

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології та біофармації

ЗАТВЕРДЖУЮ

в.о. завідувача кафедри

_____ **Валентина ПОЛІЩУК**

« 10 » червня 2023 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Технологія виробництва цитрату кальцію. Дільниця біосинтезу»

Виконав (-ла):

студент (-ка) IV курсу, групи БТ-91

Шопова Злата Степанівна _____

Керівник:

Доцент кафедри промислової біотехнології та біофармації, к.б.н.

Дзигун Лариса Петрівна _____

**Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:**

Доцент кафедри біотехніки та інженерії, к.т.н., доц.

Шибецький Владислав Юрійович _____

Рецензент:

Ст.викладач каф. біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології, к.т.н.

Левтун Ігор Ігорович _____

**Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.**

Студент(-ка) _____

Київ – 2023 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

[illegible]

				ДП БТ91 00.000.00		
	ПБ	Підп.	Дата			
Розробн.	Шопова З.С.			Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Керівн.	Дзигун Л.П.				1	166
Консульт.	Шибецький В.Ю.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПББФ Гр. БТ-91	
Н/контр.						
Зав.каф.	Поліщук В.Ю.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології та біофармації

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

в.о. завідувача кафедри

_____ Валентина ПОЛЩУК

« 19 » квітня 2023 р.

ЗАВДАННЯ
на дипломний проєкт студенту
Шоповій Златі Степанівні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва цитрату кальцію. Дільниця біосинтезу», керівник проєкту Дзигун Лариса Петрівна, к.т.н, доц., затверджені наказом по університету від «22» травня 2023 р. № 1888-с
2. Термін подання студентом проєкту 10.06.2023 р.
3. Вихідні дані до проєкту: кінцевий продукт – кристалічний цитрат кальцію; ферментер для промислового культивування - об'єм 5 м³; спосіб очистки продукту – осадження та сушіння.
4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва цитрату кальцію; проаналізувати методи створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання промислового продуценту, що використовується у проєкті; визначити фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, описати контрольні

точки, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Шибєцький В.Ю. доц. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	19.04.23-26.04.23 р.	
2.	Біохімічні основи виробництва	27.04.23-04.05.23 р.	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	05.05.23-12.05.23 р.	
4.	Технологічна частина	13.05.23-20.05.23 р.	
5.	Складання апаратурної схеми	13.05.23-20.05.23 р.	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	21.05.23-25.05.23 р.	
7.	Оформлення пояснювальної записки	25.05.23-30.05.23 р.	
8.	Подання дипломного проєкту на рецензування	31.05.23-05.06.23 р.	
9.	Подання дипломного проєкту та рецензії до екзаменаційної комісії	до 10.06.23 р.	

Студент

Злата ШОПОВА

Керівник

Лариса ДЗИГУН

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва цитрату кальцію.
Дільниця біосинтезу»

Київ – 2023 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт містить 177 ст., 14 рисунків, 8 таблиць, 3 креслення та 137 посилань.

Метою роботи є розробка технології виробництва кристалічного цитрату кальцію. З метою підвищення біосинтетичної активності продуцента *Aspergillus niger* запропоновано використовувати індукований мутагенез у вигляді обробки УФ-випромінюванням (фізичний метод).

На основі аналізу літератури щодо досліджень продуцента лимонної кислоти *Aspergillus niger* було підібрано поживне середовища для процесу біосинтезу, а також умови, в яких відбувається максимальний синтез продукту.

Було досліджено культуральні та фізіолого-біохімічні характеристики продуцента та визначено, що для синтезу продукту провідним параметром є достатня аерація, внаслідок чого було обрано барботер та механічний перемішуючий пристрій.

Було розроблено технологічну та апаратурну схему отримання цитрату кальцію, а також розраховано та наведено креслення загального виду ферментеру для дільниці біосинтезу. Запропоновано пакувати готовий цитрат кальцію у багатошарові крафт-мішки з поліетиленовим вкладишем на 25 кг.

ЦИТРАТ КАЛЬЦІЮ, ЛИМОННА КИСЛОТА, *ASPERGILLUS NIGER*, МЕЛЯСА, ФЕРМЕНТЕР, БАРБОТЕР, ВАПНЯНЕ МОЛОКО

					ДП БТ-9122.00 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Реферат	Стадія	Арк.	Акрушів
Розроб.		Шопова З. С.						177
Конс.		Шидецький В. Ю.						
Керівн.		Дзигун Л. П.						
Затв.								

ABSTRACT

The diploma project consists of 177 pages, 14 figures, 8 tables, 3 drawings, and 137 references.

The aim of the work is to develop a technology for the production of crystalline calcium citrate. In order to enhance the biosynthetic activity of the producer, *Aspergillus niger*, induced mutagenesis through UV irradiation (physical method) is proposed to be used.

Based on a literature review on the studies of the citric acid *producer Aspergillus niger*, nutrient media for the biosynthesis process and conditions for maximum product synthesis were selected.

Cultural and physio-biochemical characteristics of the producer were investigated and it was determined that sufficient aeration is the key parameter for product synthesis. Therefore, a sparger and a mechanical stirring device were chosen.

A technological and equipment scheme for obtaining calcium citrate has been developed, and a general view drawing of the fermenter for the biosynthesis section has been calculated and provided. It is proposed to package the final calcium citrate in multi-layered Kraft bags with a polyethylene liner, weighing 25 kg.

CALCIUM CITRATE, CITRIC ACID, *ASPERGILLUS NIGER*, MOLASSES, FERMENTER, SPARGER, CALCIUM MILK

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						7
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ЗМІСТ

ВСТУП	10
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛІЧНОГО АГЕНТА	13
1.1. Основні промислові продуценти.....	13
1.2. Систематичне положення	17
1.3. Морфологічно-цитологічні ознаки	18
1.4. Культуральні ознаки.....	22
1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	23
1.6. Поширення в природі	32
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	34
2.1 Характеристика цільового продукту.....	34
2.2 Схема хімічних перетворень.....	36
2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології	41
2.4 Методи контролю якості цитрату кальцію.....	43
2.5 Методи очистки цільового продукту	46
2.6 Вплив цільового продукту на біохімічні процеси організму людини.....	47
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	50
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	50
3.1.1 Особливості геному <i>Aspergillus niger</i>	50
3.1.2 Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу.	53
3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту	55

					ДП БТ-9122.00 ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Шопова З. С.			Зміст	Стадія	Арк.
Конс.		Шибєцький В. Ю.					177
						КПІ ім. І. Сікорського	
Керівн.		Дзигун Л. П.				ФБТ	
Затв.							

3.2.1 Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів	55
3.2.2 Використання індукованого мутагенезу	56
3.2.3 Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно-активних речовин.....	58
3.2.4 Регуляція метаболізму у мікробній клітині	59
3.2.5 Використання методів генної та клітинної інженерії	62
3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі	63
РОЗДІЛ 4 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	66
4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва	66
4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	68
4.3 Опис технологічного процесу	74
4.4 Матеріальний баланс	94
4.5 Контроль виробництва	102
РОЗДІЛ 5 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	132
5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	132
5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки	141
Конструктивний розрахунок	142
Тепловий розрахунок	150
5.3 Вибір загальнозаводського обладнання	157
5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища	158
ВИСНОВКИ.....	163
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	165

ВСТУП

У сучасному світі людство все частіше зустрічається з нестачею вітамінів та мікроелементів через прискорений ритм життя та підвищений рівень стресів. Незбалансоване харчування, однотипні продукти та бажання «швидко перекусити» призводять до численних проблем зі здоров'ям. І якщо вживати вітаміни як добавки стало нормою, то іншими структурними елементами активно нехтують.

Кальцій є одним з найважливіших мікроелементів для організму людини: він сприяє формуванню і зміцненню кісткової тканини; бере участь у передачі нервових імпульсів завдяки вивільненню нейромедіаторів; відповідає за скорочення м'язів; грає ключову роль у згортанні крові. Зазвичай для поповнення пулу Кальцію в організмі вживають кисломолочні продукти, але популярності набирають дієтичні добавки з його солями. Найбільш поширеними формами Кальцію є глюконат, карбонат, лактат, цитрат. Вони всі відрізняються за вмістом елементарного кальцію та біодоступністю. Лактат і глюконат не є практичними в якості пероральних добавок зважаючи на низький вміст Са, через що потребують значну дозу препарату. Згідно із загальнодоступними даними, Кальцій із карбонату та цитрату засвоюється майже однаково. Втім засвоєння з цитрату є більш доцільним, бо не залежить від рН шлункового соку, а отже – від часу прийому їжі, в той час як засвоєння Кальцію з карбонату ефективно лише під час харчування, коли значення кислотності шлунку нижче. Окрім того, цитрат кальцію можна використовувати як харчову добавку для регулювання кислотності, стабілізації продуктів і забезпечення їх консистенції. Ця субстанція знаходить своє місце у кондитерській промисловості, морозиві, напоях, тощо.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ	Стадія	Арк.	Акрушів
Розроб.		Шопова З. С.					10	177
Конс.		Шидецький В. Ю.				КПІ ім. І. Сікорського		
						ФБТ		
Керівн.		Дзигун Л. П.						
Затв.								

Також його застосовують для утворення сиру в якості коагулянта: цитрат кальцію допомагає відділити сироватку від твердої фракції.

Цитрат кальцію також активно використовується у косметичній промисловості завдяки додаванню його до складу зубних паст, шампунів, кремів та лосьйонів для стабілізації рН, консистенції. Він також може зустрічатись у складі кормів для тварин, вині (відповідає за його стабілізацію) чи у технології водоочищення завдяки своїм коагулюючим можливостям.

Цитрат кальцію – це кальцієва сіль лимонної кислоти, яку отримують шляхом культивування мікроміцета *Aspergillus niger* на м'ясному середовищі.

Такий метод отримання є екологічним та економічно вигідним, оскільки м'яса є побічним продуктом при виробництві цукру на цукрових заводах.

Серед вітчизняних виробників цитрату кальцію провідне місце займає ВАТ «Фармак», а серед іноземних – *Solgar Inc, Bluebonnet Nutrition, Mason Natural*. Зважаючи на низький рівень розвитку даної сфери в Україні, дослідження та модернізація технологій дійсно є актуальним напрямком розвитку фармацевтики. Великий внесок має генетична модифікація та пошук нових штамів *A. niger*, які дозволять збільшити вихід лимонної кислоти та підвищити продуктивність підприємств.

Метою даної роботи є аналіз типових технологій виробництва цитрату кальцію на основі літературних джерел та пошук оптимальних параметрів культивування для найбільш ефективних штамів, а також розробка технології виробництва цитрату кальцію на основі м'яса як відходу промислового виробництва цукру.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

1. Охарактеризувати біологічний агент з урахуванням систематичного положення, морфолого-цитологічних, культуральних та фізіолого-біохімічних ознак, а також обґрунтування вибору продуцента;

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						11
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2. Розглянути біохімічні основи виробництва: характеристику цитрату кальцію, схему біохімічних перетворень при його отриманні, компонентний склад поживного середовища та методи очистки кінцевого продукту;
3. Навести параметри культивування продуцента;
4. Дослідити методи отримання промислового продуцента з наведенням типової схеми його отримання;
5. Надати характеристику сировині, матеріалам та кінцевому продукту, навести опис технологічного процесу, контрольні точки виробництва, розрахувати матеріальний баланс, скласти технологічну та апаратурну схеми виробництва;
6. Розрахувати та спроектувати виробничий ферментер для промислового отримання напівпродукту.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						12
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

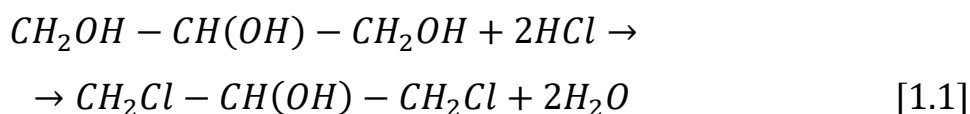
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Основні промислові продуценти

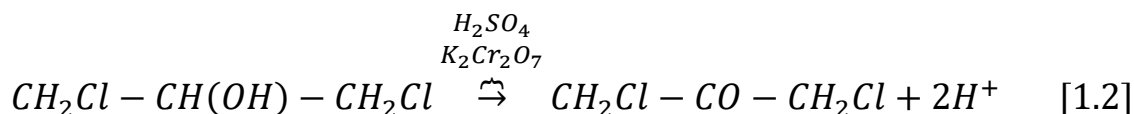
Цитрат кальцію отримують завдяки виділенню лимонної кислоти з культуральної рідини методом осадження іонами кальцію. Проте виділенню завжди передує етап біосинтезу лимонної кислоти, який може здійснюватися як хімічним, так і біотехнологічним способами за участі різних продуцентів.

Виробництво лимонної кислоти посідає друге місце в світі за тонажем, поступаючись лише етиловому спирту. Спершу її одержували екстракцією з лимонів або інших цитрусових, проте наприкінці XIX століття обертів почала набирати саме біотехнологічна галузь. Незважаючи на активний розвиток органічного синтезу перевага надавалась саме біотехнологічному методу за участю певних видів грибів [1].

Одним з хімічних методів отримання цитрату є ряд органічних реакцій перетворення гліцерину. Оскільки гліцерин можна розглядати як тригідроксипропан, а лимонну кислоту – як гідроксипропантрикарбонову кислоту, то для трансформації гліцерину в цитрат необхідно замінити дві гідроксильні групи на карбоксильні. Це можна зробити обробкою гліцерину соляною кислотою (див. рівняння 1.1):



На утворений дихлоргліцерин далі діють сірчаною кислотою та дихроматом калію з утворенням дихлорацетону (див. рівняння 1.2):

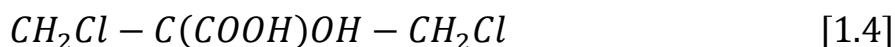


					ДП БТ-9122.00 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Шопова З. С.				Розділ 1. Характеристика біологічного агента	Стадія	Арк.	Акрушів
Конс.	Шидецький В. Ю.						13	177
						КПІ ім. І. Сікорського		
Керівн.	Дзигун Л. П.					ФБТ		
Затв.								

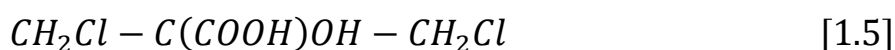
Дихлорацетон в свою чергу змішують з гідроціанідовою кислотою, внаслідок чого отримують дихлоацетон ціаногідрин, зображений у формулі 1.3:



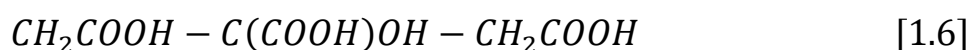
Після обробки соляною кислотою та натрієвою сіллю сапонвіну утворюється відповідна кислота (формула 1.4)



Після додавання ціаніду калію з утворенням диціанідової сполуки, наведеної у формулі 1.5:



При розкладанні за допомогою соляної кислоти цей диціанід утворює лимонну кислоту (формула 1.6):



Проте навіть сам автор [2] такого варіанту синтезу зазначає, що органічний синтез цитрату не є доцільним через дорогу вартість реагентів та тривалість процесу. Окрім того, виробництво не є екологічно безпечним та може зашкодити здоров'ю людей.

З 1893 року почав набувати популярності біотехнологічний метод отримання лимонної кислоти на відходах цукрового виробництва – меляси (або патоки) за участі пліснявих грибів роду *Aspergillus*. Проте так само відомі менш ефективні технології з грибами роду *Candida* та *Yarrowia*.

Бактеріальні продуценти цитрату (або інших органічних кислот: оцтової, молочної, пропіонової і т.д.): *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Acetobacter*, *Gluconobacter* – не використовуються в промисловості через їхню низьку стійкість до підвищеної кислотності культуральної рідини з цитратом. Вони також потребують вищої температури для проведення процесу біосинтезу та складніших технологічних рішень для забезпечення асептичності [3, 4]. Гриби (в порівнянні з бактеріями) ростуть повільніше, потребують менших

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

температур середовища, можуть розвиватися у більш широких межах рН, [5, 6]. Зважаючи на розвинену ферментативну систему аеробного окиснення, грибові продуценти частіше застосовуються для отримання кислот, що входять до циклу Кребса (лимонної, яблучної, α -кетоглутарової, тощо) [7, 8, 9]. Опираючись на вищенаведені факти більш доцільно обирати продуцента лимонної кислоти серед грибних організмів.

Німецький ботанік Вемер у 1893 році спостерігав можливість отримання лимонної кислоти шляхом бродіння поживного середовища на цукрах з додаванням неорганічних солей з *Penicillium glaucum* [10]. Через два роки після цього відкриття було успішно виділено штами, здатні продукувати лимонну кислоту: *Citromyces spp* (зараз *Penicillium*). Однак виробництво лимонної кислоти з використанням *Penicillium spp*. не набуло великої популярності в промисловій практиці через значне забруднення навколишнього середовища і тривалий процес ферментації [11]. Рід *Penicillium* – це ґрунтові аскоміцетні гриби, талом яких складається з сильно розгалуженої мережі багатоядерних найчастіше безбарвних септованих гіф. Вони надають перевагу прохолодному та помірному клімату [12].

Лимонну кислоту здатні виробляти 5 видів дріжджів роду *Candida* – дріжджові аеробні гриби, які відносяться до умовно-патогенних мікроорганізмів [13]. Сьогодні відомо понад 200 видів: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, [14]. Рідше зустрічаються: *C. rugosa*, *C. inconspicua*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. kefir*, *C. dubliniensis* [15]. Представники цього роду мають 5-6 шарів клітинної стінки, а проникнення гриба в епітеліальні тканини відбувається за допомогою фосфоліпази, розташованої в цій клітинній стінці [16]. Патогенність грибів даного роду є однією з основних причин, чому він не використовується для виробництва лимонної кислоти харчового або фармацевтичного призначення.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						15
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Yarrowia – монотиповий рід дріжджів, які, на відміну від *Saccharomyces* здатні використовувати жири як джерело вуглецю та енергії. Зараз вони використовують в харчовій промисловості як безпечні штами дріжджів, які можна вживати людині. *Yarrowia lipolytica* – найпопулярніший вид свого роду – росте на агарі з солодовим екстрактом, утворюючи коричнево-білі колонії, які можуть бути м'якими, гладкими та блискучими до тьмяних, жорстких, старих і зморшкуватих, залежно від сорту. Нестатеве зростання відбувається шляхом багатостороннього брунькування [17]. Ці дріжджі можна використовувати для отримання цитрати на основі n-алканів, гліцеролу, жирних кислот або інших не вуглеводних середовищах [18, 19]. Проте така здатність грибів роду *Yarrowia* ще тільки вивчається і не надто впроваджена на ринку, хоча і має певні невеликі переваги саме у технології, а не кількості цитрату: це ціле поле для досліджень у галузі екобіотехнології з використання залишків нафтового виробництва.

У 1916 році Джеймсом Керрі було проведено дослідження, що зробило прорив для успішного економічного промислового виробництва цитрату з *Aspergillus niger*. Він виявив, що значні кількості лимонної кислоти можна отримати з різних штамів *A. niger*, проте найважливішими відкриттями стали: його здатність рости за рН 2,5–3,5, що стримувало утворення глюконової та щавлевої кислот, а також здатність збільшувати обсяги утворення лимонної кислоти зі збільшенням концентрації цукрів. Це єдине дослідження заклало основу для сучасного промислового виробництва лимонної кислоти, яке було засновано в США фармацевтичною компанією Pfizer у 1923 році [20].

Багато років проводились експерименти з пошуку продуцентів лимонної кислоти серед бактерій, грибів та інших мікроорганізмів. Однак мікробне перетворення органічних матеріалів на лимонну кислоту є складною біохімічною реакцією, яка вимагає ретельного контролю та спеціально підібраних робочих умов, що включають: концентрацію та тип джерела вуглецю, рН, лімітуючий вміст фосфатів, азоту та інших мікроелементів, аерацію, морфологію

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						16
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

продуценту. Вміст важких металів зазвичай має бути нижчий дозволеного, щоб не чинити згубний вплив на біосинтез цитрату, проте інші елементи, такі як кисень і цукор, потрібні в надлишку [10, 21]. *Aspergillus niger* перевершує інших продуцентів для промислового синтезу лимонної кислоти через більший вихід продукції, простотою у культивуванні, здатності зброджувати різноманітну дешеву сировину та забезпечувати високі прирости біомаси.

Таким чином, *Aspergillus niger* є найбільш оптимальним продуцентом лимонної кислоти на відходах цукрового виробництва, що має найвищі показники серед продукції цитрату. Зараз проводяться дослідницькі роботи з модифікації цього виду для отримання ще більш вигідних промислових штамів.

При використанні дешевого цукрового субстрату *Aspergillus niger* дають вихід 80 г/дм³ цитрату (57%) [22].

1.2. Систематичне положення

Aspergillus niger – вид грибів роду *Aspergillus*. Сучасну біномінальну назву надано у 1867 році, його так само називають чорний аспергіл. Систематичне положення можна надати у наступному вигляді:

- Домен – Eukaryota
- Царство – Гриби (Fungi)
- Підцарство – Вищі гриби (Dikarya)
- Відділ – Аскомікотові гриби (Ascomycota)
- Підвідділ – *Pezizomycotina*
- Клас – Євроціоміцети (*Eurotiomycetes*)
- Підклас – *Eurotiomycetidae*
- Порядок – Євроціальні (*Eurotiales*)
- Родина – Аспергілові (*Aspergillaceae*)

- Рід – Аспергіл (*Aspergillus*)

									ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						17

- Вид – Аспергіл чорний (*Aspergillus niger*)

Aspergillus традиційно асоціювали з дев'ятьма телеоморфними родами, але філогенетичні дані свідчать про те, що разом з такими родами, як *Polyraecilum*, *Phialosimplex*, *Dichotomomyces* і *Cristaspora*, *Aspergillus* утворює монофілетичну кладу, тісно пов'язану з *Penicillium*. [23].

Aspergillus – це різноманітний рід з високим економічним і соціальним впливом. Він зустрічаються по всьому світу в різних середовищах мешкання, і псує їжу, виробляє мікотоксини та часто виокремлюється як патоген для людей і тварин. Крім того, багато видів використовуються в біотехнології для виробництва різних метаболітів, таких як: антибіотики, органічні кислоти, ліки або ферменти, або як агенти в багатьох процесах ферментації їжі. Класифікація та ідентифікація *Aspergillus* ґрунтувалася на фенотипових ознаках, але в останні десятиліття на неї сильно вплинули молекулярні та хемотаксономічні характеристики [23].

1.3. Морфологічно-цитологічні ознаки

Aspergillus niger (рис. 1.1) відноситься до класу сумчатих грибів *Ascomycetes*. Тіло гриба складається з безбарвних сильно розгалужених та переплєтених між собою тонких ниткоподібних гіф, що утворюють міцелій (грибницю). Гіфи септовані і в діаметрі складають 3-6 мкм.

Гриби роду *Aspergillus* ростуть за рахунок апікального розтягування, утворюючи гіфу, одночасно з тим відбувається подовження цитоплазматичної мембрани та клітинної стінки шляхом виділення везикул, які містять літичні та біосинтетичні ферменти, в апексі [24]. Основною складовою клітинної стінки грибів є хітин, який при перехресному зв'язуванні з глюканами та іншими компонентами внаслідок росту гіф робить клітину більш жорсткою. Розтягування

гіф та поляризація їхнього росту здійснюються за допомогою високодинамічної клітинної структури, яку називають Шпіденкерпером або апікальним тілом, яке розташоване на або біля вершини [25]. Під час росту гіф відбувається їхня компартменталізація перфорованими мембранами – септами – які дозволяють обмін між клітинами. Біля септ у кожної клітини формуються сферичні структури з назвою Воронові тіла, які переміщуються для блокування пор, якщо суміжна клітина ушкоджена.



