FILTER [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/kishenkovi-filtri-f5-dlya-ventilyatsiyi.html>
37. Ємності, змішувачі, реактори з нержавіючої сталі під замовлення [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1115370771-emkosti-smesiteli-reaktory.html?&primelead=MC44NQ>

38. Реактор мобільний 100л AISI 304 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1254660370-reaktor-mobilnyj-100l.html?&primelead=MC44NQ>
39. Реактор 1300 літрів [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1151925671-reaktor-1300-litriv.html> ь
40. Реактор з нержавіючої сталі 50000 л [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/5-L-Dubbel-Wall-Stainless-Steel_1600891824259.html?spm=a2700.galleryofferlist.p_offer.d_title.64646154hIhQVn&s=p
41. Комбінований дозатор [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://sweda.com.ua/ua/produksiya/kombinirovannyi-dozator/>
42. Насос Grundfos UPS [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://modernsys.com.ua/tsirkulyatsionnyu-nasos-grundfos-ups-25-60-130-19121.html>
43. Лабораторний реактор [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://promvit.com.ua/laboratornij-reaktor-robochim-ob%e2%80%b2yemom-20-l-rc-20-00-000-ps/>
44. Реактор-ферментер РФ-60 для біологічних препаратів [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-fermenter-rf-60/>
45. Ферментер 500 [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://promvit.com.ua/fermenter-500/>
46. Біореактор клітинної культури 10000 л [Електронний ресурс] //Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/International-Technology-Cell-Culture-Bioreactor-10000l_1600984897814.html?spm=a2700.galleryofferlist.p_offer.d_title.45fd3fd9L70yyW&s=p
47. Стерилізуючі фільтри для газів [Електронний ресурс] //Режим доступу:

<http://novafilter.tech/products/f%D1%96ltri/steril%D1%96zuyushh%D1%96/dlya-gaz%D1%96v>

48. Fermenter Fermentation Tank 1000 L 5000l 100hl 15000 L 1000000 L Equipment Beer [Электронний ресурс] //Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/1000000-L-Fermenter-Fermenter-Fermentation-Tank_1600112744941.html?spm=a2700.galleryofferlist.p_offer.d_title.63b668c95NwQWg&s=p

49. Abdul Sattar, Irfan Ali Mirza. Antimicrobial activity of Tigecycline against extended spectrum Beta lactamase producing Gram Negative Rods in tertiary care setting. 2010. P. 33. URL: <https://doi.org/file:///C:/Users/Admin/Downloads/Antimicrobialactivityoftigecyclinea gainstGNRIDJP.pdf>.

50. Improvement of green table olive processing wastewater decolorization by *Geotrichum candidum* / L. Ayed et al. *Desalination and Water Treatment*. 2015. Vol. 57, no. 37. P. 17322–17332. URL: <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1084596>

51. Kumar V., Gill K. D. Estimation of Blood Glucose Levels by Glucose Oxidase Method. *Basic Concepts in Clinical Biochemistry: A Practical Guide*. Singapore, 2018. P. 57–60. URL: https://doi.org/10.1007/978-981-10-8186-6_13

52. Визначення глюкози глюкозооксидазним методом [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://meduk.net.ua/archives/23315>

53. Технологія мікробного синтезу лікарських засобів. Лабораторний практикум. [Електронний ресурс]. – 2022. – Режим доступу до ресурсу: <https://cde.nuft.edu.ua/mod/resource/view.php?id=534577>

54. Improvement of green table olive processing wastewater decolorization by *Geotrichum candidum* / L. Ayed et al. *Desalination and Water Treatment*. 2015. Vol. 57, no. 37. P. 17322–17332. URL: <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1084596>

55. Концентрування та висушування біопрепаратів [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://moyaosvita.com.ua/biologija/koncentruvannya-ta-visushuvannya-biopreparativ//>

56. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс : Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с. [Електронний ресурс] // Режим доступу: file:///C:/Users/volod/Downloads/Karlash_2022_2.pdf

57. Сода каустична [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1649369789-soda-kausticheskaya-5kg.html?&primelead=My42>

58. . Біомой [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1377979018-biomoj.html>

59. . Дезекон [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1537967088-dezekon-flakon-dozator.html>

60. . Хлорантоїн [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p276027906-hlorantoin.html>

61. Анаеробний мембранний біореактор [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.evoqua.com/siteassets/documents/products/anaerobic/adianmbrbr.pdf>