Рисунок 1.1. – Зображення колоній (А) та конідієносців з конідіями (Б), збільшення $\times 400$ гриба *Aspergillus niger* [26]

Кожна клітина може мати одне або декілька ядер. Багатоядерні клітини називають апікальними, якщо вони знаходяться на вершині гіфи, та субапікальними, якщо розташовані в інших місцях. Субапікальні клітини можуть розгалужуватися, утворюючи нову верхівку та нову зростаючу гіфу. Ця система розгалуження дозволяє зайняти тривимірний простір, що збільшує ймовірність знаходження нових поживних речовин [27].

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

19

Для цього гриба є характерним поверхневий вистилаючий ріст, проте при достатній аерації здатен розмножуватись в об'ємі твердого та рідкого поживного середовища. При поверхневому рості над межею поділу фаз середовище-повітря з'являються конідієносці – органи розмноження, які відходять від клітин міцелію. Конідієносці (рис. 1.2) – потовщені нерозгалужені несептовані зернисті на вигляд гіфи, довжиною 2 мм і більше. На кінці конідієносця формується перетяжка без перегородки, яка виокремлює шароподібну структуру, яка називається головкою. Коли при формуванні органів плодоношення ця структура досягає в розмірах близько 400 мкм, то на її поверхні проростають радіально розташовані продовгуваті одно- або двоядерні клітини, які носять назву стеригми. На вільних кінцях стеригм формуються дрібні клітини – конідії. Вони найчастіше розташовані ланцюжком [28].

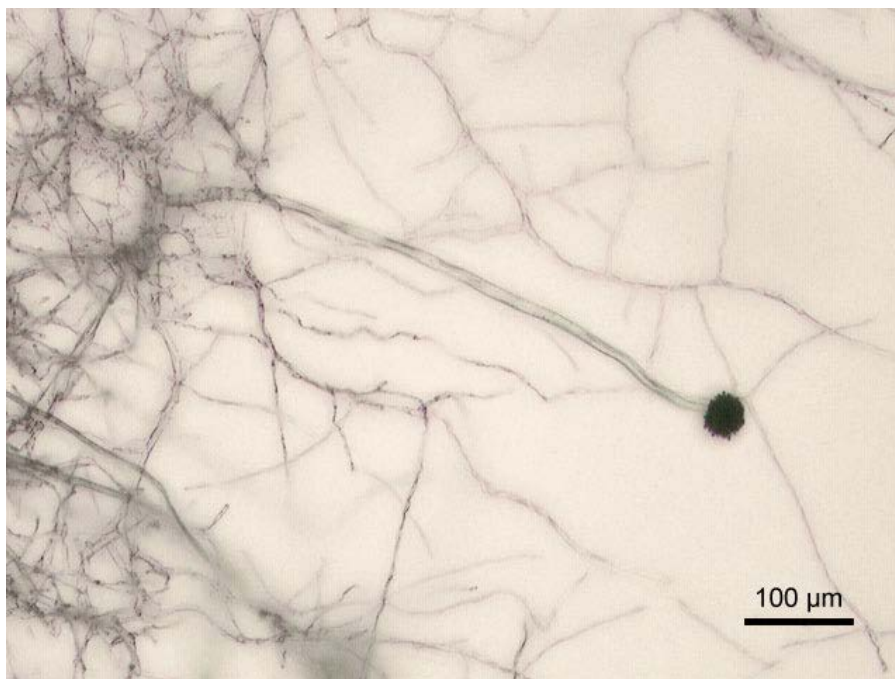


Рисунок 1.2. – Зображення конідієносця з конідіями гриба *Aspergillus niger*, збільшення $\times 100$ [29]

Конідії – нерухомі клітини, з мінімальним вмістом води. Бувають частіше округлої або еліпсоїдної форми, середній розмір досягає 4 мкм. Поверхня конідій може бути гладенька, шипувата або бугрувата з чорним забарвленням,

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						20
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

рідше – з іншими відтінками коричневого. Зазвичай на одній голівці знаходиться понад 10 000 клітин. Саме колір цих маленьких конідій і забарвлює всю поверхню гриба [30].

Основним типом запасних поживних речовин у гриба *Aspergillus niger* є глікоген. Глікоген є полісахаридом, який виконує роль акумулювання енергії в організмі тварин та грибів. Вони накопичують глюкозу у вигляді компактної структури, що відкладається в клітинах і дозволяє їм використовувати глікоген як джерело енергії під час стресових умов або періодів обмеженого доступу до поживних речовин. Глікоген може бути мобілізований і розщеплюватись на глюкозу для забезпечення життєдіяльності гриба.

У штамів *Aspergillus niger* найчастіше зустрічається моноподіальне галуження гіф (рис. 1.3, тип 2) – тип галуження, за якого головна вісь тягнеться вгору, утворюючи бічні вісі другого порядку [30].



Рисунок 1.3 – Типи галуження гіф: 1 – дихотомічне, 2 -моноподіальне, 3 – симподіальне. У гриба *Aspergillus niger* наявний другий тип галуження гіф – моноподіальний [31]

1.4. Культуральні ознаки

Колонії *Aspergillus niger* звично бачити на твердому агаризованому поживному середовищі в Чашках Петрі або ж своєрідним килимом, які плаває на поверхні рідкого або напіврідкого середовища. У такому випадку формується повітряний міцелій чорного кольору, а речовини виділяються в товщу середовища [30].

Проте сьогодні так само існують методи вирощування чорного Аспергіла в об'ємі твердого насипного (наприклад, шкірки яблук з іншими відходами) або рідкого поживного середовища на основі відходів цукрового виробництва. Вживання на таких середовищах пояснюється високою аерацією культури, проте формування повітряного міцелію не відбувається через змочуваність поверхні гіф гриба [30].

На твердому агаризованому середовищі *Aspergillus niger* формує мозговидну, вигнуту, складчасту колонію білого кольору з жовтуватим відтінком у перші 2-3 доби росту до кінця формування чорних конідій, з широким аспорогенним краєм [30].

Колонії *Aspergillus niger*, вирощені на чашках з агаром, що містять або мальтозу, або d-ксилозу як джерело вуглецю, продемонстрували різноманітність у експресії генів, коли порівнювали периферію колонії з центром, швидше за все, через обмеження вуглецю в центрі колонії. Ріст і секреція білків відбувалася переважно на периферії, що свідчить про менш активний міцелій у центрі колонії [32, 33].

Поверхня колоній може бути шорсткувата, горбиста, зморшкувата залежно від штаму та умов культивування. Край колоній може бути рівним, а може мати неправильні форми, що так само залежить від правильності дотримання параметрів вирощування гриба.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						22
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

На 3-4 добу культивування *Aspergillus niger* вже наявні сформовані конідієносці з конідіями, що мають відтінки від чорного до коричневого. Саме вони визначають забарвлення колонії, оскільки гіфи гриба власне безбарвні. Тобто колір повітряного міцелію залежить виключно від конідій гриба.

1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки

У природі *Aspergillus niger* росте на різноманітній рослинній біомасі та використовує ряд екзоферментів для розкладання полісахаридів [34]. Він навіть є одним з основних промислових продуцентів ферментів для перетворення сировини рослинного походження на зброджуваний цукор [35].

За типом харчування аспергіли відносяться до гетеротрофних організмів, що засвоюють вуглець з органічних сполук. Всмоктування розчинених у воді поживних речовин відбувається за рахунок дифузії та осмосу крізь всю поверхню тіла та регулюється цитоплазматичною мембраною. За рахунок напівпроникності ЦПМ крізь неї проходять, в основному, молекули води, при чому головною рушійною силою процесу дифузії є градієнт концентрації певної речовини на обидва боки від мембрани: система прагне до врівноваження. Такий перенос за градієнтом концентрації є пасивним, але більшість поживних речовин потрапляють всередину клітини завдяки білкам-переносникам, які розташовані в мембрані клітини – відбувається енергозалежний активний транспорт [36].

На відміну від автотрофів, гриби роду *Aspergillus* мають високий осмотичний тиск та здатні вбирати речовини з великою молекулярною масою. Тому поживне середовище для даних видів має містити такі компоненти, які не синтезуються клітинами гриба, проте необхідні їм для нормального росту, розвитку та розмноження [28].

Основним джерелом вуглецю для *Aspergillus niger* є вуглеводи: глюкоза, сахароза, мальтоза, тощо. Проте в природі гриби найчастіше зустрічають саме гетерогенну суміш джерел вуглецю, в той час як вирощування на чистому

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						23
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

моносахариді використовується для вивчення тих або інших властивостей організму [36]. Саме тому для промислового отримання цитрату доцільніше в якості субстрату додавати відходи цукрового виробництва у вигляді патоки або меляси, а для твердих поживних середовищ – рослинні залишки.

Азот на рівні з вуглецем є будівельним матеріалом для живих організмів. Він, звісно, набагато рідше зустрічається у сполуках, проте його роль від цього не зменшується. Нітроген використовується для біосинтезу білків, нуклеїнових кислот, а також хітину, який входить до клітинної стінки гриба [38]. Для *Aspergillus niger* джерелами азоту можуть слугувати іони амонію, нітрат- і нітрит-іони, амінокислоти. Вважається, що амоній та L-глутамат, які взаємоперетворюються L-глутаматдегідрогеназою, є найкращими джерелами нітрогену для грибів [38]. При відсутності даних джерел, у *A. niger* відбувається асиміляція нітратів, яка активується експресія генів через транскрипційні регулятори AreA та NirA, що реагують на азот. Це дозволяє іонам нітрату перетворюватись на іони амонію [37, 39]. Азот меляси існує у вигляді бетаїну (близько 60-70% від загального азоту), амінокислот (20-30% азоту), білків (3-4% азоту), а також у вигляді нітрату амонію та амідів. Оптимальна концентрація азоту в середовищі, необхідного для синтезу лимонної кислоти, становить 0,1-0,4 г/дм³ [40].

Конідії *Aspergillus niger* обов'язково потребують поживних речовин у середовищі для проростання та галуження гіф. Проростання конідій відбувається в умовах наявності екзогенних джерел вуглецю та азоту, окрім того стало відомо, що деякі L-амінокислоти сприяють проростанню краще, ніж інші, наприклад, L-глутамінова кислота, L-пролін і L-аланін сприяють краще, ніж L-лейцин, L-аргінін і L-цистеїн [41, 42].

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						24
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Хоча *A. niger* може самостійно синтезувати вітаміни для власних потреб (у якості коферментів для перебігу біохімічних реакції метаболізму за участі ензимів), проте бажано, щоб поживне середовище містило біотин – простетичну групу карбоксилаз. Додавання невеликої кількості біотину стимулює ріст гриба на рівні з додавання пантотенової кислоти (простетичної групи ацетил-КоА). Власне утворення лимонної кислоти стимулюється тіаміном [28]. Окрім того, поживне середовище має містити фосфор, калій, магній, сірку, залізо, цинк, купрум, манган, молібден [43]. Зазвичай у випадку використання меляси як основи, до неї додають розчини мінеральних солей для насичення мікро- та макроелементами.

Найчастіше для культивування *Aspergillus niger* використовують бурякову мелясу, яка, окрім цукрів (40-55%) містить ще й мікроелементи, вітаміни, амінокислоти. Вміст цих речовин наведено в таблиці 1.1. Меляса переважно (на 65-80%) складається з сухих речовин, а 20-25% становить вода.

Таблиця 1.1. Вміст мікроелементів, вітамінів та амінокислот у буряковій мелясі.

Назва компонента середовища	Вміст (мг/100 г меляси)
Мікроелементи	
Алюміній	9,3-60
Стронцій	4,6-59,4
Хром	6,6-54,7
Залізо	8,3-26,6
Мідь	0-9,8
Магній	5,7-8,6
Марганець	1,4-7,6
Цинк	2-3,3
Титан	0,21-0,7
Нікель	0,16-0,76

Кінець таблиці 1.1.

Кобальт	0,1-0,76
Молібден	0,1-0,12
Марганець	1,4-7,6
Свинець	0,21-0,61
Бор	0,2-0,42
Амінокислоти (у % м'яси)	
Лейцин+ізолейцин	1,7-2,9
Фенілаланін	Незначна кількість
Валін+метіонін+триптофан	0,4-1,3
Тирозин	0,6-0,8
Пролін	Незначна кількість
Аланін	1,2-2,3
Треонін+гліцин	0,2-0,8
Глутамат	1,3-1,8
Серин	1,7-2,5
Аспартат	0,3-0,5
Аргінін+гістидин+лізин	Незначна кількість
Цистеїн	
Вітаміни	
Інозитол	90-120
Нікотинова кислота	3,9-5,2
Пантотенова кислота	0,06-0,25
Фолієва кислота	0,01-0,03
Біотин	0,0035-0,006
Тіамін	0,18-0,26
Рибофлавін	0,02-0,08
Піридоксин	0,3-0,45

Aspergillus niger є аеробним організмом, який потребує кисень в якості термінального акцептора електронів в дихальному ланцюзі. Він дозволяє реоксидувати коферменти НАДН та ФАДН₂ з утворенням енергії Гіббса, яка використовується для активного транспорту протонів проти електрохімічного градієнту з утворенням АТФ в мембранному комплексі АТФазі.

Отже, основним типом енергетичного метаболізму є дихання, енергія якого утворюється в ЦТК.

При глибинному культивуванні швидкість метаболізму безпосередньо залежить від кількості кисню в середовищі. Під час насичення культуральної рідини киснем можна зіштовхнутись з наступною проблемою: у випадку ферментації з міцеліальними грибами взаємодії між вільно розподіленими гіфами призводять до формування сітки, що збільшує в'язкість середовища. Вплив цих взаємодій зростає зі збільшенням концентрації біомаси. Головними наслідками є збільшення опору передачі і зниження передачі кисню, що потенційно призводить до обмеження киснем. При низьких концентраціях кисню відбувається накопичення проміжних продуктів циклу трикарбонових кислот (рис. 1.4), накопичення НАДН і зниження утворення АТФ, що розриває зв'язок між катаболізмом та анаболізмом, впливає на внутрішньоклітинний рівень рН і призводить до виробництва та виведення органічних кислот [44].

Окрім того, інтенсивність розгалуження гіф гриба зменшується при низькій концентрації кисню [45]. Аерація має відбуватися протягом всього ферментаційного процесу з однаковою інтенсивністю. Високий рівень аерації призводить до утворення піни, особливо у період росту міцелію, тому необхідно застосовувати піногасники. CO_2 є субстратом для ферменту піруваткарбоксилази, який поповнює пул оксалацетату в ЦТК. Підвищений рівень вуглекислого газу має негативний вплив на кінцеву концентрацію цитрату та біомаси [46, 47].

Оптимальний рН для росту культури *Aspergillus niger* складає 5,48, що підтверджується дослідженнями кінетики росту при різних температурах із зазначеним рівнем рН. Оптимальна температура для росту становить 19,5°C [48].

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						27
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

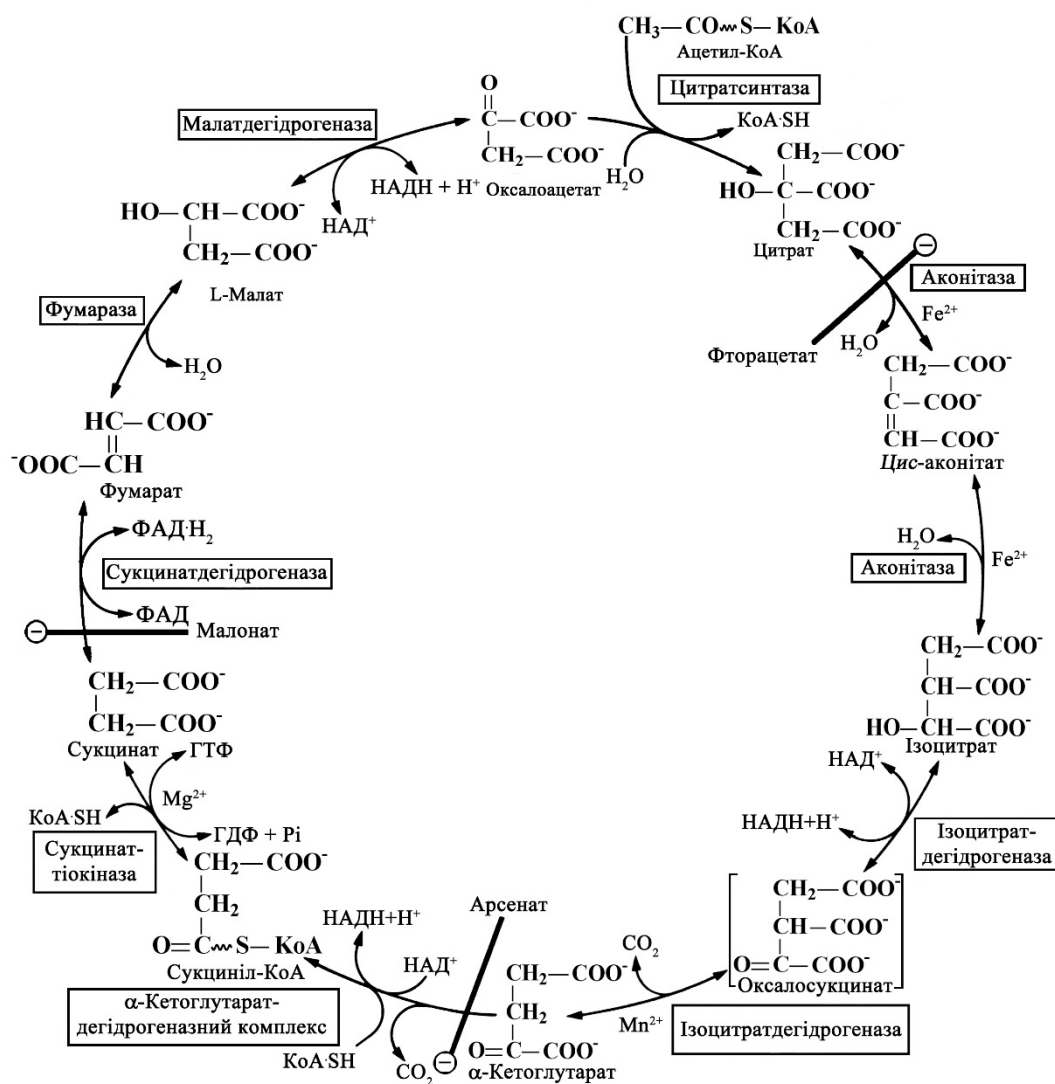


Рисунок 1.4 – Цикл трикарбонових кислот Кребса (дихальний цикл) [49]

Проте гриби роду *Aspergillus* здатні адаптуватись до високих температур та низьких значень рН, тому їх можна використовувати для промислового отримання органічних кислот, в тому числі лимонної завдяки ферментації [50]. Значення рН поживного середовища має бути чітко визначене та встановлене відповідно до потреб конкретного організму для виробництва певного продукту. Процес ферментації починається з моменту проростання спор гриба, для якого оптимальним значенням рН є 5,0. Для ініціації продукування цитрату значення рН має бути не більше 2, оскільки це знижує рівень зараження продуцента та культуральної рідини патогенними або небажаними мікроорганізмами, інгібує

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

28

виробництво побічних продуктів у вигляді глюконової та щавлевої кислот та полегшує процес виділення лимонної кислоти з культуральної рідини [46, 47]. Збільшення рН до 4,5 на стадії біосинтезу цитрату може призводити до зниження виходу кислоти до 80%.

Так само як і інтенсивність аерації, температура має підтримуватись на сталому рівні протягом усього часу ферментації. Занизькі значення температури гальмують проходження біохімічних реакції не тільки утворення лимонної кислоти, а й в принципі росту та розмноженню гриба. Високі ж температури, навпаки, призводять до збільшення енергії в молекулах, внаслідок чого міжбілкові зв'язки руйнуються, що призводить до денатурації. Окрім того, підвищена температура впливає на збільшення втрат вологи, пригнічує ріст продуцента. Гіфоміцет *Aspergillus niger* є мезофілом – організмом, оптимум температури для яких знаходиться в межах 25-35°C.

Клітинна стінка *Aspergillus niger* складається з нейтральних вуглеводів: глюкози, галактози, маннози, арабінози, які складають, в середньому, 73-83%; гексозаміну – 9-13%; ліпідів – 2-7%; білка – 0,5-2%; фосфору – 0,1%. Мембрани цього гриба містять білкові комплекси, які відповідають за активний транспорт, а також АТФази для акумулюванні енергії у фосфатних зв'язках АТФ.

Культура може розмножуватись статеву, безстатеву та вегетативно. Найчастіше в природних умовах статевий та безстатевий типи відбуваються почергово, що зображено на рис. 1.5.

Зрілі конідії, які утворюються ланцюжками на конідієносцях, легко відокремлюються від головок повітрям або водою. Коли вони потрапляють у рідке середовище, спочатку набухають, а потім проростають, утворюючи один або два проростки, відомі як гіфи. На твердому середовищі, за наявності краплинної вологи, конідії проростають без значного набухання. Гіфи ростуть на вільному кінці, подовжуючись і видаючи бічні відростки. Ці відростки, в свою чергу, розгалужуються, переплітаються між собою і утворюють колонії, які

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

можна побачити неозброєним оком. Після 16-20 годин починають з'являтися відокремлені клітини в центральній гіфі, з яких ростуть конідієносці. Утворення зрілих конідій зазвичай триває 3-4 доби [28].

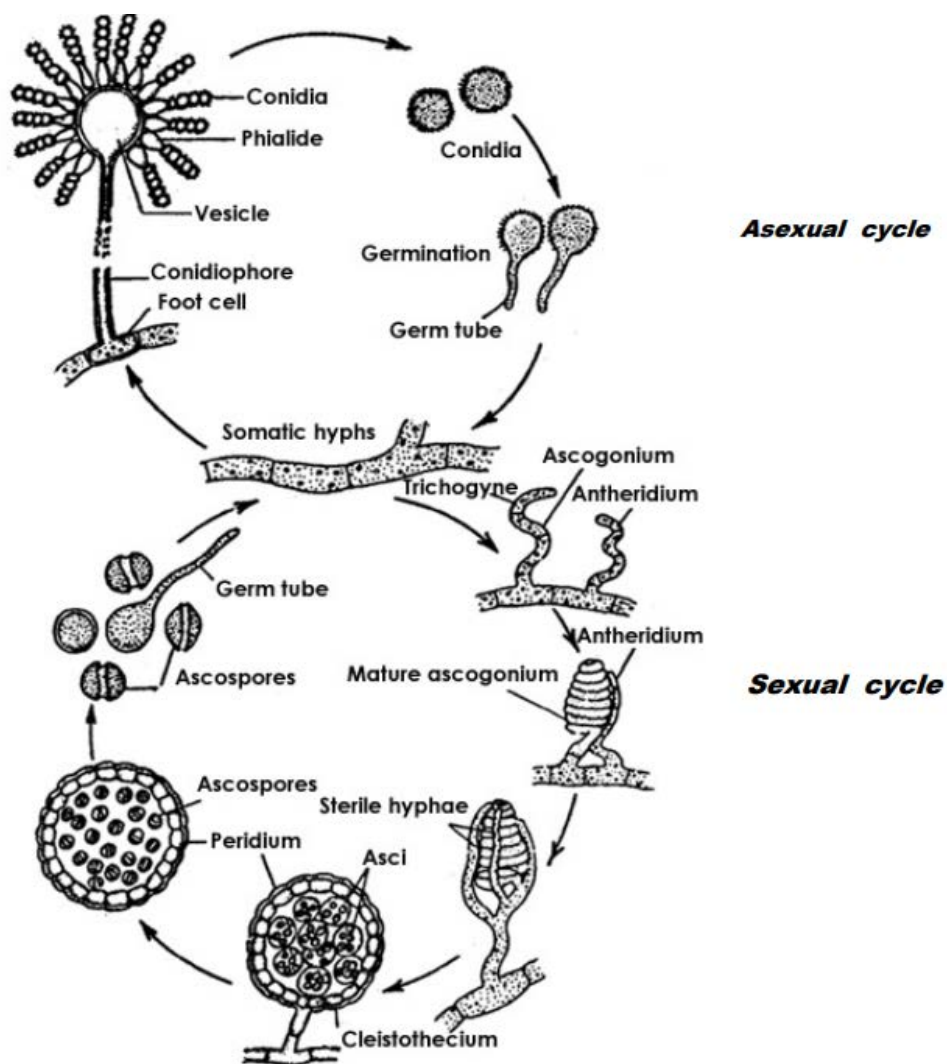


Рисунок 1.5 – Життєвий цикл грибів роду *Aspergillus*: безстатевий цикл починається з проростання конідієносця з гіфи, після чого на ньому формується головка з конідіями – спеціалізованими спорами грибів. Конідії розташовуються на фіалідах і легко від'єднуються від них при дозрівання. Після потрапляння конідій у сприятливе поживне середовище, вони починають проростати, даючи початок новій гіфі. З іншого боку, під час статевого циклу з гіф формуються антеридії та аскогонії, які, поєднуючись, формують аск з аскоспорами, які так само проростають, утворюючи гіфу [27]

Цей метод розмноження *A. niger* є безстатевим. Однак аспергілі можуть також розмножуватися статевим шляхом за допомогою асків, які утворюються у плодових тілах. Втім, розвиток плодових тіл *A. niger* зупиняється на ранній стадії, і недорозвинені плодові тіла перетворюються на щільні скупчення сплечених гіфів, відомі як склероції. Багато штамів *A. niger* не утворюють склероції. Крім того, гриб може розмножуватися вегетативним шляхом, коли відокремлені частинки гіфу самостійно ростуть і утворюють новий міцелій [28].

A. niger стійкий проти багатьох антимікробних препаратів, проте зазвичай для лікування інфекцій, які викликає даний гриб, а отже і для призупинки його життєдіяльності використовують наступні препарати:

- Амфотерицин В: Це широкоспектральний протигрибковий препарат, який може бути ефективним у лікуванні грибкових інфекцій, включаючи *Aspergillus niger*.
- Азолові препарати: Такі препарати, як флуконазол, ітраконазол, вориконазол, є ефективними проти *Aspergillus niger*. Вони діють, заважаючи росту та розмноженню гриба.
- Ехиноциандінові препарати: Наприклад, каспофунгін, цей препарат є інгібітором грибкового росту та може бути використаний для лікування інфекцій, спричинених *Aspergillus niger*.

Окрім зазначених характеристик, чорний аспергіл здатен виробляти мітотоксини – вторинні метаболіти, токсичні сполуки, які уражують рослинні культури та стримують розвиток конкуруючих організмів. До таких сполук відноситься охратоксин А, який вважається канцерогеном та нефротоксином, фумонізину В₁ та В₂, які вбудовуються у мембрани, руйнуючи їхню структуру [46]. Зазвичай мітотоксини починаються продукуватися у сприятливих умовах у випадку перетримання виробничого часу культивування [52].

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						31
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Aspergillus niger містить ферменти для окислення глюкози до глюконової кислоти, що значно знижує рівень рН (до 2) і робить неможливим розвиток конкурентних бактерій. При цьому утворюється отруйний перекис водню. Він містить фермент целюлазу для розкладу целюлози, а також характеризується найбільшою активністю ліполітичних ферментів, здатен розкладати як аліфатичні, так і ароматичні вуглеводні.

1.6. Поширення в природі

Серед роду *Aspergillus* представник *A. niger* є одним з найпоширеніших видів. Основним джерелом поширення є ґрунти, а також само його часто знаходять на різних історичних та археологічних об'єктах [53] та приміщеннях різного призначення, в тому числі побутового та виробничого. Продукти метаболізму, в тому числі мітотоксини (охратоксин А, фумонізини В₁ та В₂) активно використовуються в процесах біодеградації забруднювачів навколишнього середовища, наприклад нафти та її продуктів в промисловій воді та стічних водах [54]. Біосорбція та вилужування важких металів, токсичних елементів є ключовими процесами біоре mediaції.

Завдяки наявності ферментів для розкладу вуглеводнів, гриб зустрічається у різних нафтопродуктах.

Аспергільоз – захворювання птахів, рідше тварин, збудником якого є *Aspergillus niger*. Це захворювання характеризується ураженням органів дихання і серозних оболонок. В наукових виданнях часто зустрічаються статті, направлені на дослідження патогенності цього гриба по відношенню до худоби з точки зору ветеринарної медицини.

Aspergillus niger здатен колонізувати різноманітні субстрати, а також епітеліальні клітини тварин та людини. Він є сапрофітом – організмом. Який живе за рахунок розкладання органічних решток мертвих рослин, тварин або інших органічних матеріалів. Спори цього гриба зустрічаються в широкому

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						32
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

діапазоні ґрунтів, оскільки конідії – є достатньо стійкими до стресу від навколишнього середовища спорами, що дозволяє грибу виживати під час несприятливих умов. Іноді цей вид здатен викликати пневмонії у людей, вражаючи епітеліальні клітини легень [55].

Гриби роду *Aspergillus* можна також зустріти у ванних кімнатах та на харчових продуктах. Чорна пліснява є дуже часто уражає білий хліб, якщо той знаходиться в умовах підвищеної вологості.

Спори гриба – конідії – струшуються повітрям або водою, тому можна чітко сказати, що він знаходиться в кожній квартирі або підвір'ї. Проте в більшості випадків *Aspergillus niger* залишається безпечним для життєдіяльності [28].

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						33
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика цільового продукту

Кальцій цитрат (рис. 2.1) – безбарвні кристали, які представляють собою сіль Кальцію та лимонної кислоти. Малорозчинні у воді та нерозчинні в етанолі. Здатен утворювати кристалогідрат складу $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, який втрачає воду при температурі 130-185°C.

Емпірична формула – $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$

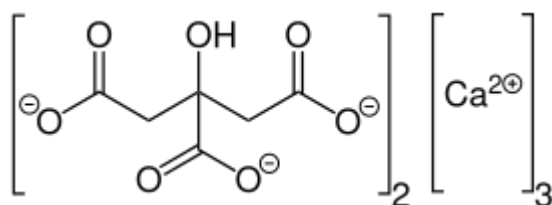


Рисунок 2.1 – структурна формула цитрату кальцію [56]

Попередник кальцію цитрату – лимонна кислота – являє собою органічну сполуку з групи трьохосновних карбонових кислот, яка була вперше отримана шведським хіміком Карлом Шеєле при переробці нестиглих лимонних плодів.

Лимонна кислота або цитрат – слабка органічна кислота, яка широко розповсюджена в природі та цитрусових плодах. Температура плавлення складає 153°C, молекулярна маса 210,14 г/моль, має три значення рКа при рН 3.1, 4.7 та 6.4, що пояснюється наявністю трьох функціональними групами -COOH. Кристали лимонної кислоти добре розчиняються у воді, фторводороді, диметилсульфоксиді, діоксані та спиртах, дещо гірше в амілацетаті, мурашиній кислоті і діетилового етері. Не розчинна у хлороформі, бензолі, сірковуглецю і толуолі.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Шопова З. С.				Розділ 2. Біохімічні основи виробництва	Стадія	Арк.
Конс.	Шидецький В. Ю.						34
						Акрушів	
						177	
Керівн.	Дзигун Л. П.					КПІ ім. І. Сікорського	
Затв.						ФБТ	

Цитрат є не тільки слабкою кислотою, а й поліпротичною, тобто вона здатна відділяти не один іон водню H^+ : три іони з кожної групи $-COOH$. Завдяки своїй структури, лимонна кислота має високу здатність утворювати водневі зв'язки, що є причиною легкого утворення твердих моногідратних ромбоедричних кристалів. При екстремальних температурах або вище $175^{\circ}C$ цитрат розкладається, виділяючи CO_2 і воду [57].

Цитрат кальцію отримують шляхом реакції між вапняним молоком або іншими сполуками кальцію з лимонною кислотою, яка у випадку біотехнологічного способу, знаходиться в культуральній рідині.

До початку двадцятих років минулого століття лимонну кислоту отримували з соку лимонів (25 кг кислоти з 1 тони лимонів), таким чином задовольнялося близько $3/4$ світової потреби.

Біосинтез лимонної кислоти – це регульований процес, який переважно залежить від складу поживного середовища та його фізико-хімічних параметрів [58, 60]. Лимонна кислота є первинним метаболітом *A. niger*. Зазвичай, первинні метаболіти необхідні для росту та життєдіяльності продуценту. Метаболічний шлях утворення цитрату – цикл трикарбонових кислот, під час якого внаслідок гліколізу утворюються дві молекули пірувату, приєднуються молекули діоксиду вуглецю. Як результат маємо оксалоацетат, який конденсується з ацетил-КоА, утвореного з другої молекули пірувату. Внаслідок дії цитратсинтази утворюється лимонна кислота. Отже, біосинтез лимонної кислоти охоплює реакції гліколізу та низку реакцій, замкнених в ЦТК, що у еукаріотів, зокрема й *A. niger*, відбувається в мітохондріях [1, 40]. Після синтезу цитрат може бути виділений з клітини, якщо перешкоджати наступному етапу ЦТК – утворенню ізолимонної кислоти [1, 40].

Промислове виробництво цитрату кальцію складається з трьох основних етапів – нарощування біомаси продуцента, синтезу цитрату та виділення кальцієвої солі. На кожному з етапів культура чутлива до різних фізико-хімічних факторів, таких як склад та співвідношення компонентів середовища, аерація, рН

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		35

середовища, температура тощо. Ефективний вплив тих або інших факторів, що стимулюють утворення лимонної кислоти грибом *A. niger*, значною мірою визначається фізіолого-біохімічними особливостями самої культури, а також технологічними параметрами процесу культивування [1, 40, 61].

2.2 Схема хімічних перетворень

Біохімія утворення лимонної кислоти – складний процес, який спричиняється сукупністю багатьох факторів, які включають умови культивування продуцента та склад поживного середовища. Поживне середовище синергетично впливає на утворення цитрату через концентрацію джерел вуглецю, розчиненого кисню, іонів водню, тобто рівня рН, активності води, субоптимальних концентрацій фосфатів та металів.

Надлишок лимонної кислоти може вироблятися грибом через активний гліколітичний шлях (рис. 2.2). Цитрат є відомим інгібітором гліколізу. Таке інгібування може бути стримане в результаті накопичення різних позитивних ефекторів гена фосфофруктокінази (PFK-1) [60]. Розпад білка відбувається в результаті дефіциту марганцю, що призводить до збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів NH_4^+ [61]. Це явище відоме як «амонієвий пул», і воно пригнічує фермент фосфофруктокіназу, який життєво важливий для перетворення фруктози та глюкози на піруват. В результаті відбувається проходження циклу через гліколіз і утворення лимонної кислоти. Високі концентрації глюкози та NH_4^+ сильно обмежують утворення 2-оксоглутаратдегідрогенази та зрештою пригнічують катаболізм лимонної кислоти, присутньої в циклі трикарбонових кислот [62].

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						36
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Проте було доведено, що амонієвий пул не є причиною інгібування фосфоглюкокінази, натомість було запропоновано враховувати наступні фактори: вивільнення синтезованого глюкозаміну в ферментаційний бульйон, дуже низька концентрація внутрішньоклітинних іонів амонію (приблизно одна сота зовнішнього рН) і внутрішньоклітинний рН [40].

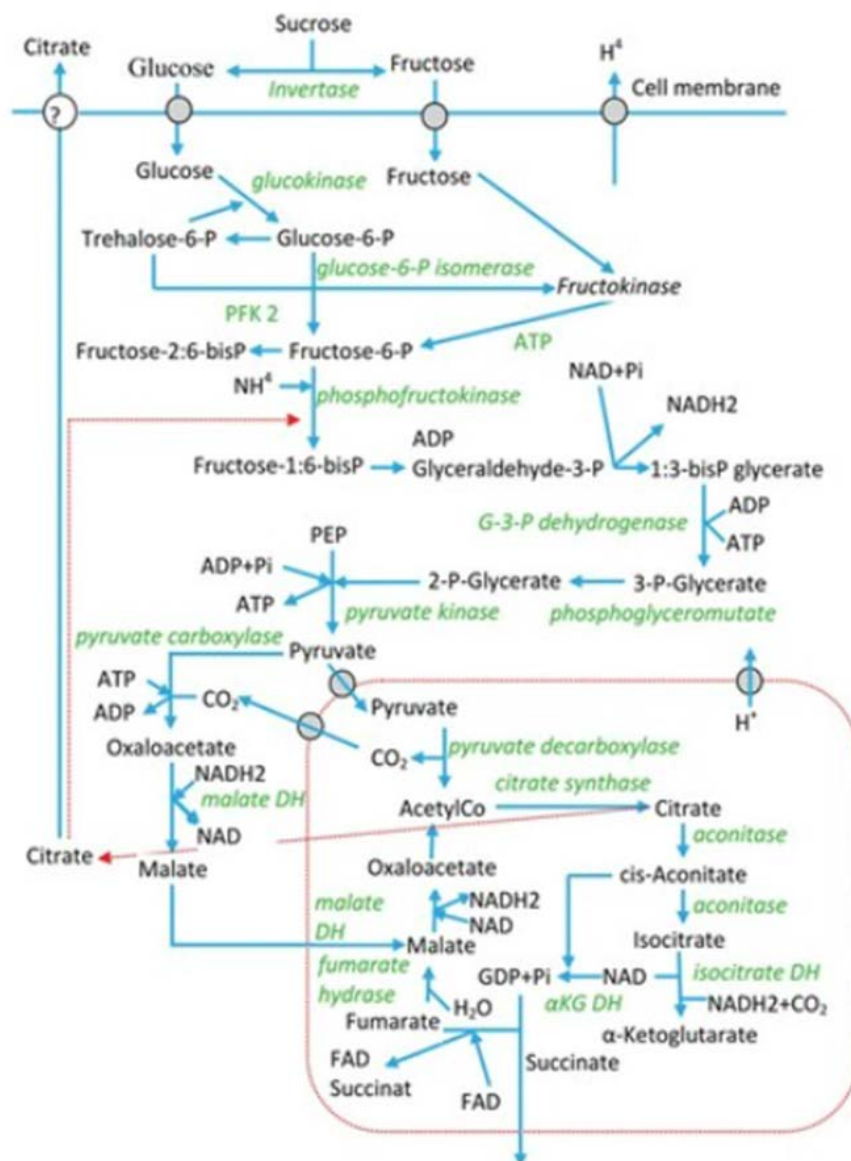


Рисунок 2.2 – гліколітичний шлях перетворення глюкози на цитрат продуцента *Aspergillus niger* [67]

Рушійною силою при утворення лимонної кислоти слугують ферменти *Aspergillus niger*:

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

37

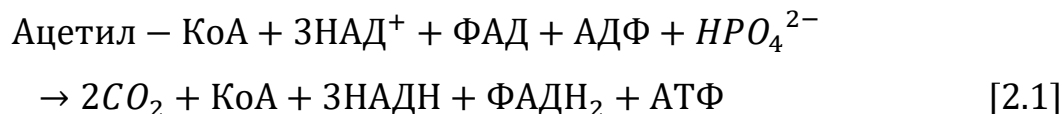
- інвертаза – вмонтований в мембрану фермент, який гідролізує сахарозу з утворенням фруктози та глюкози,
- гексокіназа,
- глюкокіназа – фермент, який неконкурентно інгібується лимонною кислотою [63, 64],
- глюкооксидаза – фермент, що стимулює перетворення глюкози на глюконову кислоту та який інгібується при рН нижче 3,5,
- фосфоглюкокіназа – фермент, що відповідає за фосфорилування фруктозо-6-фосфату. Високі концентрації АТФ, цитрату та марганцю інгібують дію фосфоглюкокінази-1 (утворення фруктозо-1,6-біфосфату), проте її активують продукти реакції фосфоглюкокінази-2, іони цинку, магнію, амонію і, власне, фруктозо-2,6-біфосфат,
- піруваткіназа – фермент, важливий у циклі гліколізу, проте його вплив інгібіторів не значно впливає на його активність,
- цитратсинтаза – фермент, який відповідає за оборотну реакцію конденсації між ацетил-КоА і оксалоацетатом. Саме цей ензим і сприяє утворенню цитрату.

У *A. niger* існують три різні ізоферменти ізоцитратдегідрогенази, які можна відрізнити один від одного реципієнтом, який вони використовують для видалення протонів із ізоцитрату. Ці ферменти відомі як НАДФ⁺-залежні форми (одна існує в мітохондріях, а інша в цитоплазмі) і НАД⁺-залежні ізоцитратдегідрогенази (які існують лише в мітохондріях). НАД⁺-залежні ферменти містяться в менших кількостях, ніж НАДФ⁺-залежні ферменти [65, 66].

Загалом, накопичення лимонної кислоти включає дезактивацію аконітази та/або ізоцитратдегідрогенази. У циклу Кребса утворюються проміжні продукти, необхідні для накопичення біомаси продуцента під час біосинтезу лимонної кислоти [71, 72]. Цикл Кребса – це серія з восьми реакцій, які відбуваються в мітохондріях. Ці реакції повністю окислюють ацетат до вуглекислого газу.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						38
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Цикл підсумовується таким хімічним рівнянням 2.1:



Таким чином, накопичення лимонної кислоти, ймовірно, є результатом посиленого біосинтезу замість пригніченої деградації [69]. Накопичення лимонної кислоти може бути також пов'язане з діяльністю трансферази трикарбоксилатів, що конкурує за лимонну кислоту з аконітазою. За умов, коли лимонна кислота має більшу афінність з трансферазою, аніж аконітазою, фермент видаляє лимонну кислоту з мітохондрій клітини, не пригнічуючи ферменти, присутні в циклі [67].

Глутамінсинтаза пов'язана з рівнем рН, концентрацією аміаку та іонів марганцю та їхнім впливом на накопичення лимонної кислоти [69]. Низьке значення рН на етапі виробництва ($\text{pH} < 2$) знижує ризик зараження культуральної рідини іншими мікроорганізмами та пригнічує вироблення небажаних органічних кислот (глюконової та щавлевої кислот), що полегшує утворення продукту. Наявність у структурі ферменту іонів мангану або магнію визначає його форму. Ізоферменти ізоцитратдегідрогенази в *A. niger*, які присутні в мітохондріях, а також у цитоплазмі, вимагають для перебігу своїх реакцій кофактори магнію та мангану, а їх інгібування α -кетоглутаровою та лимонною кислотами забезпечує накопичення лимонної кислоти [70].

Ізоцитрат проходить двофазний процес перетворення в α -кетоглутарат. Спочатку протони відриваються з утворенням оксалосукцинату. Потім утворюється та виділяється вуглекислий газ, завершуючи перетворення. Іони металів мангану та магнію необхідні для реакції, оскільки вони приєднуються до активних центрів ферментів, що беруть участь в утворенні цитрату. Вони відповідають за стабілізацію оксалосукцинату (проміжного продукту реакції) і зв'язування субстрат-фермент. Накопичення лимонної

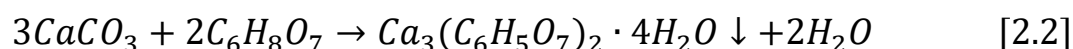
					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						39
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

кислоти стає можливим, оскільки цитрат і α -кетоглутарат інгібують НАДФ⁺-залежну форму ферменту [71].

При лимоннокислому бродінні виробництво цитрату починається після лаг-фази в 1 день і досягає максимуму на початку стаціонарної фази або пізньої експоненціальної фази. Подальше збільшення інкубаційного періоду не посилює вироблення лимонної кислоти. Це може бути пов'язано з віком гриба та зниженням вмісту цукру в культуральній рідині [70].

Фактично кислотоутворення починається з початкової стадії ідіофази (між 80 і 120 год) росту грибів. На цій стадії рН, як правило, становить 5. Концентрація цитрату поступово збільшується, а продукування досягає максимальної швидкості в пізній ідіофазі (180–220 год) [67]. На цій стадії рН має бути нижче 3, щоб інгібувати утворення щавлевої кислоти та глюконової кислоти. Прискорення бродіння можна пояснити вищою вихідною концентрацією біомаси у ферментері та адаптацією біомаси до дуже високого осмотичного тиску [68].

Отримання цитрату кальцію проводять шляхом додавання вапняного молока до відфільтрованої культуральної рідини, внаслідок чого проходять наступні реакції, зображені у формулі 2.2:



Для культивування *Aspergillus niger* зазвичай використовується температура від 25 до 30°C. Оптимальною температурою для виробництва лимонної кислоти є 30°C, але температура середовища підвищується вище 30°C і, таким чином, біосинтез лимонної кислоти знижується. Це може бути пов'язано з високою температурою, яка може спричинити денатурацію ферменту цитратсинтази та накопиченням інших побічних кислот, таких як щавлева кислота та репресією катаболітів ферменту [22, 75], що також пригнічує розвиток культури.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						40
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Назва продукції – кальцію цитрат за ДСТУ ГОСТ 54538-2011 Добавки харчові. Кальцію цитрат E333(iii). Технічні умови.

Цитрат кальцію призначений поповнення нестачі іонів кальцію в організмі при функціональній (фізіологічна підвищена потреба в результаті росту, звичайних крововтрат у жінок, вимивання кісткового кальцію у людей похилого віку) та патологічній (травми, кровотечі, порушення всмоктування із шлунково-кишкового тракту, зменшення реабсорбції кальцію у нирках та ін.) недостатності, при гіперфосфатемії. Може застосовуватися як антацид при підвищеній кислотності шлункового соку.

Кінцевий продукт – порошок білого, майже білого кольору або безбарвні кристали. Фізико-хімічні показники продукту наведені в таблиці 2.1.

Цитрат кальцію зберігають не більше 2-х років за вологості повітря не більше 70%.

Маркування має містити наступну інформацію:

- Повну назву продукту
- Код добавки
- Найменування підприємства-виготовника та його адресу
- Товарний знак
- Дату виготовлення
- Номер партії
- Масу нетто
- Срок та умови зберігання
- Позначення діючого стандарту
- Інформацію про сертифікацію

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		41

- При транспортуванні маркування також має містити маніпуляційний знак «Зберігати від вологи»

Таблиця 2.1 – фізико-хімічні показники лимонної кислоти [76]

Найменування показника	Норма	Метод контролю
Зовнішній вигляд, колір	Дрібнокристалічний білий порошок	Органолептично
Запах	Без запаху	Органолептично
Тест на кальцій-іони	Витримує випробування	Відповідно до описаної нижче технології
Тест на цитрат-іони	Витримує випробування	Відповідно до описаної нижче технології
Масова частка основної речовини на сухій основі, не менше	97,5%	Відповідно до описаної нижче технології
Масова частка втрат при висушуванні: - Не більше - Не менше	14% 10%	
Тест на кислотність та лужність	Витримує випробування	Відповідно до описаної нижче технології
Тест на оксалати	Витримує випробування	Відповідно до описаної нижче технології
Масова частка фторидів, не більше	30 млн ⁻¹ (мг/кг)	Відповідно до описаної нижче технології

Цитрат кальцію упаковують у продуктові мішки з мішкових тканин, паперові мішки, ящики з гофрованого картону. Всередину слід вставляти мішки-

вкладиші з харчової поліетиленової нестабілізованої плівки завтовшки не менше 0,08 мм.

Тип і розміри мішків, граничну масу харчового цитрату кальцію, що упаковується, встановлює виробник.

Цитрат кальцію нетоксичний, пожежо- та вибухобезпечний. За ступенем впливу на організм людини відноситься до третього класу небезпеки. При роботі з харчовим цитратом кальцію необхідно використовувати спецодяг, засоби індивідуального захисту та дотримуватись правил особистої гігієни, передбачених відповідними інструкціями. Приміщення, в яких проводять роботи з цитратом кальцію, мають бути обладнані припливно-витяжною вентиляцією.

2.4 Методи контролю якості цитрату кальцію.

2.4.1 Правила відбору проб: з рідних місць кожної пакувальної одиниці, обраної одноступінчатим вибірковим методом, відбирають проби не більше 100 грамів за допомогою пробовідбірника, занурюючи його не менше ніж на $\frac{3}{4}$ глибини. Роблять кілька відборів, ретельно перемішують, маса сумарної проби не менше 500 г. пробу ділять на 2 рівні частини: одну з них використовують для випробувань, іншу залишають для повторних випробувань у разі виникнення потреби [76].

2.4.2 Колір, запах та зовнішній вигляд оцінюють органолептично.

2.4.3 Тест на кальцій-іони: пробу масою 0,5 г поміщають у склянку місткістю 100 см³ і розчиняють у 5 см³ соляної кислоти, додають 50 см³ дистильованої води та перемішують. У пробірку поміщають 5 см³ отриманого розчину, додають одну-дві краплі індикатора червоного метилового, нейтралізують розчин аміаком до зміни забарвлення розчину від червоного кольору до жовтого, потім вносять 2 см³ розчину щавлевокислого амонію і перемішують. Утворення білого дрібнокристалічного осаду підтверджує присутність іонів кальцію [76].

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						43
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.4.4 Тест на цитрат-іони: пробу масою 0,5 г поміщають у склянку місткістю 100 см³ і розчиняють у 5 см³ соляної кислоти, додають 50 см³ дистильованої води та перемішують. У пробірку поміщають 5 см³ отриманого розчину, додають одну-дві краплі індикатора метилового червоного, нейтралізують розчин внесенням 2 см³ хлористого кальцію і нагрівають розчин до кипіння при перемішуванні. Утворення білого кристалічного осаду, нерозчинного в гідроокисі натрію, але розчинного в оцтовій та соляній кислотах, свідчить про присутність у розчині цитрат-іонів [76].

2.4.5 Визначення масової частки основної речовини: у сухому стаканчику зважують 0,4 г проби із записом результату до третього десяткового знака і сушать у відкритому стаканчику разом із кришкою. Висушену пробу розчиняють у 5 см³ соляної кислоти і кількісно переносять у конічну колбу місткістю 250 см³, вносять 50 см³ дистильованої води, перемішують, додають дві-три краплі розчину метилового червоного і нейтралізують розчином аміаку до появи слабкого жовтого фарбування, що не зникає протягом 1 хв. До розчину додають 7 см³ аміачного буферного розчину, близько 10 мг індикаторної суміші, перемішують і титрують розчином трилону Б до переходу забарвлення від червонувато-фіолетового у стійкий синій. Масову частку основної речовини визначають за формулою 2.3 [76]:

$$X = \frac{V \cdot 0,0083K \cdot 100}{m} \quad (2.3)$$

V – об'єм розчину трилону Б з концентрацією 0,05 моль/дм³, який був використаний на титрування проби;

0,0083 – маса цитрату кальцію безводного, що відповідає 1 см³ розчину трилону Б з концентрацією 0,05 моль/дм³;

K – коефіцієнт поправки розчину трилону Б з концентрацією 0,05 моль/дм³;

100 – коефіцієнт перерахунку результату у відсотки;

m – маса сухої проби в г.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						44
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.4.6 Визначення масової частки втрат при висушуванні: в підготовлену склянку вносять 2-3 г аналізованої проби, закривають кришкою і зважують із записом результату до третього десяткового знаку. Пробу розподіляють рівномірним шаром постукуванням по склянці і сушать у відкритому склянці разом з кришкою протягом 4 годин при температурі 150 °С. Після цього склянку з висушеною пробю швидко закривають кришкою, охолоджують в ексікаторі над зневодненим хлористим кальцієм до температури $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ і зважують із записом результату зважування до третього десяткового знаку [76].

Висушування стаканчика з пробю повторюють з тривалістю сушіння від 1 до 2 год доти, поки різниця між результатами двох послідовних зважувань складе не більше 0,001 г.

Масову частку втрат визначають за формулою 2.4:

$$X = \frac{(m - m_2) \cdot 100}{m - m_1} \quad (2.4)$$

m – маса стаканчику з кришкою та пробю до висушування, г;

m_1 – маса стаканчику з кришкою, г;

m_2 – маса стаканчику з кришкою та пробю після висушування, г;

100 – коефіцієнт перерахунку результату у відсотки.

2.4.7 Тест на кислотність та лужність: пробю масою 1 г поміщають у склянку місткістю 50 см³, вносять 15 см³ дистильованої води, витримують протягом 1 хв, додають дві-три краплі фенолфталеїну. Безбарвність не має змінитись. При внесенні 0,5 см³ гідроксиду натрію розчин повинен забарвитися в рожевий колір [76].

2.4.8 Тест на оксалати: пробю масою 1 г розчиняють 5 см³ соляної кислоти при перемішуванні в склянці місткістю 50 см³. Якщо розчин став каламутним, його фільтрують крізь обеззолений фільтр. Потім до розчину додають 10 см³ оцтовокислого натрію. Після закінчення досліду і протягом 1 год не повинно спостерігатися помутніння розчину та утворення осаду оксалату [76].

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						45
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.4.9 Визначення масової частки фторидів: пробу масою 1 г поміщають у склянку місткістю 150 см³, розчиняють 5 см³ розчину соляної кислоти, перемішують до повного розчинення цитрату кальцію, потім додають 50 см³ дистильованої води, 10 см³ розчину лимоннокислого натрію, 10 см³ розчину трилону Б і перемішують [76].

Розчин кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 см³, доводять об'єм дистильованою водою до мітки та перемішують. Визначають рН одержаного розчину. У разі відхилення від необхідного значення рН (5.5 ± 0.1), проводять коригування додаванням розчину гідроксиду натрію. У пластмасову склянку місткістю 100 см³ поміщають 50 см³ даного розчину та вимірюють електродний потенціал. За калібрувальним графіком знаходять концентрацію фторид-іонів у розчині (мг/см³) [76].

2.5 Методи очистки цільового продукту

Очищення цитрату кальцію – це процес виділення її з культуральної рідини та надання їй кінцевої форми.

Існують багато методів виділення лимонної кислоти з культуральної рідини і всі вони базуються на осадженні органічних кислот: додавання вапняного молока, карбонату кальцію або інших солей кальцію.

Для початку культуральну рідину відправляють на вакуум-фільтр, де проходить виділення біомаси гриба. Фільтрат направляють у реактор змішувач з механічним перемішуючим пристроєм, куди направляють солі кальцію для осадження цитрату, витримують 60 хв і частотою перемішуючого пристрою 40 об/хв. Осад відділяють на нутч-фільтрі, промивають водою з температурою 50-60°C, допоки значення рН не буде нейтральним. Осад сушать при температурі 105°C і отримують цитрат кальцію з масовою часткою 99,29%. Теоретичний вихід складає близько 62% від теоретичного за реакцією 2.2 [77]. Фільтрат після

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						46
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

промивання відправляють на повторне виділення цитрату кальцію у реакторі з додаванням вапняного молока або інших солей кальцію.

Карбонат кальцію використовують наступним чином: проводять додавання карбонату кальцію в прозору рідину для проведення реакції нейтралізації з утворенням реакційної рідини, що містить щонайменше один із двох осадів, включаючи дигідроцитрат кальцію та кальцій моногідрогенцитрат, де біологічний агент у вигляді біомаси *A. niger* в прозорій рідині видалюються з культуральної рідини фільтрацією, а значення рН у кінцевій точці реакції досягає 2,0-4,0; проводять відділення твердої фази та її промивання; проведення реакції екстракції сірчаною кислотою твердого осаду, отриманого на попередній стадії, де значення рН у кінцевій точці реакції досягає 1,5-2,5; після реакції проводять промивання осаду для отримання солей кальцію та ацидолізної рідини лимонної кислоти з концентрацією від 20% до 45% мас. Отриманий осад повертають на етап екстракції для уникнення втрат цитрату. Перевагами методу є низька собівартість виробництва, високий вихід і менша кількість відходів [78].

У даній технології виробництва доцільно використовувати виділення лимонної кислоти за допомогою вапняного молока (гідроксиду кальцію). Технологія подібна до екстракції карбонатом кальцію, оскільки осадження відбувається саме завдяки іонам Ca^{2+} . Вона є більш економічною, а утворений гіпс після переробки відходів можна використовувати повторно. Окрім того, використання амінних екстрагентів лише набирає популярності і оптимальна технологія ще не повністю розроблена. Метод за екстракції за допомогою вуглекислого газу потребує великих витрат чистого вуглекислого газу, що не є економічно доцільним.

2.6 Вплив цільового продукту на біохімічні процеси організму людини

Із кишківника кальцій абсорбується у розчинній іонізованій формі. Для його абсорбції необхідна присутність вітаміну D. Розчинення препарату краще

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

відбувається в кислому шлунковому середовищі. Розчинений іонізований кальцій добре проникає у всі тканини і органи, проходить через плацентарний бар'єр, попадає в грудне молоко. Виводиться із організму в основному з фекаліями у вигляді не абсорбованого кальцію, приблизно 20% виводиться із сечею нирками.

Основними показаннями для застосування є: гіпокальціємія, викликана кровотечами різного походження; для поповнення збільшеної потреби в іонах кальцію у дітей, вагітних та годуючих груддю жінок; при травмах; порушенні всмоктування при захворюваннях шлунково-кишкового тракту та підвищеному рівні виведення кальцію через нирки та кишечник; остеопороз у людей похилого віку, остеомалія, зневоднення організму, алергічні захворювання та алергічні ускладнення при прийомі медикаментів, підвищена проникливість судинної стінки; захворювання шкіри, гепатити різного походження, пароксизмальні міоплегії, знижене зсідання крові, нефрити [79].

Препарат кальцій цитрату підвищує рівень кальцію в плазмі, що призводить до зменшення потоку кальцію та збільшення відкладення кальцію в кістках. Збільшення концентрація кальцію в плазмі призводить до зменшення потоку кальцію з активних остеоцитів шляхом зменшення секреції паратиреоїдного гормону (ПТГ). Кальцій робить це шляхом стимуляції рецептора кальцію, зв'язаного з G-білком, на поверхні клітин паращитовидної залози. Зменшення потоку кальцію збільшує кількість кальцію, що відкладається в кістці, що призводить до збільшення мінеральної щільності кісткової тканини. Зменшення секреції ПТГ також зменшує кількість вітаміну D, метаболізованого до його активної форми, кальцидіолу. Оскільки кальцидіол збільшує експресію кальцій-залежних АТФаз і транзиторного рецепторного потенціалу катіонних каналів, які беруть участь у поглинанні кальцію з кишечника, зменшення кальцидіолу призводить до меншого всмоктування кальцію. Крім того, активність каналу, відповідального за реабсорбцію кальцію в нирках,

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						48
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

знижується, коли секреція ПТГ знижується, таким чином збільшуючи виведення кальцію через нирки [80].

Значна кількість ферментів використовують іон кальцію в якості кофактора. У цитоплазмі клітин еукаріот за допомогою іонних насосів у спокої підтримується дуже низька концентрація іонів кальцію, для того щоб у мить надходження кальцієвого сигналу відбулася відповідна йому активація клітини. Іони кальцію необхідні для роботи білків екзоцитозу та ендоцитозу, вивільнення везикул та секреції речовин з клітини назовні. Клітинні рухи, пов'язані з перебудовою цитоскелету та ковзанням міозину й актину відбуваються за обов'язкової участі іонів кальцію. Для скорочення м'язових фібрил необхідно зв'язування іонів кальцію з активним центром тропоніну-С. Утворений комплекс взаємодіє з тропоміозином, що дозволяє відкрити активні центри актину, з якими може зв'язатися голівка міозину. Електричні сигнали, що призводять до деполяризації клітинних мембран, пов'язані з надходженням іонів кальцію до клітини. Іони кальцію є одним з факторів зсідання крові у ссавців та людини [81].

В цитоплазмі клітини підтримується низький рівень вільних іонів кальцію, через це вхід іонів до цитоплазми з міжклітинного простору або з внутрішньоклітинних кальцієвих депо є потрібним для активації кальцій-залежних білків. Іони кальцію (нарівні з молекулами цАМФ, цГТФ, інозитолтрифосфату і діацилгліцеролу) є найважливішим вторинним сигналізатором, який передає зовнішні сигнали від рецептора на мембрані до інших клітинних структур [82].

Отже, сполуки кальцію ущільнюють стінки судин, тим самим можуть упереджати проникненню алергенів всередину, забезпечують нормальне скорочення м'язів, знімає набряки завдяки виведенню зайвої рідини, покращує згортання крові, бо разом з вітаміном К стимулює утворення тромбопластину, перетворенню протромбіну на тромбін, полімеризації фібрину.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						49
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

3.1.1 Особливості геному *Aspergillus niger*

Мікроміцет *Aspergillus niger* представляє цікавість не лише з точки зору продуцента лимонної кислоти чи мітотоксинів, а й в якості регулятора ендогенних рослинних гормонів. Саме тому вивчення геному цього гриба є популярною сферою досліджень в біотехнології. Штами виду *Aspergillus niger* виробляються нативні і гетеролітичні білки, органічні кислоти, вторинні метаболіти, включаючи біофармацевтичні препарати та мітотоксини: охратоксин А, фумонізиди В₁ та В₂, гормони росту рослин (гіберелін, ауксин та абсцизову кислоту [83, 84, 85].

Технологія проведення секвенування ДНК проводять наступним чином (на прикладі *Aspergillus niger* CSR3): спори ендofітного штаму гриба *A. niger* [6] інокують у тверде середовище дріжджового автолізу Чапека. Свіжі спори збирають через 7–10 днів, потім суспендують в 0,1% розчині *Tween 80* при 5°C протягом 3 тижнів. Біомасу збирають зі струшувальних колб, що містять 200 см³ середовища Чапека, використовуючи *Miracloth*, щоб відокремити біомасу від середовища. Потім відокремлену біомасу сушать заморожуванням і зберігають при -80°C. Проводять екстрагування ДНК, а виділену ДНК елюють 50 мкл буфера і зберігають при -20°C. Чистоту та цілісність геномної ДНК оцінюють за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі та визначають за допомогою спектрофотометра і флуорометра.

Після проведених процедур послідовність секвенують. Таким чином

					ДП БТ-9122.00 ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Шопова З. С.				Розділ 3. Методи Отримання промислових продуцентів	Стадія	Арк.
Конс.	Шибєцький В. Ю.						50
						Акрушів	
Керівн.	Дзигун Л. П.					КПІ ім. І. Сікорського	
Затв.						ФБТ	
							177

отримано 41 мільйон зчитувань, ~32,14 Гб необроблених даних послідовності [86].

Загалом збірний геном (рис. 3.1) має розмір 35,8 Мб і складається з 12 442 генів, що кодують білок, 270 тРНК і 57 рРНК. Генетичний матеріал організований у 8 хромосомах. Аналіз показав, що у *A. niger* наявно 3431 повтор послідовностей, 274 переміщуваних елементів та 205 інвертованих повторів [86].

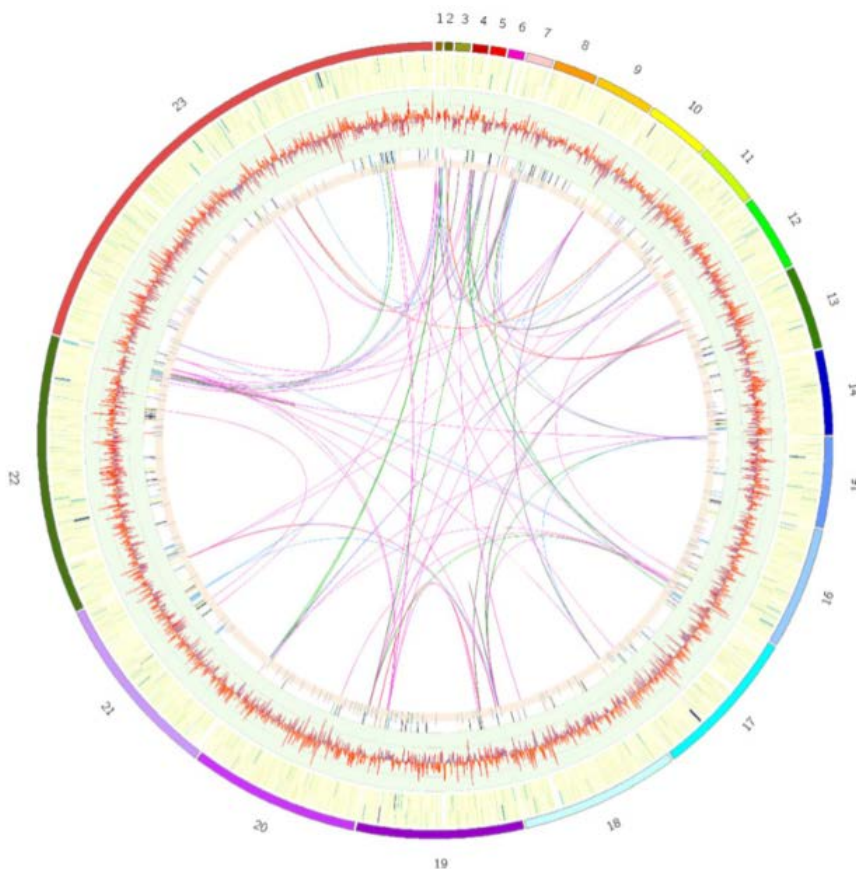


Рисунок 3.1 – Зображення геному *Aspergillus niger* CSR3. Геномні особливості: геном складається з 49,5% вмісту пар GC. Транспозонні елементи позначені: жовтим – CACTA_TIR, червоним – Copia, зеленим – hAT, блакитним – helitorn, помаранчевим – LTR, синьо-фіолетовим – Mutator. тРНК – темно-зелений, рРНК – фіолетовий. Інвертовані повтори з'єднані кольоровими лініями: ІП>10 кб (чевроний), 5 кб<ІП<10 кб (зелений), 1 кб <ІП<5 кб (рожевий), інші – синій. Геном був розбитий на 23 кластери [86]

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

51

Методом мітотичного кросинговеру було побудовано генетичну карту дикого штаму *Aspergillus niger* N402 [87]. Мітотичний кросинговер – тип генетичної рекомбінації, який проходить в соматичних клітинах при мітотичних поділах. Використовується для дослідження зчеплених генів [88]. Для вибору кросоверних продуктів використовувалися колірні маркери (для першої хромосоми) і маркери стійкості (на всіх хромосомах, крім другої та п'ятої). Також використовувалися ауксотрофні маркери (на всіх хромосомах). Гетерологічні трансформанти *amdS* надавали контрселективний маркер *amdS* на другій хромосомі. Генетична карта наведена на рис. 3.2.

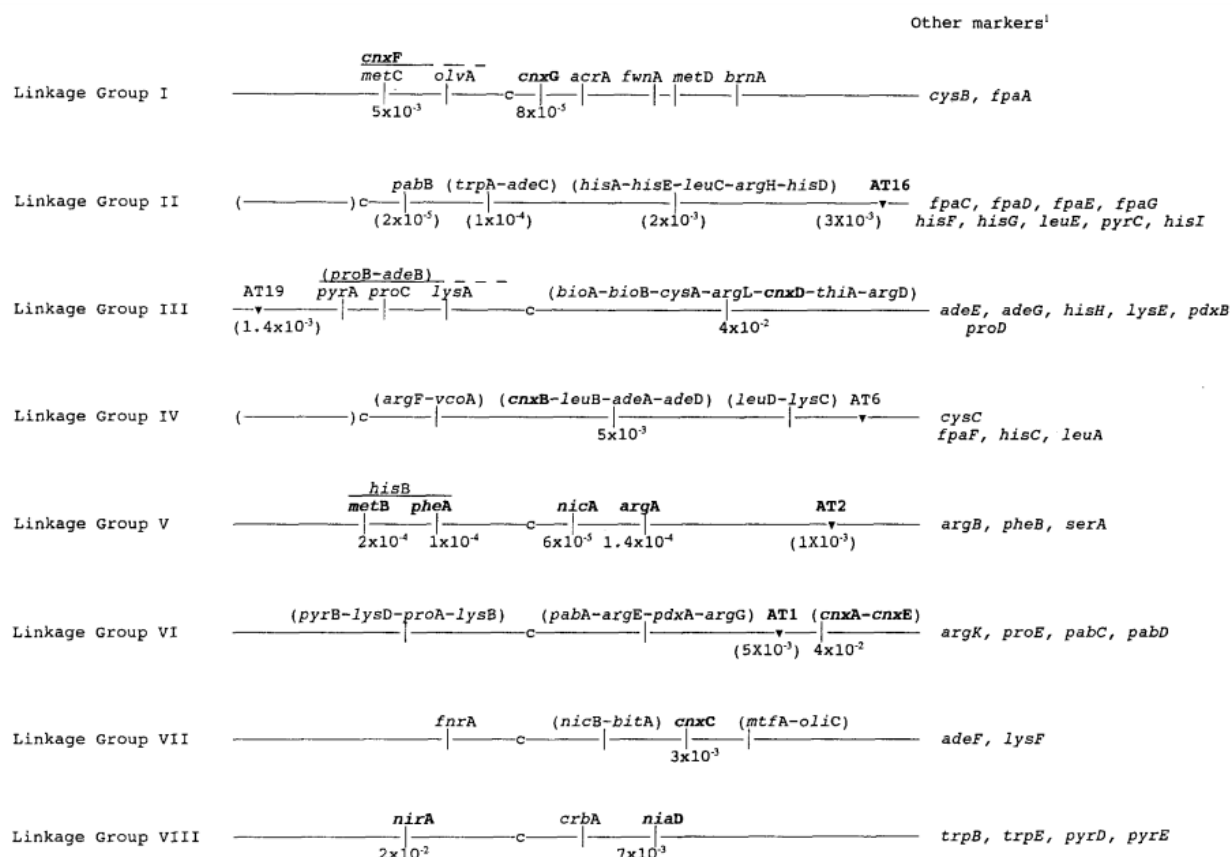


Рисунок 3.2 – Генетична карта *A. niger* (не масштабована). На генетичній карті відстані вказують на абсолютні частоти рекомбінантів і представляють відстані від маркерів до центромери [87]

Маркери в генетичному картографуванні використовуються для визначення розташування генетичних локусів на хромосомах та встановлення їх

порядку. Вони допомагають вивчати спадкові зв'язки між генами і визначати, як вони спадковуються разом або відокремлено один від одного. Застосування маркерів у генетичному картографуванні дозволяє визначити положення генетичних локусів на хромосомах і побудувати генетичну карту, яка відображає порядок розташування цих локусів. Це дає змогу вивчати спадкові зв'язки, проводити аналіз рекомбінантів і трансформантів, а також розробляти стратегії для подальших експериментів у генетичних дослідженнях [87].

3.1.2 Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу.

Лимонна кислота є першим проміжним продуктом циклу Трикарбонових кислот (ЦТК) і синтезується шляхом конденсації ацетил-КоА і оксалоацетату (1) за участі ферменту цис-аконітази. Ацетил-КоА перетворюється з 1 моль вуглекислого газу, що виділяється в мітохондріях при диханні, в той час як оксалоацетат утворюється через карбоксилювання пірувату з фіксацією вуглекислого газу в цитоплазмі. Оксалоацетат потім перетворюється на яблучну кислоту, переноситься в мітохондрії через малат-цитратний човник. Яблучна кислота знову перетворюється на оксалоацетат, який бере участь у синтезі лимонної кислоти. Один моль глюкози перетворюється на 1 моль лимонної кислоти з 1 моль АТФ і 3 моль НАДН, що призводить до максимального теоретичного виходу 1,067 г/г глюкози [40].

Накопичення цитрату та АТФ оборотно інгібують гліколітичні шляхи в клітині, проте *A. niger* здатний накопичувати велику кількість лимонної кислоти. Метаболічний шлях її утворення (рис. 3.3) оптимізується шляхом модифікації геному для покращення використання вуглецевих субстратів, підвищення біосинтезу цитрату та його попередників, видалення побічних продуктів та зниження зворотного інгібування дихального ланцюга.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						53
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

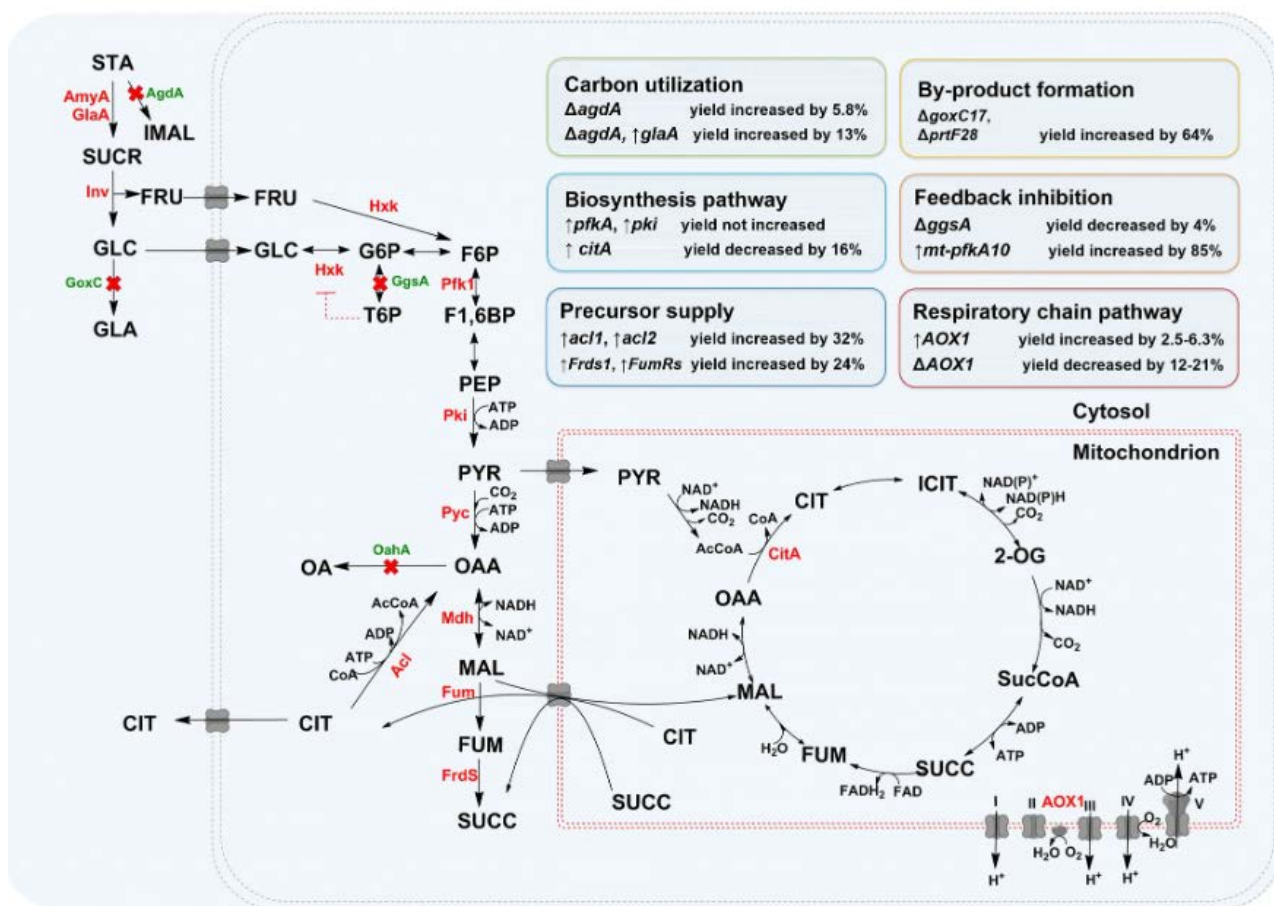


Рисунок 3.3 – метаболічний шлях біосинтезу лимонної кислоти. Видаленню підлягають гени, зображені зеленим кольором, а червони – гени, що підлягають підсиленню. Червона пунктирна лінія з вертикальною рисою описує зворотне інгібування: трегалозо-6-фосфат інгібує активність ферменту, що кодується геном Hxk. Гени, які необхідно загальмувати: GexC, GgsA, OahA, підсилити – AmyA, GlaA, Inv, Hxk, Pfk1, Pki, Pyc, Aci, Mdh, Fum, FrdS, CitA, AOX1 [89].

Таким чином, у випадку проведення вказаних маніпуляцій, для ділянки використання сполук вуглецю: інгібування генів agdA із супутньою стимуляцією glaA підвищує вихід цитрату на 13%, в той час як просто інгібування підвищує рівень виходу на 5,8%. Для біосинтезу: стимуляція pfkA, pki збільшення виходу не виявлено, а у випадку citA збільшення складає 16%. Постачання попередників: стимуляція acI1, acI2 – збільшує на 32%, FrdS1, FumRs – 24% . Утворення побічних продуктів: зниження експресії генів goxC17, prtF28 збільшує вихід на

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

54

64%. Зворотне інгібування: пригнічення гену *ggsA* – знижує на 4%, *mt-pfkA10* – збільшує на 85%. Шлях дихального ланцюга: стимуляція гену *AOX1* підвищує вихід на 2,5-6,3%, а його пригнічення – зменшує на 12-21% [89].

3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

3.2.1 Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів

Зазвичай на етапі виробу штаму для продукування лимонної кислоти звертаються до індукованого мутагенезу. Природний або штучний добір може використовуватись на етапі пошуку вихідного штаму для подальшої обробки мутагенами.

Природний добір не використовується, оскільки лимонна кислота не є життєво необхідним метаболітом для життєдіяльності гриба *Aspergillus niger*. Сутність природного добору полягає в утворенні нових штамів з новими властивостями та характеристиками, що могли б покращити життєдіяльність організму в пристосуванні до умов зовнішнього середовища.

Штучний добір так само не є основним методом відбору найпродуктивніших штамів, проте цим способом можна обрати найбільш вдалий штам зі сприятливими властивостями для глибинного культивування. Для цього проводять експерименти з багатократним пересаджуванням відомих штамів на тверде агаризоване середовище, після чого висівають у рідке середовище в колбах. Наприклад, однією з досліджуваних характеристик може бути щільність переплетення гіф та їхній розмір. Чим менші гранули утворює гриб, тим краще він підходить для глибинного промислового культивування через покращену доступність до поживних речовин та кисню за рахунок збільшення площі поверхні контакту з культуральною рідиною [90].

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						55
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Штучний добір так само не є основним методом відбору найпродуктивніших штамів, проте цим способом можна обрати найбільш вдалий штам зі сприятливими властивостями для глибинного культивування. Таким чином, було викоремлено штам *Aspergillus niger* ВКІМ F-713 – продуцент лимонної кислоти, який здатний до росту як в глибинних, так і поверхневих умовах, і перевершує батьківський штам *A. niger* ВКІМ F-326 на 9-41% (в залежності від умов проведення ферментації та субстрату) [90].

За цим винаходом, *A. niger* ВКІМ F-713 збільшує вихід цитрату через значні зміни морфолого-культуральних та фізико-біохімічних властивостей. Даний штам здатен при глибинному культивуванні формувати дуже дрібні гранули, внаслідок чого у 1 см³ середовища їх формується в 2 рази більше за штам *A. niger* ВКІМ F-326. Така структура міцелію та гіф за рахунок збільшення поверхні контакту з поживним середовищем та покращенню доступу розчиненого кисню дозволяє підвищити конверсію цукрів та посилити біосинтетичну діяльність гриба. Для цього вихідний штам обробляли УФ-випромінюванням, після чого штучним добором обирали найкращих продуцентів і закріплювати надбані властивості. Таким чином, вирощуючи опромінені штами, обирають найбільш придатні для глибинного культивування інокулюми [90].

3.2.2 Використання індукованого мутагенезу

При селекції нових штамів *Aspergillus niger* найчастіше використовують комбінацію фізичних та хімічних мутагенів, окрім того так само застосовують штучний добір для виокремлення мутованих штамів.

Фізичний мутаген – УФ-світло (λ -200-400 нм). Для успішної модифікації культуру спорову 24-годинну суспензію гриба переносять в стерильний 0,0005% водний розчин діоктилсульфосукцинату. Доза УФ-опромінення лампами з потужністю 30-75 Вт на відстані 20 см суспензії спор складає $1,2 \cdot 10^6$ Дж/м²·с для

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		56

різних інтервалів часу (15-180 хв). Готують криву виживання, і для мутації організму обирають такий час опромінення, щоб на етапі 3log-kill концентрація клітин була $0,5 \cdot 10^6$ КУО/см³. Мутанти відбирають у кількості 100-150 одиниць, та висівають у рідке поживне середовище [91]. Найкращий мутант відбирається серед численних варіантів. Таким (або схожим) чином опромінення УФ-променями отримують модифіковані штами, які після культивування досліджують на вихід лимонної кислоти [92].

Хімічний мутагенез проводиться через вплив визначених реагентів на культуру. Найпопулярнішим методом є використання N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідину: спорову суспензію з твердого поживного середовища промивають 0,01% розчином *Tween 80*, а фрагменти міцелію та конідієносці видаляють фільтрацією крізь бавовняний фільтр. Отриману рідину розчиняють в 0,05 М трис-малеатному буфері (рН=6,0). Кінцева концентрація спор становить 10^7 - 10^8 КУО/см³, а концентрація NNG – 1 мг/см³. Розчин інкубують при 30°C, а через 1-4 години зразки відбираються, розбавляються холодним буфером аналогічного складу (1:9) та очищуються від NNG центрифугуванням та промиванням.

Інший метод полягає в обробці етил-метан-сульфонатом 1 мг/см³ із додаванням акридинового помаранчевого, які розводять у фосфатному буфері з рН=7 з концентрацією 50 г/см³. Додають спори *Aspergillus niger* у кількості 10^7 - 10^8 КУО/см³. Після інкубації протягом часових інтервалів (30-180 хвилин, з інтервалом 30 хвилин: 30, 60, 90, 120, 150 і 180 хв), пробірки були центрифуговані протягом 15 хвилин зі швидкістю 10 000 об/хв. Після обробки спор мутагеном, 100-кратні серійні розведення спор, які, можливо, містять мутації, були висіяні, не більше 30 колоній на СГА [93].

Популярності набирає метод опромінення пучками іонів вуглецю (¹²C⁶⁺) і рентгенівським опроміненням. Результати показали, що опромінений штам

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						57
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Aspergillus niger H4002 в умовах звичайного глибинного культивування за рахунок використання гідролізату кукурудзяного борошна накопичив 177,7–196 г/дм³ лимонної кислоти (початковий вміст цукру складав 200,0-235,7 г/дм³) з продуктивністю 2,96–3,27 г/дм³·год. В порівнянні з вихідними штамми найкраще економічне виробництво лимонної кислоти досягало 187,5±0,7 г/дм³ з продуктивністю 3,13 г/дм³·год [94].

3.2.3 Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно-активних речовин

Гібридизація – процес створення гібридного штаму продуцента, в основі якого покладено об'єднання генетичного матеріалу різних представників мікроорганізмів, що зливається в одній клітині.

Одним з методів гібридизації у випадку *Aspergillus niger* є отримання гібрида *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* та *Aspergillus niger* шляхом фузії протопластів, що призводить до отримання дочірніх рекомбінантних штамів. Штам, отриманий з гетерокаріону за допомогою d-камфори, показав подвійний вміст ДНК на конідії, діаметр якої приблизно в 1,2 рази менший за діаметр конідії штамів-попередників, і який розглядався як гетерозиготний диплоїд. Диплоїдний штам був оброблений беномілом як агентом гаплоїдизації, що призвело до отримання багатьох сегрегантів. Сегреганти були фенотипово одиночними і подвійними ауксотрофами, а також прототрофами. Були відібрані прототрофні сегрегантні штами, і їхня гаплоїдність була підтверджена за вмістом ДНК та розмірами самої конідії. Результати свідчать про те, що сегреганти диплоїдних штамів, індуковані беномілом, мають генетичні зміни, що впливають на виробництво ферментів та лимонної кислоти [95].

Після обробки беномілом у концентраційному діапазоні від 0,50 до 0,70 ppm було остаточно відібрано кілька штамів, які потім були протестовані на

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		58

ефективність продукування лимонної кислоти та амілази. У випадку диплоїдного штаму IN2-T2-D вихід цитрату покращився порівняно з гетерокаріоном (161,4 мг проти 156,5 мг). Вихід цитрату у випадку оброки беномілом склав 215 мг. Культивування проводилось у пробірках, субстратом виступило напіврідке поживне середовище [95].

3.2.4 Регуляція метаболізму у мікробній клітині

Регуляція метаболізму у випадку гриба *Aspergillus niger* може відбуватись шляхом зміни компонентного складу поживного середовища або за попередньою генетичною модифікацією.

Як було продемонстровано на рис. 3.3, завдяки регуляції експресії генів можна впливати на метаболізм клітин гриба *Aspergillus niger* та підвищувати вихід лимонної кислоти.

У разі використання в якості субстрату крохмалевмісних сполук, близько 2-3% цукру залишається в культуральній рідині. При розкладанні крохмалю ферментами *A. niger* утворюється ізомальтоза під дією ферменту α -глюкозидази. Видалення гену *agdA*, що кодує α -глюкозидазу, ефективно знижує концентрацію ізомальтози [96]. У поєднанні з надмірною експресією гена *glaA*, що кодує глюкоамілази, концентрація залишкового цукру знизилася приблизно на 88,2%, а виробництво лимонної кислоти збільшилося на 16,9%. Мультикопії гена *glaA* під нативним промотором *PagdA* покращують позаклітинну активність глюкоамілази на 34,5% [96]. Активність глюкоамілази не корелює строго позитивно з виходом лимонної кислоти, але вона значно впливає на оцукрювання при використанні кукурудзяного крохмалю як джерела вуглецю [86].

Ацетил-КоА і оксалоацетат є двома прямими сполуками для синтезу лимонної кислоти. Ацетил-КоА утворюється піруватдегідрогеназою (PDH), цитозольною ацетил-КоА-синтетазою (ACS) і АТФ-цитратліазою (ACL), а також бета-окисленням жирних кислот [97]. Делеція *acl1* в *A. niger* AB4.1 збільшила

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						59
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

кількість органічних кислот, включаючи янтарну кислоту та лимонну кислоту [98], а делеція двох цитозольних субодиниць ACL (ACL1 і ACL2) у *A. niger* ATCC1015 призводила до зменшення виробництва лимонної кислоти, що супроводжувалося зменшенням нестатевого конідіогенезу, проростання конідій і росту клітин [97]. Навпаки, надмірна експресія показала зворотні ефекти, що свідчить про те, що ACL є корисним для накопичення лимонної кислоти [86].

Оксалоацетат утворюється шляхом карбоксилювання пірувату в цитоплазмі і згодом перетворюється на яблучну кислоту, яка після потрапляння в мітохондрії через малат-цитратний човник знову перетворюється на оксалоацетат, що бере участь у синтезі лимонної кислоти. Таким чином, було сконструйовано цитозольний відновний цикл ТСА (rTCA), шляхом імплантації гетерогенної малатдегідрогенази, фумарази і фумаратредуктази [99]. Було виявлено, що надекспресія цитозольної фумарази FumR і цитозольної фумаратредуктази Frds1 покращує продукцію лимонної кислоти, тоді як надекспресія малатдегідрогенази Mdh2 лише прискорює початкову швидкість виробництва [75, 86].

Трегалоза-6-фосфат сильно інгібує активність гексокінази [100]. Однак пригнічення гену *ggsA*, що кодує трегалозо-6-фосфатсинтазу, лише незначно призвело до більш раннього початку накопичення лимонної кислоти, і кінцеве виробництво лимонної кислоти було навіть знижено порівняно з вихідним штамом [101]. Науковці припустили, що асиміляція трегалози, активованої сигнальним шляхом cAMP-РКА на ранній стадії росту, може послабити інгібування гексокінази, що призведе до переходу метаболізму глюкози від пентозофосфатного шляху до гліколізу та, одночасно, ініціювання накопичення лимонної кислоти [86, 102, 103].

PFK є ще одним важливим етапом контролю гліколізу через алостеричні інгібування або активацію. АТФ і лимонна кислота є інгібіторами PFK. Спонтанна посттрансляційна модифікація відіграє життєво важливу роль у збереженні високої активності *A. niger* PFK1 [102]. У експериментальних

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						60
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

дослідженнях нативний PFK1 (85 кДа) був розщеплений до неактивного фрагмента (49 кДа), який міг бути реактивований шляхом фосфорилування РКА [102]. Коротший фрагмент PFK1 не тільки стійкий до інгібування цитрату, але також більш сприйнятливий до позитивних ефекторів, таких як АМФ, іони амонію та 2,6-бісфосфат фруктози, який знижує інгібування АТФ. Виходячи з цього, було створено активний коротший фрагмент PFK1 *mt -pfkA10* з односайтовою мутацією T89D, щоб уникнути потреби у фосфорилуванні. *A. niger TE23*, сконструйований шляхом надекспресії активного коротшого фрагмента PFK1 в *A. niger A158*, продемонстрував продукцію лимонної кислоти 120 г/дм³ через 300 годин, приблизно на 70% вище, ніж у контрольного штаму [86, 104].

У процесі синтезу лимонної кислоти еквівалентне кількісне перетворення глюкози в лимонну кислоту генерує 1 моль АТФ і 3 моль НАДН. Цикл окислення НАДН за допомогою цитохром-залежного дихання зазвичай генерував надлишок АТФ, який обернено інгібував PFK і порушував потік гліколізу. Таким чином, коли лимонна кислота починає накопичуватися, цитохром-залежне дихання замінюється альтернативним шляхом, що забезпечує окислення НАДН без супутньої продукції АТФ [40, 105]. На початку накопичення лимонної кислоти активність цитохром-залежних дихальних ферментів, особливо комплексу I, знижується через дефіцит Mn^{2+} , тоді як активність АOX зростає [106, 86].

Згідно з гіпотезою Romo A.E., штами з надлишковою експресією HGT1 продемонстрували вищу продукцію лимонної кислоти та нижчий вміст залишкового цукру [107]. Найкращий штам *A. niger 20-15* продемонстрував зниження загального вмісту цукру та залишкових відновлюючих цукрів на 16,5 та 44,7%, тоді як кінцеве виробництво лимонної кислоти було значно збільшено

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

до 174,1 г/дм³, що становить збільшення на 7,3% порівняно з до *A. niger* CGMCC 10142. Регуляція експресії HGT1 проводилась за допомогою промоторів P gla A і P aox1 [107].

Відомо, що для *Aspergillus niger* діє правило «більше цукру – більше цитрату», тобто збільшення концентрації вуглеводів збільшує вихід лимонної кислоти. Окрім того, на перебіг метаболізму позитивно впливають іони мангану та магнію. Тобто при додаванні їхній солей можна покращити біосинтез продукту. Надсинтез лимонної кислоти відбувається в ідіофазі при лімітуванні середовища залізом та фосфором при одночасному надлишку джерела вуглецю (5-20% сахарози) за низьких значень рН.

3.2.5 Використання методів генної та клітинної інженерії

Для редагування геному *Aspergillus niger* все активніше використовується технологія CRISPR/Cas9. Один із варіантів полягає в наступному: за допомогою штаму *A. niger* WU-2223L, який виробляє велику кількість лимонної кислоти, був розроблений метод генетичного редагування, що базується на системі CRISPR/Cas9 та включає спільну трансформацію Cas9 та фрагменту ДНК, що кодує одноланцюгову рНК-матрицю (sgRNA) [108]. З використанням цієї системи було отримано штам з видаленням гена АТР-сульфурілази (sC) від WU-2223L. Крім того, за допомогою внутрішньомолекулярної гомологічної рекомбінації було виконано одноетапне відновлення маркерного гена sC, що дозволило здійснити редагування геному без маркера та значно скоротити період заміни генів, обійшовши процедуру трансформації для відновлення гена sC. Таким чином, вдалося створити швидку та безмаркерну систему заміни генів на основі CRISPR/Cas9 для штаму WU-2223L, який виробляє більшу кількість цитрату [108].

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Отримання промислового продуцента фізичним мутагенезом проводиться за використанням дикого штаму *A. niger*, ізольованим з ґрунту в Єгипті, та збереженим в Інституті Пастера (Колекція грибів) у Парижі, Франція, під кодом UМІР 2564.04. Приготування починається з підготовки поживних середовищ. Блок-схема отримання промислового продуценту зображена на рис. 3.4.

Процес починається з приготування поживних середовищ Чапека для вирощування грибів, на які висівається ресуспендована культура гриба *A. Niger*, представлена висушеними спорами.

Після вирощування на середовищі Чапека у чашках Петрі (5 діб при температурі 27°C) культуру пересівають на середовище з наступним складом (г/дм³): сахароза (або бурякова меляса) 160, NaNO₃ 4, КН₂РO₄ 1, MgSO₄·7Н₂O 0,23, FeCl₃ 0,02, ZnSO₄ 0,0012, MnCl₂·Н₂O, 0,0012. рН середовища знаходиться в межах 4 ± 0,2. Мелясу перед використанням необхідно попередньо обробити наступним чином: фізична обробка включає центрифугування меляси при 4000 об/хв до повного осадження осаду; хімічна обробка включає калій фероціанід, сульфатну кислоту, фосфат кальцію, натрій фітат та метанол [110-112].

Після пересівів з чашки Петрі та колб обов'язково проводять ідентифікацію культури та наявність контамінації. Для цього колонії відбирають та проводять фарбування різними методами та роздивляються під мікроскопом. За потреби проводять ПЛР-тестування для дослідження ДНК і підтвердження відповідності штаму.

Усі середовища стерилізуються автоклавуванням при 121°C протягом 15 хвилин. Рівень рН встановлюється до проведення стерилізації [109].

Споровий матеріал з 5-денної культури розводять фізіологічним розчином (0,9% NaCl) за активного перемішування протягом 1 хвилини. Спори були

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						63
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

підраховують за допомогою гемоцитометра для встановлення кількості приблизно 10^7 КУО/см³ [109].

Для індукованого мутагенезу використовують УФ-випромінювання. Спорову суспензію у кількості 10 см³ світлюють УФ-лампою Perkin Elmer потужністю 30 Вт та довжиною хвилі 100-280 нм на відстані 20 см [92]. Ультрафіолетовий мутагенез проводиться з часом опромінення 18 хвилин. Суспензію залишають у темряві на 2 години для уникнення фотореактивації [109].

Спорову суспензію подають у колбу Ерленмейєра об'ємом 250 мл, куди доливають 100 см³ поживного середовища. Культуру інкубують при температурі $30 \pm 1^\circ\text{C}$ за умов постійного перемішування при 300 об/хв на шейкері протягом 24-48 годин.

Проводять пробовідбір та порівнюють вихід лимонної кислоти в порівнянні з батьківським штамом для підтвердження підвищеного синтезу цільового продукту.

Отриману культуру відправляють на стадію нарощування біомаси, а потім – на етапи виробничого біосинтезу.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						64
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

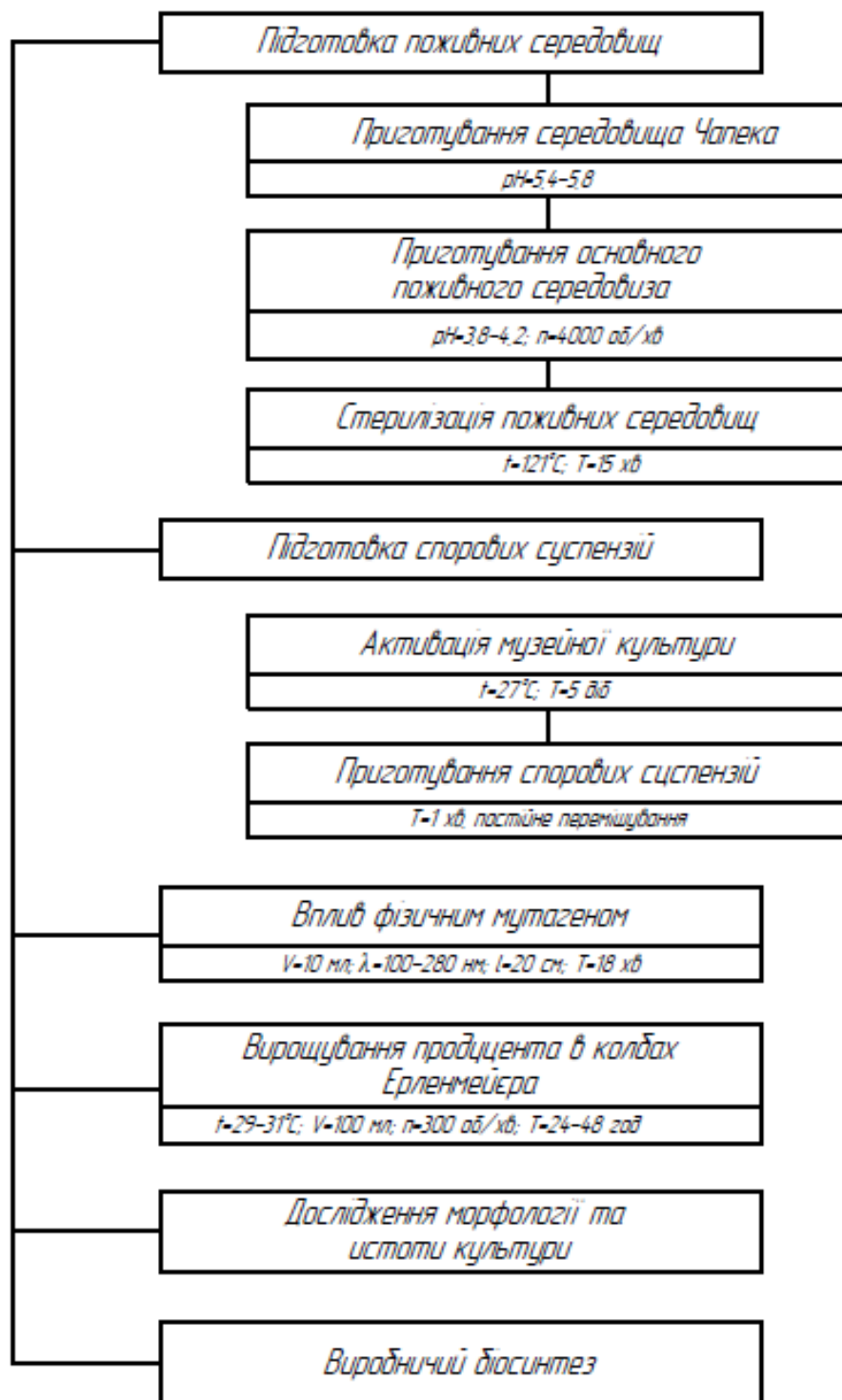


Рисунок 3.4 – зображення блок- схеми отримання промислового продуцента *Aspergillus niger* методом індукованого фізичного мутагенезу

РОЗДІЛ 4 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Назва продукції – кальцію цитрат за ДСТУ ГОСТ 54538-2011 Додатки харчові. Кальцію цитрат Е333(ііі). Технічні умови.

Фізико-хімічних характеристики: кінцевий продукт – кристалічний порошок білого кольору або безбарний, представлений сіллю лимонної кислоти та Кальцію. Використовується найчастіше в якості консерванту, рідше – для смаку [79].

Фармакотерапевтична група: препарати кальцію, код АТС А12А.

Цитрат кальцію зберігають не більше 2-х років за вологості повітря не більше 70%.

Маркування згідно з ДСТУ 4518-2008 «Продукти харчові. Маркування для споживачів. Загальні правила», ДСТУ 4260:2003 «Тара і пакування спожиткові маркування. Загальні вимоги» має містити наступну інформацію:

- Повну назву продукту;
- Код добавки;
- Найменування підприємства-виготовника та його адресу;
- Товарний знак;
- Дату виготовлення;
- Номер партії;
- Масу нетто;
- Срок та умови зберігання;
- Позначення діючого стандарту;

					ДП БТ-9122.00 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шопова З. С.			Розділ 4. Технологічна частина			
Конс.		Шидецький В. Ю.						
Керівн.		Дзигун Л. П.						
Затв.								
					Стадія	Арк.	Акрушів	
						66	177	
					КПІ ім. І. Сікорського			
					ФБТ			

- Інформацію про сертифікацію;
- При транспортуванні маркування також має містити маніпуляційний знак «Зберігати від вологи».

Оцінювання якостей продукції має здійснюватись відповідно до ДСТУ ISO/IEC 17025:2006 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій».

Тип і розміри мішків, граничну масу харчового цитрату кальцію, що упаковується, встановлює виробник.

Кальцій цитрат використовується у фармацевтичній галузі в якості харчової дієтичної добавки для підтримки здоров'я кісток і зубів, а також для нормального згортання крові. Кальцій та його сполуки відіграють ключову роль у процесах мінералізації та формуванні скелета. Знижує проникність судинних стінок, зменшує прояв алергічних реакцій, сприяє лікуванню зневоднення організму, а також спричинює лікувальну і профілактичну дію щодо хвороб кісток: остеопороз, остеомалія, а також травм.

Збут Кальцій цитрату здійснюється відповідно до Закону України "Про безпечність та якість харчових продуктів" від 17 грудня 1997 року № 771/97-ВР, який встановлює правила виготовлення, зберігання, транспортування та реалізації харчової продукції, а також норми та вимоги до її якості та безпеки.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						67
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Характеристика сировини, матеріалів і напівпродуктів, які використовуються у виробництві цитрату кальцію, наведено у таблиці 4.1.

Таблиця 4.1 – Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів для виробництва цитрату кальцію.

Найменування	Категорія та номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
Біологічний агент			
Музейна культура <i>Aspergillus niger</i> ВКПМ F - 722	Відповідно до технологічних регламентів виробництва	Усі показники відповідно до регламенту	Для отримання посівного інокуляту
1.Основна сировина			
1.1 Агар	ГОСТ 16280-2002	Масова частка сухого агару не менше 60% та інше згідно ГОСТ	Компонент поживного середовища
1.2 Вода питна	СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013	Нітрати – <0,00002%; важкі метали – <0,00001%; та інше згідно з ДСанПіН	Для миття; для подачі в сорочку; для генерації насиченої пари

Продовження таблиці 4.1.

1	2	3	4
1.3 Гексаціано-феррат калію $K_3[Fe(CN)_6]$	ГОСТ 4206-75	Масова частка основної речовини – не менше 99,5%, масова частка нерозчинних у воді речовин – не більше 0,005% та інше згідно ГОСТ.	Компонент поживного середовища
1.4 Глюкоза	ДСТУ 4464:2005	Масова частка вологи не більше 9% та інші показники згідно ДСТУ	Компонент поживного середовища
1.5 Дріжджовий екстракт	ГОСТ 30333-2007	Відповідно до ГОСТ	Компонент поживного середовища
1.6 Калій фосфорнокислий двозаміщений 3 – водний $K_2HPO_4 \times 3H_2O$	ГОСТ 2493-75	Масова частка $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ не менше 99%; масова частка нерозчинних у воді речовин <0,005%; масова частка азоту <0,001% та інше згідно з ГОСТ.	Компонент поживного середовища

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

69

Продовження таблиці 4.1.

1	2	3	4
1.7 Магній сульфат 7-водний (MgSO ₄ ×7H ₂ O)	ГОСТ 4523-77	Масова частка 7-водного сірчаноокислого магнію – >99,5%; масова частка нерозчинних у воді речовин – <0,002%; та ін. згідно з ГОСТ.	Компонент поживного середовища
1.8 Меляса бурякова	ДСТУ 3696-98	Масова частка сухих речовин не менше 75%, масова частка сахарози не менше 43%, масова частку незброджуваних цукрів не менше 44% та інше згідно ДСТУ.	Компонент поживного середовища
1.9 Оксалат амонію 1-водний	ГОСТ 5712-78	Масова частка оксалату амонію не менше 99,8%, рН 2,5%-го розчину 6,3-7 та інше згідно ГОСТ	Компонент поживного середовища
1.10 Пептон	ГОСТ 13805-76	Рівень рН 6,5-7,0 та інше згідно ГОСТ	Компонент поживного середовища
1.11 Піногасник Пропінол Б-400	ДСТУ 7881:2015	Згідно з ДСТУ	Компонент поживного середовища

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

70

Продовження таблиці 4.1.

1	2	3	4
1.12 Цинк сульфат 7-водний (ZnSO ₄ ×7H ₂ O)	ГОСТ 4174-77	Масова частка цинку сульфату не менше 99,5%; та інше згідно ГОСТ.	Компонент поживного середовища
2. Допоміжні речовини			
2.1 Біомой	ТУ У 22902465.005-96	Відповідає вимогам, наведеним у ТУ	Для миття приміщень, обладнання, тари тощо
2.2 Вапняне молоко	ТУ У 6-01-12-136-88	Масова концентрація активного оксиду кальцію не менше 182 г/дм ³	Реагент для утворення цитрату кальцію
2.3 Дезактин	ГОСТ 12.1.007-76.	Відповідає вимогам «Система стандартів безпеки праці. Шкідливі речовини» та вимогам ГОСТ	Для дезінфекції приміщень, обладнання та комунікацій.
2.4 Кальцинована сода	ГОСТ 5100-85	Масова частка вуглекислого натрію >98,5%; масова речовин, нерозчинних у воді <0,04%; насипна густина >1,1 г/см ³ та інше згідно з ГОСТ.	Для дезінфекції приміщень, обладнання та комунікацій.

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

71

Продовження таблиці 4.1.

1	2	3	4
2.5 Кислота соляна	ГОСТ 3118-77	Масова частка хлористого водню не менше 35%; масова частка заліза <0,001% та інше згідно ГОСТ	Для регулювання кислотності у збірнику нейтралізації
2.6 Перекис водню	ГОСТ 177-88	Масова частка перекису водню – 30-40%; масова концентрація нелеткого залишку – <0,7 г/дм ³ ; та інші показники згідно з ГОСТ.	Для дезінфекції приміщень, обладнання та комунікацій.
2.7 Хлоргексидин біглюконат	Відповідно до технологічних регламентів виробництва	Масова концентрація хлоргексидину біглюконату – 20%	Для дезінфекції приміщень, обладнання та комунікацій.
2.8 Хлорид натрію	ДСТУ 4886.24:2007	Масова частка хлориду натрію не менше за 99,9%; рН розчину з концентрацією 5% складає 5-8 та інші показники згідно з ДСТУ	Для дезінфекції приміщень, обладнання та комунікацій. Для активації музейної культури

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

72

Продовження таблиці 4.1.

1	2	3	4
2.9 Спирт етиловий	ГОСТ 5962-97	Масова частка спирту (70%)	Для дезінфекції
3. Матеріали			
3.1 Боросиликатне скло 3.3	ГОСТ EN 1748-1-1-2016	Розмір пор 8 – 115 мікрон	Для нутч-фільтру
3.2 Мішки паперові	ДСТУ 7796:2015	Поздовжній клейовий шов у мішку має напусток не менше ніж 10 мм; відсутні дефекти у вигляді розривів, отворів, клейових плям, тощо; міцність та інші показники відповідають ДСТУ.	Для первинного пакування готової продукції
3.3 Поліетиленовий вкладиш	ДСТУ 7275:2012	Внутрішні поверхні не злипаються, зварювальні шви рівні, без пропалених місць та зморшок та інші вимоги згідно з ДСТУ.	Для первинного пакування готової продукції

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

73

Кінець таблиці 4.1.

1	2	3	4
3.4 Фільтри високоефективної очистки	ДСТУ EN 1822- 1-2001	Ефективність фільтрації не менш за 99,999995% та інші показники згідно з ДСТУ	Для підготовки повітря
3.5 Фільтри грубої та тонкої очистки	ГОСТ 30528-97	Ефективність фільтрації не менш за 80-90% і 95- 98% та інші показники згідно з ГОСТ	Для підготовки повітря
4. Напівпродукти			
4.1. Культуральна рідина	Відповідно до технологічних регламентів виробництва	Концентрація лимонної кислоти – 117 г/дм ³	Для отримання готового продукту

4.3 Опис технологічного процесу

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Метою стадії є підготовка підприємства для запуску виробництва продукції, заходи якої включають навчання та підготовку співробітників, приготування мийних та дезінфікуючих розчинів, мийку та дезінфекцію виробничих приміщень, обладнання, тари.

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Персонал, який працює на виробництві, повинен мати достатній рівень кваліфікації і бути ознайомленим з принципами належної виробничої практики. Робітники повинні бути навчені згідно зі своїми обов'язками та відповідати гігієнічним вимогам, особливо якщо вони працюють у виробничих, лабораторних або інших зонах, які впливають на якість продукції [113].

Під час прийому на роботу працівникам необхідно пройти медичний огляд, а також періодично або при необхідності повторювати його. Кожен працівник, який працює в виробничих, лабораторних або інших зонах, що впливають на якість продукції, повинен мати на собі захисний одяг, який відповідає ступеню стерильності приміщень виробництва. На роботу не допускаються працівники з інфекційними захворюваннями або відкритими ранами на видимих частинах тіла без необхідного захисту, включаючи головний убір та інших засобів індивідуального захисту [113].

На виробництвах має проводитись регулярна перевірка мікробної контамінації рук з періодичністю не рідше 2 разів на тиждень та 1 раз на 2 тижня після обробки рук дезінфекційними розчинами [113].

ДР 1.2. Приготування мийних та дезінфікуючих розчинів

Метою стадії є приготування мийних та дезінфікуючих розчинів, які використовуються для підготовки обладнання та приміщень, видалення хімічних та біологічних забруднень, що безпосередньо впливає на якість продукції та напівфабрикатів.

ДР 1.2.1. Приготування розчину кальцінованої соди

Кальцинована сода у вигляді порошку подається об'ємним дозатором для сипких речовин у змішувач з механічним перемішуючим пристроєм та теплообмінною сорочкою, де змішується з водою очищеною. У сорочку подається гріючий теплоносії (вода), що підтримує температуру 55°C. Кінцева

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						75
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

концентрація розчину кальцинованої соди має складати 2%. Перемішування здійснюється 1-2 хв при частоті обертів мішалки 30-40 об/хв.

На даній стадії проводиться контроль технологічний та хімічний, що перевіряються за допомогою термометра та пробовідбору для визначення концентрації відповідно.

ДР 1.2.2. Приготування розчину дезактину

Дезактин подається об'ємним дозатором для сипких речовин у змішувач з механічним перемішуючим пристроєм та теплообмінною сорочкою, де змішується з водою очищеною. У сорочку подається гріючий теплоносій (вода), що підтримує температуру 55-65°C. Кінцева концентрація розчину дезактину має складати 0,5-2,5%. Перемішування здійснюється 1-2 хв при частоті обертів мішалки 30-40 об/хв.

На даній стадії проводиться контроль технологічний та хімічний, що перевіряються за допомогою термометра та пробовідбору для визначення концентрації відповідно.

ДР 1.2.3. Приготування розчину перекису водню 6%

Перекис водню 6%-ий готують у скляному посуді методом додавання пероксиду водню 37%-го у воду питну. Розчин перемішують та зберігають протягом 5 діб. Перемішування здійснюється 1-2 хв при частоті обертів мішалки 30-40 об/хв і температурі 20°C.

На даній стадії проводиться контроль технологічний та хімічний, що перевіряються за допомогою термометра та пробовідбору для визначення концентрації відповідно.

ДР 1.2.4. Приготування розчину біомію

Біомій у вигляді порошку подається об'ємним дозатором для сипких речовин у змішувач з механічним перемішуючим пристроєм та теплообмінною сорочкою, де змішується з водою очищеною. У сорочку подається гріючий теплоносій (вода), що підтримує температуру 35-45°C. Кінцева концентрація

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		76

розчину біомію має складати 0,5%. Для приготування 1 дм³ розчину необхідно взяти наважку 0,5 г біомію та змішати його з 995 см³ води. Перемішування здійснюється 1-2 хв при частоті обертів мішалки 30-40 об/хв.

На даній стадії проводиться контроль технологічний та хімічний, що перевіряються за допомогою термометра та пробовідбору для визначення концентрації відповідно.

ДР 1.2.5. Приготування розчину хлоргексидину біглюконату

Хлоргексидин біглюконат з концентрацією 20% розводять у співвідношенні 1:40 з 70%-им етиловим спиртом у змішувачі, після чого фільтрують у стерильну ємність через мембранний фільтр з порами розміром 0,45 мкм. Розчин зберігають у скляній тарі протягом 1 місяця. Кінцева концентрація розчину складає 0,5%. Перемішування здійснюється 1-2 хв при частоті обертів мішалки 30-40 об/хв за температури 25-30°C.

На даній стадії проводиться контроль технологічний та хімічний, що перевіряються за допомогою термометра та пробовідбору для визначення концентрації відповідно.

ДР 1.2.6. Приготування розчину хлориду натрію

Хлорид натрію у вигляді порошку наважкою 100 г подається об'ємним дозатором для сипких речовин у змішувач з механічним перемішуючим пристроєм та теплообмінною сорочкою, де змішується з водою очищеною. У сорочку подається гріючий теплоносій (вода), що підтримує температуру 40°C. Кінцева концентрація розчину хлориду натрію має складати 10%. Перемішування здійснюється 1-2 хв при частоті обертів мішалки 30-40 об/хв.

На даній стадії проводиться контроль технологічний та хімічний, що перевіряються за допомогою термометра та пробовідбору для визначення концентрації відповідно.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						77
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 1.2.7. Приготування розчину 70%-ого етилового спирту

Етиловий спирт з концентрацією 96% подається у змішувач через дозатор для сипких та рідких речовин разом з питною водою в пропорції 23:13. Кінцева концентрація спиртового розчину складає 70-71%, Термін зберігання розчину – 5-6 днів. Перемішування здійснюється за температури 20°C 1-2 хв при частоті обертів мішалки 30-40 об/хв.

На даній стадії проводиться контроль технологічний та хімічний, що перевіряються за допомогою термометра та пробовідбору для визначення концентрації відповідно.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

Метою даної операції є забезпечення видалення механічних та мікробних забруднень виробничих приміщень.

Для здійснення підготовки приміщень виконують заходи, спрямовані на видалення забруднень методами волого прибирання, дезінфекції та УФ-опромінення стін, підлоги, виробничих поверхонь відповідно до класу чистоти приміщення.

Прибирання проводять щозміни, проте з періодичністю раз на тиждень або на вимогу комісії проводять генеральне прибирання.

Під час заходів з генерального прибирання використовують 6%-ий розчин перекису водню, 0,5-2,5%-ий розчин дезактину, 2%-ий розчин кальцинованої соди та 0,5%-ий розчин хлоргексидину біглюконату. Проте мийні та дезінфікуючі розчини слід змінювати кожні 1,5-2 тижні, оскільки мікроорганізми при постійному впливі однієї і тієї ж речовини виробляють стійкість по відношенню до неї.

Для щоденного (щозмінного) прибирання вологим способом використовують 6%-ий розчин перекису водню або інші дезінфікуючі агенти та 0,5%-ий розчин біомию у розрахунку 100-150 см³ на 1м² поверхні. При

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		78

генеральному прибирання поверхні зрошують з гідропульту робочим розчином з розрахунку 150–200 мл/м², закривають приміщення на 30-40 хвилин, змивають залишки розчинів [113].

На даній стадії проводиться контроль технологічний та мікробіологічний.

ДР 1.4. Підготовка виробничого обладнання

Метою даної операції є чистка, дезінфекція та підготовка виробничого обладнання задля видалення механічних та мікробіологічних забруднень шляхом обробки мийними та дезінфікуючими розчинами.

Всі апарати, які використовуються на виробництві миють 0,5%-им розчином біомию при температурі 55-65°C, після чого ополіскуються декілька разів очищеною водою. Апарати слід мити після кожної проведеної операції для уникнення накопичення забруднень, що може вплинути на якість продукції.

З'ємні вузли та внутрішні поверхні апаратів, що контактують з поживним середовищем, посівним матеріалом та культуральною рідиною миють 0,5%-им розчином біомию при температурі 55-65°C, після чого ополіскуються декілька разів очищеною водою.

Установки пом'якшення питної води очищають від розчину солей за допомогою іонообмінної смоли. Відокремлені забруднення видаляються в каналізацію, разом з розчином хлориду натрію, який використовується для відновлення смоли. Регенерація іонообмінної смоли відбувається за наступним механізмом: смолу після пом'якшення води промивають питною водою, після чого додають 10%-ий хлорид натрію при температурі 40°C, що вимиває з Na-катіоніту зайві іони. Забруднений розчин зливають у каналізацію [114, 115].

Відновлення активованого вугілля для очищення води проводиться випалювання адсорбованих сполук у печах при температурі 800-900°C. активоване вугілля має відповідати значенням рН=4,5-5,0 та вмістом сторонніх іонів та важких металів не більше за 0,003% [113].

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						79
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Для перевірки герметичності обладнання створюють надлишковий тиск в 0,5 МПа і впродовж 30 хвилин спостерігають показники тиску на манометрі. Якщо показники залишаються сталими, то апарати пройшли випробування на герметичність. Вентилі перевіряють під гідравлічним тиском в 0,3 МПа [116]. На даному етапі проводиться технологічний контроль, що полягає у вимірюванні тиску за допомогою манометра.

Стерилізацію проводять гострою парою з показниками тиску 0,12-0,15 МПа, температури 125-145°C протягом 4 годин для закритого обладнання. Порожні апарати та комунікації стерилізуються при температурі 120-126°C протягом 1 години (без врахування часу на видалення повітря та прогріву обладнання) при тиску 0,3 МПа. Ліофільну сушарку стерилізують перед кожним завантаженням біомаси [114, 115].

Стерилізацію повітряних фільтрів проводять гострою парою з тиском 0,4 МПа протягом 2 годин при температурі 110°C. фільтри індивідуальної очистки стерилізують хімічним способом, оскільки він не витримує високі значення температури. Для цього всередині стерильної ділянки встановлюють вентиль, а фільтр стерилізують за допомогою оксиду етилену та формаліну [114, 115].

На даній стадії проводиться контроль технологічний та мікробіологічний, що забезпечується використанням термометра та пробовідбору для виявлення контамінації.

ДР 1.5. Підготовка лабораторного посуду

Перед використанням лабораторного посуду на підприємствах необхідного його вимити, продуту та стерилізувати. Миття проводять у автоматичних мийках, куди завантажуються посуд разом з миючими засобами від ДР 1.2. Для цього вода подається під тиском 0,2 МПа з температурою 50°C. Процес триває 15 хв.

Вимитий лабораторний посуд продувається стерильним повітрям від ДР 2.6 протягом 5 хв, а відпрацьоване повітря направляється до стадії ПВ.

Стерилізацію проводять у автоклавах, куди подається насичена водяна пара з

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		80

тиском 0,2 МПа за температури 132°C 20 хв. Готовий посуд відправляється на використання у потребах виробництва, а конденсат збирається та направляється на стадію ПВ.

ДР 2. Підготовка повітря

Метою стадії є напрацювання чистого вентиляційного повітря та стерильного аераційного повітря шляхом видалення механічних та мікробіологічних забруднень фільтрацією.

ДР 2.1. Забір повітря

Забір повітря проводиться повітрозбірником за допомогою трубчастих конструкцій з атмосфери на висоті вище 10 м, при температурі 15-25°C і вологості повітря 60-90%. При цьому повітря проходить крізь встановлені решітки повітрозбірника, тим самим звільняючись від крупних механічних часток [113, 114].

На даному етапі проводять технологічний контроль температури та вологості. Для перевірки відповідності значень температури використовують термометр.

ДР 2.2. Механічна очистка повітря

Повітря направляється на фільтри попередньої очистки при температурі 20-30°C вологості 60-90%, Е=80%. Фільтри попередньої очистки складаються з 12 гофрованих, оброблених маслом сіток конструкції Рекка, отвори яких зменшуються у напрямку руху повітря. Відбувається видалення частинок розміром більше 5 мкм [113]. Частина повітря направляється до ДР 2.8.

Проводиться технологічний контроль температури за допомогою термометра.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						81
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 2.3. Стиснення та нагнітання повітря

Після фільтру повітря подають на турбокомпресор, який забезпечує стиснення повітря до тиску $P=0,35$ МПа і нагрівання до температури 200°C [113].

Проводиться технологічний контроль тиску за допомогою манометра, а також контроль температури за допомогою термометра.

ДР 2.4. Охолодження повітря

Розігріте стиснене повітря проходить крізь теплообмінник, де воно охолоджується до 30°C . Процес супроводжується конденсацією вологи, яку вловлює ресивером-вологовідділювачем $W=60-70\%$. Вологу доцільно прибирати з повітря задля коректної експлуатації фільтрів грубої та тонкої очистки, у яких використовується тканина Петрянова. Теплообмін відбувається при робочому тиску в 0-16 бар і температурі $0-180^{\circ}\text{C}$. Після відділення вологи температура повітря падає, тому перед подачею на фільтри його підігрівають за допомогою термопари [114, 115].

Проводиться технологічний контроль температури за допомогою термометра, контроль рівня вологості.

ДР 2.5. Очищення повітря на головному фільтрі

На фільтрах грубої очистки відбувається вловлювання основної маси забруднень та контамінантів. Зазвичай такі фільтри доволі об'ємні (5 м^3), з ефективністю $E=85-95\%$, представлені конструкцією, що містить шар скловати, активованого вугілля та вати, встановлені на решітку. Після очистки необхідно продувати для видалення вологи [114, 115].

Проводиться пробовідбір повітря та посів на тверде поживне середовище для виявлення мікроорганізмів та їхньої кількості.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						82
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 2.6. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Від головних фільтрів їх відрізняють менші розміри та більш ефективні і дорогі фільтруючі матеріали, що дозволяють встановити значення $E=99,99\%$, температура повітря на виході $20-30^{\circ}\text{C}$. Тканина Петрянова, яка використовується на цих фільтрах представлена надтонкими (1,5 і 2,5 мкм) переплетеними волокнами з перхлорвінілу, ацетатцелюлози, полістиролу та поліфторстиролу, які утворюють пори 0,22 мкм. Коефіцієнт проскоку складає не більше ніж 0,001%. Проводиться пробовідбір повітря та посів на тверде поживне середовище для виявлення мікроорганізмів та їх кількості [114, 115].

Контроль технологічний та мікробіологічний.

ДР 2.7. Підготовка стисненого повітря для вакуумної фільтрації

Очищене повітря зі стадії ДР 2.2. подається на турбокомпресор, де відбувається його стиснення до значень 0,4-1 МПа.

ДР 2.8. Підготовка сушильного агенту

Очищене повітря зі стадії ДР 2.2. нагнітається відцентровим вентилятором до тиску 1-2 кПа, після чого підігрівається на електрокалорифері до значення температури 70°C та подається на стадію сушіння цитрату кальцію ТП 10.

ДР 3. Підготовка води очищеної

Метою даної операції є підготовка очищеної води, що відбувається на основі води питної, з метою отримання речовини для промивання обладнання, приготування мийних та робочих розчинів, поживного середовища, тощо.

ДР 3.1. Підігрівання води питної

Питна вода завантажується у теплообмінник, де нагрівається до 20°C – оптимальної температури для підтримання пропускних властивостей мембрани. Проводиться технологічний контроль температури за допомогою термометра.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						83
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 3.2. Грубе очищення води

Після підігріву вода передається на етап фільтрування за допомогою насосу постійного тиску, що забезпечується фільтром з діаметром пор 100 мкм, де вода звільняється від крупних механічних забруднень. Тиск води при цьому має становити 6 бар або 0,6 МПа.

Проводиться технологічний контроль температури за допомогою термометра (20°C) та контроль тиску за допомогою манометра.

ДР 3.3. Пом'якшення води

Пом'якшення води відбувається за рахунок видалення іонів, що спричиняють твердість води, а саме катіонів кальцію та магнію. Для цього вода направляють на фільтр-пом'якшувач двокорпусний іонообмінний модуль, де пом'якшується за рахунок кислотного катіоніту. При фільтрування спостерігається зменшення органічних речовин на 60-70%. При двоступінчастому пом'якшенні жорсткість води становить до 0,01 мг-екв/л, що вимірюється TDS-методом (випаровування та зважування).

Проводиться технологічний контроль температури за допомогою термометра (20°C) та контроль хімічний – пробовідбір для визначення наявності катіонів магнію та кальцію.

ДР 3.4. Адсорбція органічних речовин

Після пом'якшення вода подається на фільтр тонкої очистки з діаметром пор 5 мкм, де застосовують стандартні патронні фільтри з активованим вугіллям.

На даному етапі контролюється значення тиску, що має відповідати позначці 0,6 МПа на манометрі, та температури (20°C) на термометрі.

ДР 3.5. Очищення води зворотнім осмосом

Після фільтрування на активованому вугіллі, вода за допомогою насосу постійного тиску та продуктивності подається на зворотньоосмотичний модуль,

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						84
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

що характеризується ефективністю затримування 99,6%. Обладнання характеризується системою мембран з розміром пор 0,0005-0,001 мкм при тиску, що більший ніж осмотичний.

Контроль якості забезпечується вимірюванням питомої електропровідності на виході, що має складати 4,5 мкСм/см при температурі 20°C. Відокремлений осад направляється у каналізацію. На даному етапі також встановлюється манометр для контролю перепаду тисків води. Проводять пробовідбір для виявлення мікроорганізмів.

ДР 3.6. Завантаження води очищеною у збірник

Вода зберігається при температурі 20°C, збірник оснащується датчиком контролю рівня води, температури та тиску.

Контролюється вміст аеробних живих мікроорганізмів за допомогою пробовідбору та посіву, кількість яких не має перевищувати 100 КУО/см³. На виході встановлюють циркуляційний насос.

ДР 4 Підготовка поживних середовищ

Метою стадії є приготування поживних середовищ, стерилізація поживних середовищ, заповнення чашок Петрі поживним середовищем.

ДР 4.1 Приготування поживних середовищ

ДР 4.1.1 Приготування поживного середовища для відновлення музейної культури

У реактор вносять: 20 г/дм³ пептону, 10 г/дм³ дріжджового екстракту, 20 г/дм³ глюкози, доводять до рівня дистильованою водою температурою 25°C, перемішують до розчинення компонентів.

Встановлюють датчик рН (6,3-6,7) та датчик температури [117].

ДР 4.1.2 Приготування поживного середовища для посівного матеріалу

У реактор з механічним перемішуючим пристроєм для вирощування

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						85
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

посівного матеріалу вносять компоненти: 80 г/дм³ меляси, 0,14 г/дм³ K₃[Fe(CN)₆], 1,6 г/дм³ (NH₄)₂C₂O₄, 0,25 г/дм³ MgSO₄·7H₂O, 0,14 г/дм³ KH₂PO₄, 0,25 г/дм³ ZnSO₄·7H₂O та доводять питною водою до мітки з температурою 25°C, перемішують пропелерною мішалкою частотою обертів 300 об/хв [118].

Встановлюють датчик рН (4,5-5,5) та датчик температури.

ДР 4.1.3 Приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу

У ферментер з механічним перемішуючим пристроєм вносять: 80 г/дм³ меляси, 0,14 г/дм³ K₃[Fe(CN)₆], 0,8 г/дм³ (NH₄)₂C₂O₄, 0,14 г/дм³ KH₂PO₄, 0,25 г/дм³ ZnSO₄·7H₂O та доводять питною водою до мітки з температурою 25°C, перемішують пропелерною мішалкою частотою обертів 300 об/хв [118].

Встановлюють датчик рН (4,5-5,5) та датчик температури.

ДР 4.2 Стерилізація поживних середовищ

ДР 4.2.1 Стерилізація поживних середовищ для відновлення музейної культури

Стерилізацію проводять у автоклавах при температурі 121°C при обробці насиченою водяною парою під тиском 0,2 МПа протягом 15 хв. Конденсат направляють до збірника нейтралізації [117].

Встановлюють датчик температури.

ДР 4.2.2 Стерилізація поживного середовища для посівного матеріалу

Стерилізацію проводять у реакторі для вирощування посівного матеріалу протягом 120 хв за температури 126-130°C. У сорочку реактора подається насичена пара під тиском 0,2. Конденсат направляють до збірника нейтралізації.

Встановлюють датчик температури та тиску.

ДР 4.2.3 Стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

Стерилізацію проводять на установці безперервної стерилізації УБС-5, що складається зі збірника, теплообмінників, витримувача, насосів, фільтрів, а також системи та автоматичного регулювання процесу стерилізації. Стерилізація

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		86

проводиться завдяки швидкому нагріванні середовища до температури 120-140°C через контакт з насиченою водяною парою, після чого розчин меляси витримують 2-15 хв і швидко охолоджують до 35-45°C. Конденсат направляють до збірника нейтралізації [119]. Встановлюють датчик температури.

ДР 4.3 Заповнення чашок Петрі поживним середовищем

Стерильні чашки Петрі від ДР 1.5 заповнюють стерильним поживним середовищем для відновлення музейної культури від ДР 4.2.1. до висоти 4-5 мм та залишають застигати при кімнатній температурі 20°C.

ТП 5 Підготовка посівного матеріалу

Метою стадії є активація музейної культури продуцента та напрацюванні посівного матеріалу перед перенесення у виробничий ферментер.

ТП 5.1 Відновлення музейної культури

ТП 5.1.1. Ресуспендування музейної культури

Культуру гриба *A. niger*, представлену висушеними спорами, розводять у фізіологічному розчині (0,9%-ий розчин натрію хлориду) до концентрації 10^8 КУО/см³, перевіряючи концентрацію методом каламутності.

ТП 5.1.2 Вирощування на чашках Петрі

Ресуспендовану культуру в асептичних умовах висівають на чашки Петрі зі стерилізованим поживним середовищем. Інкують у термостаті при температурі 27,5-28,5°C протягом 48 годин.

Встановлюють датчик температури. Проводять пробовідбір для ідентифікації та визначення чистоти культури. Колонії *A. niger*, які пройшли морфологічну ідентифікацію, передають на стадію ТП 5.1.3.

ТП 5.1.3 Вирощування в колбах

Культуру пересівають з чашок Петрі в асептичних умовах у колби Ерленмейєра на 100 см³ в кількості $2 \cdot 10^8$ КУО/см³, перевіряючи концентрацію

					<i>ДП БТ-9122.00 ПЗ</i>	Арк.
						87
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

клітин методом каламутності,. Інкубують при температурі 27,5-28,5°C протягом 24 годин на шейкері з частотою обертання 140 об/хв.

Встановлюють датчик температури. Проводять пробовідбір для ідентифікації та визначення чистоти культури. У випадку відсутності контамінації, вміст колб з *A. niger*, які пройшли морфологічну ідентифікацію, передають на стадію ТП 5.2.

ТП 5.2 Вирощування культури в апараті для посівного матеріалу

Посівний матеріал із колб асептично переливають в інокулятор із теплообмінною сорочкою, барботером та механічним перемішуючим пристроєм, коефіцієнт заповнення якого складає 0,6, із концентрацією біомаси 1 г/дм³ поживного середовища при температурі 30±1°C, для чого подають теплоагент у теплообмінну сорочку. Культивування проводять 24 годин з частотою обертання пропелерної мішалки 180 об/хв, надлишковим тиском 0,02-0,03 МПа. Проводять аерацію біомаси стерильним повітрям з температурою 30°C у кількості 0,6 м³/м³·хв, проводять внесення піногасника (до 400 мл). рН=5 підтримують додаванням 0,1н розчину гідроксиду натрію, який додається за потреби при пробовідборі [58].

Встановлюють датчик температури, рН, тиску. Проводять пробовідбір для визначення відсутності контамінації у культуральній рідині.

ТП 6 Виробничий біосинтез

ТП 6.1 Виробниче культивування

Посівний матеріал із інокулятора у ферментер із теплообмінною сорочкою, з об'ємом 5 м³, коефіцієнт заповнення якого складає 0,65, із концентрацією біомаси 1,6 г/м³ поживного середовища при температурі 30±1°C, для чого подають теплоагент у теплообмінну сорочку. Культивування проводять 5-10 діб, з частотою обертання пропелерної мішалки 180 об/хв, з надлишковим

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		88

тиском 0,02-0,03 МПа. Проводять аерацію біомаси стерильним повітрям з температурою 30°C у кількості 0,6-0,7 м³/м³·хв, проводять внесення піногасника. рН<2 підтримують додаванням 0,1н розчину гідроксиду натрію, який додається за потреби при пробовідборі. Визначають значення економічного показника (0,063 г/г культуральної рідини за годину), швидкість накопичення цільового продукту (1,34 г/дм³ культуральної рідини за годину). Кінцева концентрація лимонної кислоти в культуральній рідині повинна становити не менше 17,6%. Культуральну рідину відправляють на стадію фільтрування [58].

Встановлюють датчик температури, рН, тиску. Проводять пробовідбір для визначення відсутності контамінації у культуральній рідині.

ТП 6.2 Перенесення вмісту ферментера в збірник

Вміст ферментера, разом з біологічним агентом та культуральною рідиною, асептично подається в збірник через трубопровід, прокладений з днища ферментеру, звідки потім направлятиметься на стадію фільтрування. Процес проводиться за кімнатної температури 20°C.

ТП 7 Виділення культуральної рідини

ТП 7.1. Фільтрування культуральної рідини

Створення розрідження у вакуум-фільтрі – у завантаженому вакуум-фільтрі, на який подається культуральна рідина від ТП 6 та мийні і дезінфікуючі розчини на випадок непередбачуваних обставин і зупинки роботи підприємства, створюється розрідження за рахунок вакуум-насосу. Таким чином відбувається відсмоктування культуральної рідини. Під дією вакууму воно проходить крізь фільтрувальну тканину, сітку й перфорацію барабана всередину камери й через трубу виводиться з апарата у збірник. На зовнішній поверхні барабана, покритою фільтрувальною тканиною, утворюється осад з біомаси грибів.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						89
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Для створення розрідження: культуральна рідина від ТП 6 подається у посудину вакуум-фільтра. На даному етапі проводиться контроль тиску ($P=120$ Па) та контроль температури ($t=30^{\circ}\text{C}$) за допомогою контрольних приладів.

ТП 7.2. Підрив осаду

Стадія здійснюється за рахунок подачі стисненого повітря ($P=0,4-1$ МПа), що розпушує сформований на зовнішній поверхні барабану осад для полегшення його зняття. Внаслідок процесу утворюється відпрацьоване повітря, що направляється на очистку. На даному етапі проводиться контроль тиску ($P=0,4-1$ МПа) за допомогою контрольного приладу.

Для підриву осаду: культуральна рідина від ТП 6 подається у посудину вакуум-фільтра, стиснене повітря зі стадії ДР 2.7.

Контроль технологічний (тиск).

ТП 7.3. Знімання ножем біомаси клітин

Розпушений осад знімається ножем, який щільно приставлений до зовнішньої поверхні барабану вакуум-фільтра. При підході камери із просушеним осадом до ножа подача стисненого повітря припиняється. Осад падає з поверхні тканини під дією сили тяжіння. Ніж служить в основному напрямною площиною для шару осаду, що відокремлюється від тканини. Біомасу гриба відправляють на стадію знешкодження відходів ЗВ. Процес проводять за кімнатної температури 20°C .

Для даної стадії: біомаса видаляється на утилізацію, а фільтрат передається на стадію гасіння вапняним молоком. Рідкі відходи направляються на стадію знешкодження та переробки відходів.

Контроль технологічний температури (датчик температури).

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						90
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ТП 7.4. Промивка фільтрувальної тканини

Стадія здійснюється за рахунок подачі промивної води з температурою 20°C з метою видалення механічних та біологічних забруднень, внаслідок чого утворюються рідкі відходи, що направляються на стадію ЗВ. Для даної стадії: фільтри направляються на стадію ТП7.1, а рідкі відходи – на стадію ЗВ та ПВ.

ТП 8 Гасіння фільтрату вапняним молоком

На цій стадії фільтрат з ТП 7.1 передається у реактор з механічним перемішуючим пристроєм та теплообмінною сорочкою. Культуральний фільтрат підігрівають до 100°C і подають вапняне молоко з густиною 1,17 г/см³ до рН 6,8-7,0, після чого суспензію витримують 45 хвилин.

ТП 9 Фільтрація цитрату кальцію

Суспензія цитрату кальцію зі стадії ТП 8 переноситься на нутч-фільтр, де при температурі 30°C відбувається виділення кристалів цитрату кальцію. Осад промивається водою при температурі 50-60°C і обережно переноситься у сушильну шафу, а фугат – на стадію ТП 8 для уникнення втрат лимонної кислоти.

Встановлюють датчик температури та рН.

ТП 10 Сушіння цитрату кальцію

Цитрат кальцію у вигляді кристалів подається на сушіння до барабанної сушарки за температури 35°C з частотою обертів барабану 4-7 об/хв. Сушіння проходить за використанням сушильного агенту зі стадії ДР 2.8, при чому температура повітря складає 70°C. Відпрацьоване повітря відправляються на стадію ПВ. Кінцева вологість кристалів цитрату кальцію складає не більше 2,5%. Проводять пробовідбір для аналізу цитрату кальцію на відповідність встановленим фізико-хімічним показникам.

Встановлюють датчик температури.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						91
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ПМВ 11 Фасування кристалічного цитрату кальцію

Висушений цитрат кальцію подається на фасувальну машину, де пакується у багатошарові крафт-мішки з поліетиленовим вкладишем по 25 кг. Мішки відвантажуються на склад, де зберігаються за низьких температур та низької вологості без потрапляння прямий сонячних променів.

ЗВ 12 Знешкодження відходів та викидів

ЗВ 12.1 Знешкодження твердих відходів

Біомасу обробляють гострою насиченою парою під тиском 0,2 МПа протягом 45 хв. Процес проходить у місткісних апаратах при 85-90°C та обертанні мішалки 100 об/хв. Кислотність суспензії корегують розчинами соляної кислоти та їдкого натру, після досягнення рівня рН 7 зливають у каналізацію [120]. Відпрацьований технологічний одяг (халати, рукавички, маски, чепчики), бракований лабораторний посуд знезаражують у розчині хлоргексидину біглюконату і відправляють на стадію ДР 1.5 [121].

ЗВ 12.2 Знешкодження рідких відходів

На даній стадії проводиться очищення стічних вод та рідких відходів до значення рН 7 та видалення (у разі потреби) агресивних компонентів. Очищені стічні води подаються у каналізацію.

ПВ 13 Переробка відходів та викидів

ПВ 13.1 Переробка рідких відходів

Вторинна пара та відпрацьована насичена водяна пара конденсується у барометричних конденсаторах, куди подається вода питна температурою 20°C для охолодження пари. Конденсат стікає по барометричній трубі до барометричного ящика, звідки направляється до ДР 3[122].

					<i>ДП БТ-9122.00 ПЗ</i>	Арк.
						92
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ПВ 13.2 Переробка газових відходів

Відпрацьоване повітря очищається у патронних фільтрах. Відбувається затримка часток розміром більше 0,6 мкм. Допустимий перепад тиску становить 450-650 Па. Ефективність очистки становить 99,995%. Очищене повітря відводять в атмосферу.

ПВ 13.2 Очищення фільтрів

Фільтри очищують відповідно до встановленого на підприємстві регламенту (УФ-випромінюванням, гострою парою, розчинами дезінфекційних засобів)

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						93
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

4.4 Матеріальний баланс

Матеріальний баланс виробництва з розрахунку на 1 серію товару, наведений у таблиці 4.2. Одна серія включає 28 мішків по 25 кг цитрату кальцію. Виробничий біосинтез проводиться у ферментері обсягом 5 м³.

Таблиця 4.2. Матеріальний баланс виробничої серії

Використано					Отримано				
Стадія	Назва сировини, матеріалів та напів-продуктів	Кількість			Стадія	Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
		кг	шт	л			кг	шт	л
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Стадії допоміжних робіт, об'єм мийних та дезінфікуючих розчинів – 5 л									
ДР 1.2.4.	Біомий (порошок)	0,025				Біомий (0,5%)			4,95
	Вода очищена			4,975		Втрати (1%)			0,05
	Всього	5				Всього	5		
ДР 1.2.1.	Кальцинована сода (порошок)	0,1				Кальцинова на соди (2%)			4,95
	Вода очищена			4,9		Втрати (1%)			0,05
	Всього	5				Всього	5		

Продовження таблиці 4.2.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ДР 1.2.2.	Дезактин (порошок)	0,125				Дезактин (2,5%)			4,95
	Вода очищена			4,875		Втрати (1%)			0,05
	Всього	5				Всього	5		
ДР 1.2.3.	Перекис водню (37%)			0,715		Перекис водню (6%)			5
	Вода очищена			4,285		Втрати (1%)			0,05
	Всього	5				Всього	5		
ДР 1.2.5.	Хлоргекси дин біглюкона т (20%)			0,12		Хлоргексид ин біглюконат (0,5%)			4,95
	Етиловий спирт (70%)			4,88		Втрати (1%)			0,05
	Всього	5				Всього	5		
ДР 1.2.6.	Хлорид натрію (порошок)	0,05				Хлорид натрію (10%)			4,95
	Вода очищена			4,95		Втрати (1%)			0,05
	Всього	5				Всього	5		

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

95

Продовження таблиці 4.2.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ДР 1.2.7.	Етиловий спирт (96%)			3,375		Етиловий спирт (70%)			4,95
	Вода очищена			1,625		Втрати (1%)			0,05
	Всього	5				Всього	5		
Стадія	Назва	г	шт	мл	Стадія	Назва	г	шт	мл
Стадії приготування поживних середовищ									
ДР 4.1.1.	Вода питна			980		Готове тверде ПС (на 60-90 чашок Петрі)			990
	Пептон	20				Втрати (1%)			10
	Дріжджовий екстракт	10							
	Глюкоза	20							
	Чашки Петрі		60 (90)						
	Всього	1000				Всього	1000		

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

96

Продовження таблиці 4.2.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ДР 4.1.2.	Меляса	1600				ПС для інокулятора			19000
	$(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$	32							
	KH_2PO_4	2,8							
	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	2,8				Втрати (5%)			1000
	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	5							
	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	5							
	Вода очищена			19550					
	Всього	20000				Всього	20000		
ДР 4.4.	Меляса	260				ПС для інокулятора			3245
	$(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$	2,6							
	KH_2PO_4	0,5							
	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	0,5				Втрати (0,0015%)			5
	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,813							
	Вода очищена			3047					
	Всього	3250				Всього	3250		

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

97

Продовження таблиці 4.2.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Стадії напрацювання посівного матеріалу									
ДР 5.1.1.	<i>Aspergillus niger</i> (музейна культура)		6^{10} КУО	$(10^8$ КУО / см^3)		Колонії <i>Aspergillus niger</i>		-	
	Готове тверде ПС (60 чашок Петрі)		60			Відходи ПС			0,99
	Всього	60 чашок Петрі				Всього	Колонії культури + 60 чашок Петрі з відходами		
ДР 5.1.2.	Колонії <i>Aspergillus niger</i>		$2 \cdot 10^8$ КУО/ см^3			Культура <i>Aspergillus niger</i> в колбах		10	
	Готове рідке ПС (10 колб)		10						
	Всього	10 колб				Всього	10 колб		

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

98

Продовження таблиці 4.2.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Стадія	Назва	Кількість			Стадія	Назва	Кількість		
		кг	шт	л			кг	шт	л
ДР 5.2	ПС для інокулятора (об'єм 0,03 м ³)			19		Біомаса <i>Aspergillus niger</i>			22
	Культура <i>Aspergillus niger</i> в колбах		10			Відходи: колби для миття		10	
	Піно-гасник			0,4		Відпрацьоване повітря			20 232
	Стерильне аераційне повітря			30 240		Втрати			5
	Всього	30 260				Всього	30 260		
ТП 6	Біомаса <i>Aspergillus niger</i> з КР			25		Біомаса <i>Aspergillus niger</i> з КР			3270
	ПС для ферментера			3245		Відпрацьоване повітря			14·10 ⁷
	Аераційне повітря			14·10 ⁷		Втрати			8
	Піногасник			4					
	Всього	3270				Всього	3270		

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

99

Продовження таблиці 4.2.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Стадії основного технологічного процесу									
ТП 7	Біомаса <i>Aspergillus niger</i> з КР			3270		Біомаса <i>Aspergillus niger</i>	52 2		
	Боросиліка тне скло		1			КР			2743
						Відпрацьов ане боросилікат не скло		1	
						Втрати			5
	Всього	3270				Всього	3270		
ТП 8 ТП 9	Культурал ьна рідина			2743		Цитрат кальцію	80 1		
	Вапняне молоко (1,17 г/см ³)	500		(427)		Фугат			2360
	Промивна вода			3000		Відпрацьов ана вода			2950
						Втрати	9		50
	Всього	6170				Всього	6170		

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

100

Кінець таблиці 4.2.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ТП 10	Осад цитрату кальцію	801				Висушений осад	70 5		
						Випарена волога	96		
	Всього	801				Всього	801		
ПМВ 11	Висушени й цитрат кальцію	705				Мішки з цитратом кальцію		28	
	Мішки по 25 кг		28			Втрати	5		
	Всього	705				Всього	705		

4.5 Контроль виробництва

Перелік контрольних точок, що забезпечують виконання технологічного режиму, наведено у таблиці 4.3.

Таблиця 4.3 – Точки і параметри контролю виробництва

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що контролюється	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 1 Підготовка персоналу Кт 1.1	Медичні книжки. Запис про проходження огляду.		Раз на півріччя	
ДР 1 Підготовка персоналу Кт 1.2	Персонал. Наявність знань після навчання. Робочий одяг		Кожну операцію	
ДР 1.2.1. Приготування розчину кальцинованої соди Кт 1.2.1.1	Розчин кальцинованої соди. Температура	Візуальний, фізичний, термометр	Кожну операцію	55°C

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 1.2.1. Приготування розчину кальцинованої соди Кх 1.2.1.2	Розчин кальцинованої соди. Концентрація	Візуальний, аналітичний	Кожну операцію	2%
ДР 1.2.1. Приготування розчину кальцинованої соди Кх 1.2.1.3	Розчин кальцинованої соди. Частота обертів мішалки	Візуальний, фізичний, тахометр	Кожну операцію	30-40 об/хв
ДР 1.2.2. Приготування розчину дезактину Кт 1.2.2.1	Розчин дезактину. Температура	Візуальний, фізичний, термометр	Кожну операцію	55-65°C
ДР 1.2.2. Приготування розчину дезактину Кх 1.2.2.2.	Розчин дезактину. Концентрація	Візуальний, аналітичний	Кожну операцію	0,5-2,5%
ДР 1.2.2. Приготування розчину дезактину Кх 1.2.2.3.	Розчин дезактину. Частота обертів мішалки	Візуальний, фізичний, тахометр	Кожну операцію	30-40 об/хв

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

103

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 1.2.3. Приготування розчину перекису водню 6% Кх 1.2.3.1	Розчин перекису водню 6%. Концентрація	Візуальний, аналітичний	Кожну операцію	6%
ДР 1.2.3. Приготування розчину перекису водню 6% Кх 1.2.3.2	Розчин перекису водню 6%. Температура	Візуальний, фізичний, термометр	Кожну операцію	20°C
ДР 1.2.3. Приготування розчину перекису водню 6% Кх 1.2.3.3	Розчин перекису водню 6%. Частота обертів мішалки	Візуальний, фізичний, тахометр	Кожну операцію	30-40 об/хв
ДР 1.2.4. Приготування розчину біомію Кт 1.2.4.1	Розчин біомію. Температура	Візуальний, фізичний, термометр	Кожну операцію	35-45°C
ДР 1.2.4. Приготування розчину біомію Кх 1.2.4.2	Розчин біомію. Концентрація	Візуальний, аналітичний	Кожну операцію	0,5%

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 1.2.4. Приготування розчину біомію Кх 1.2.4.3	Розчин біомію. Частота обертів мішалки	Візуальний, фізичний, тахометр	Кожну операцію	30-40 об/хв
ДР 1.2.5. Приготування розчину хлоргексидину біглюконату Кх 1.2.5.1	Розчин хлоргексидину біглюконату. Концентрація	Візуальний, аналітичний	Кожну операцію	0,5%
ДР 1.2.5. Приготування розчину хлоргексидину біглюконату Кх 1.2.5.2	Розчин хлоргексидину біглюконату. Температура	Візуальний, фізичний, термометр	Кожну операцію	25-30°C
ДР 1.2.5. Приготування розчину хлоргексидину біглюконату Кх 1.2.5.3	Розчин хлоргексидину біглюконату. Частота обертів мішалки	Візуальний, фізичний, тахометр	Кожну операцію	30-40 об/хв

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 1.2.6. Приготування розчину хлориду натрію Кт 1.2.6.1	Розчин хлориду натрію. Температура	Візуальний, фізичний, термометр	Кожну операцію	40°C
ДР 1.2.6. Приготування розчину хлориду натрію Кт 1.2.6.1	Розчин хлориду натрію. Частота обертів мішалки	Візуальний, фізичний, тахометр	Кожну операцію	30-40 об/хв
ДР 1.2.6. Приготування розчину хлориду натрію Кт 1.2.6.1	Розчин хлориду натрію. Концентрація	Візуальний, аналітичний	Кожну операцію	10%
ДР 1.2.7. Приготування розчину 70%- ого етилового спирту Кх 1.2.7.1	Розчин 70%- ого етилового спирту. Концентрація	Візуальний, аналітичний	Кожну операцію	70%

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 1.2.7. Приготування розчину 70%- ого етилового спирту Кх 1.2.7.2	Розчин 70%- ого етилового спирту. Температура	Візуальний, фізичний, термометр	Кожну операцію	20°C
ДР 1.2.7. Приготування розчину 70%- ого етилового спирту Кх 1.2.7.3	Розчин 70%- ого етилового спирту. Частота обертів мішалки	Візуальний, фізичний, тахометр	Кожну операцію	30-40 об/хв
ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень Кмб 1.3	Щоденне прибирання	Візуальний, змив з поверхонь, висів на чашки Петрі	Один раз на два дні	Відсутність забруднень та контамінації.
ДР 1.4. Підготовка виробничого обладнання Кмб 1.4	Виробниче обладнання	Візуальний, змив з поверхонь, висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Вміст мікрофлори відповідно до класу чистоти

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

107

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 1.5. Підготовка лабораторного посуду Кт 1.5.1	Водний розчин миючих засобів. Температура	Візуальний, фізичний, термометр	Кожну операцію	50°C
ДР 1.5. Підготовка лабораторного посуду Кт 1.5.2	Водний розчин миючих засобів. Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
ДР 1.5. Підготовка лабораторного посуду Кт 1.5.3	Тривалість процесу миття посуду	Фізичний, секундомір	Кожну операцію	15 хв
ДР 1.5. Підготовка лабораторного посуду Кт 1.5.4	Тривалість процесу висушування	Фізичний, секундомір	Кожну операцію	5 хв
ДР 1.5. Підготовка лабораторного посуду Кт 1.5.5	Стерилізація посуду. Температура	Візуальний, фізичний, термометр	Кожну операцію	132°C

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

108

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 1.5. Підготовка лабораторного посуду Кт 1.5.6	Водяна пара для стерилізації. Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
ДР 1.5. Підготовка лабораторного посуду Кт 1.5.7	Тривалість процесу стерилізації	Фізичний, секундомір	Кожну операцію	20 хв
ДР 2.1 Забір повітря з атмосфери Кт 2.1.1	Атмосферне повітря. Температура	Візуальний, фізичний, термометр	Кожну операцію	15-25°C
ДР 2.1 Забір повітря з атмосфери Кх 2.1.2	Атмосферне повітря. Вологість	Візуальний, психрометричний психрометр	Кожну операцію	60-90%
ДР 2.2. Механічна очистка повітря Кт 2.2.1	Очищене повітря. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	20-30°C

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 2.2. Механічна очистка повітря Кт 2.2.2	Очищене повітря. Вологість	Фізичний, психрометричний психрометр	Кожну операцію	60-90%
ДР 2.2. Механічна очистка повітря Кт 2.2.3	Очищене повітря. Розмір часток	Фізичний, аспіраційний, датчик запиленості	Двічі на місяць	5 мкм
ДР 2.2. Механічна очистка повітря Кт 2.2.4	Очищене повітря. Ефективність очистки	Фізичний, аспіраційний, датчик запиленості	Двічі на місяць	80%
ДР 2.3 Стиснення і нагнітання повітря Кт 2.3.1	Очищене повітря. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	200°C
ДР 2.3 Стиснення і нагнітання повітря Кт 2.3.2	Очищене повітря. Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	0,35 МПа

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

110

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 2.4. Охолодження повітря Кт 2.4.1	Очищене повітря. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	30°C
ДР 2.4. Охолодження повітря Кт 2.4.2	Очищене повітря. Вологість	Фізичний, психрометрични й психрометр	Кожну операцію	60-70%
ДР 2.4. Охолодження повітря Кт 2.4.3	Очищене повітря. Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	0-16 бар
ДР 2.5. Очищення повітря на головному фільтрі Кт 2.5.1	Очищене повітря. Ефективність очистки	Фізичний, аспіраційний, датчик запиленості	Двічі на місяць	85-95%
ДР 2.6. Очищення повітря на індивідуальном у фільтрі Кт 2.6.1	Очищене повітря. Ефективність очистки	Фізичний, аспіраційний, датчик запиленості	Двічі на місяць	99,99%

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

111

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 2.6. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі Кт 2.6.2	Очищене повітря. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	20-30°C
ДР 2.6. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі Кт 2.6.3	Очищене повітря. Розмір часток	Фізичний, аспіраційний, датчик запиленості	Двічі на місяць	0,22 мкм
ДР 2.7. Підготовка стисненого повітря для вакуумної фільтрації Кт 2.7.1	Стиснене повітря. Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	0,4-1 МПа
ДР 2.8. Підготовка сушильного агенту Кт 2.8.1	Повітря. Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	1-2 кПа

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 2.8. Підготовка сушильного агенту Кт 2.8.2	Повітря. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	70°C
ДР 3.1. Підігрівання води питної Кт 3.1.1	Водопровідна вода. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	20°C
ДР 3.2. Грубе очищення води Кт 3.2.1	Водопровідна вода. Розмір часток	Фізичний, аспіраційний, датчик запиленості	Кожну операцію	100 мкм
ДР 3.2. Грубе очищення води Кт 3.2.2	Водопровідна вода. Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	6 бар
ДР 3.3. Пом'якшення води Кх 3.3.1	Очищена вода. Жорсткість	Фізичний, TDS-методом	Кожну операцію	0,01 мг- екв/л
ДР 3.3. Пом'якшення води Кт 3.3.2	Очищена вода. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	20°C

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

113

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 3.4. Адсорбція органічних речовин Кт 3.4.1	Пом'якшена вода. Розмір часток	Фізичний, аспіраційний, датчик запиленості	Двічі на місяць	5 мкм
ДР 3.4. Адсорбція органічних речовин Кт 3.4.2	Пом'якшена вода. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	20°C
ДР 3.4. Адсорбція органічних речовин Кт 3.4.3	Пом'якшена вода. Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	6 бар
ДР 3.5. Очищення води зворотнім осмосом Кх 3.5.1	Очищена вода. Питома електропровідність	Фізичний, кондуктометр	Кожну операцію	4,5 мкСм/см

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

114

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 3.5. Очищення води зворотнім осмосом Кх 3.5.2	Очищена вода. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	20°C
ДР 3.6. Завантаження води очищеною у збірник Кт 3.6.1	Очищена вода. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	20°C
ДР 3.6. Завантаження води очищеною у збірник Кмб 3.6.2	Очищена вода. Наявність мікроорганізмів	Змив з поверхонь, висів на чашки Петрі	Кожну операцію	100 КУО/см ³
ДР 4.1.1 Приготування поживного середовища для відновлення музейної культури Кт 4.1.1.1	Поживне середовище. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	25°C

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 4.1.1 Приготування поживного середовища для відновлення музейної культури Кх 4.1.1.2	Поживне середовище. рН	Фізичний, рН- метр	Кожну операцію	6,3-6,7
ДР 4.1.2 Приготування поживного середовища для посівного матеріалу Кт 4.1.2.1	Поживне середовище. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	25°C
ДР 4.1.2 Приготування поживного середовища для посівного матеріалу Кх 4.1.2.2	Поживне середовище. рН	Фізичний, рН- метр	Кожну операцію	4,5-5,5

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

116

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 4.1.2 Приготування поживного середовища для посівного матеріалу Кт 4.1.2.3	Поживне середовище. Частота обертів мішалки	Візуальний, фізичний, тахометр	Кожну операцію	300 об/хв
ДР 4.1.3 Приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу Кт 4.1.3.1	Поживне середовище. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	25°C
ДР 4.1.3 Приготування поживного середовища для виробничого біосинтез Кх 4.1.3.2	Поживне середовище. рН	Фізичний, рН- метр	Кожну операцію	4,5-5,5

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

117

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 4.1.3 Приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу Кт 4.1.3.3	Поживне середовище. Частота обертів мішалки	Візуальний, фізичний, тахометр	Кожну операцію	300 об/хв
ДР 4.2.1 Стерилізація поживного середовища для відновлення музейної культури Кт 4.2.1.1	Поживне середовище. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	121°C
ДР 4.2.1 Стерилізація поживного середовища для відновлення музейної культури Кт 4.2.1.2	Поживне середовище. Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	0,2 МПа

Продовження таблиці 4.3.

ДР 4.2.1 Стерилізація поживного середовища для відновлення музейної культури Кт 4.2.1.3	Процес. Час стерилізації	Фізичний, секундомір	Кожну операцію	15 хв
ДР 4.2.2 Стерилізація поживного середовища для посівного матеріалу Кт 4.2.2.1	Поживне середовище. Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
ДР 4.2.2 Стерилізація поживного середовища для посівного матеріалу. Кт 4.2.2.2	Процес. Час стерилізації	Фізичний, секундомір	Кожну операцію	120 хв

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 4.2.2 Стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу Кт 4.2.2.3	Поживне середовище. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	126-130°C
ДР 4.2.3 Стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу Кт 4.2.3.1	Процес. Час стерилізації	Фізичний, секундомір	Кожну операцію	2-15 хв
ДР 4.2.3 Стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу Кт 4.2.3.2	Поживне середовище. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	120-140°C

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

120

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ДР 4.2.3 Стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу Кт 4.2.3.3	Охолоджене поживне середовище. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	35-45°C
ДР 4.3 Заповнення чашок Петрі поживним середовищем Кт 4.3.1	Кімнатна температура. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	20°C
ДР 4.3 Заповнення чашок Петрі поживним середовищем Кт 4.3.2	Поживне середовище. Висота заповнення	Візуально	Кожну операцію	4-5 мм
ТП 5.1.1. Ресуспендування музейної культури Кмб 5.1.1.1	Біологічний агент. Концентрація клітин	Візуально, метод каламутності	Кожну операція	10 ⁸ КУО/см ³

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

121

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ТП 5.1.2 Вирощування культури на чашках Петрі Кт 5.1.2.1	Температура в термостаті	Фізичний, термометр	Кожну операцію	30°C
ТП 5.1.2 Вирощування культури на чашках Петрі Кт 5.1.2.2	Процес. Час культивування	Фізичний, секундомір	Кожну операцію	48 год
ТП 5.1.3 Вирощування культури в колбах Кт 5.1.3.1	Температура в термостаті	Фізичний, термометр	Кожну операцію	30°C
ТП 5.1.3 Вирощування культури в колбах Кт 5.1.3.2	Процес. Час культивування	Фізичний, секундомір	Кожну операцію	24 год
ТП 5.1.3 Вирощування культури в колбах Кт 5.1.3.3	Процес. Інтенсивність перемішування	Візуальний, фізичний, тахометр	Кожну операцію	140 об/хв

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

122

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ТП 5.2 Вирощування культури в апараті для посівного матеріалу Кт 5.2.1	Культуральна рідина. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	30±1°C
ТП 5.2 Вирощування культури в апараті для посівного матеріалу Кт 5.2.2	Рівень заповнення реактора	Фізичний, рівнемір	Кожну операцію	0,6
ТП 5.2 Вирощування культури в апараті для посівного матеріалу Кт 5.2.3	Процес. Час культивування	Фізичний, секундомір	Кожну операцію	24 години

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

123

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ТП 5.2 Вирощування культури в апараті для посівного матеріалу Кмб 5.2.4	Процес культивуванн я. Концентрація біомаси	Фізичний, Візуальний, аналітичний	Кожну операцію	Відсутність контамінаці й
ТП 5.2 Вирощування культури в апараті для посівного матеріалу Кт 5.2.5	Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	0,02-0,03 МПа
ТП 5.2 Вирощування культури в апараті для посівного матеріалу Кт 5.2.6	Процес. Інтенсивність перемішуванн я	Візуальний, фізичний, тахометр	Кожну операцію	180 об/хв

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ТП 5.2 Вирощування культури в апараті для посівного матеріалу Кт 5.2.7	Інтенсивність аерації	Візуальний, фізичний, витратомір	Кожну операцію	0,6 м ³ /м ³ ·хв
ТП 6.1 Виробниче культивування Кт 6.1.1	Культуральна рідина. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	30±1°C
ТП 6.1 Виробниче культивування Кт 6.1.2	Рівень заповнення реактора	Фізичний, рівнемір	Кожну операцію	0,65
ТП 6.1 Виробниче культивування Кт 6.1.3	Процес. Час культивування	Фізичний, секундомір	Кожну операцію	5-10 діб
ТП 6.1 Виробниче культивування Кт 6.1.4	Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	0,02-0,03 МПа
ТП 6.1 Виробниче культивування Кт 6.1.5	Інтенсивність аерації	Візуальний, фізичний, витратомір	Кожну операцію	0,6-0,7 м ³ /м ³ ·хв
ТП 6.1 Виробниче культивування Кх 6.1.6	Лимонна кислота. Концентрація	Пробовідбір, аналітичний	Кожну операцію	17,6%

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

125

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ТП 6.1 Виробниче культивування Кх 6.1.7	Культуральна рідина. рН	Фізичний, рН- метр	Кожну операцію	2
ТП 6.2 Перенесення вмісту ферментера в збірник Кт 6.2.1	Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	20°C
ТП 7.1. Фільтрування культуральної рідини Кт 7.1.1	Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	20-30°C
ТП 7.1. Фільтрування культуральної рідини Кт 7.1.2	Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	120 Па
ТП 7.2. Підлив осаду Кт 7.2.1	Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	0,4-1 МПа

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

126

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ТП 7.2. Підрив осаду Кх 7.2.2	Культуральна рідина. рН	Фізичний, рН-метр	Кожну операцію	2
ТП 7.4. Промивка фільтрувальної тканини Кт 7.4.1	Температура промивної води	Фізичний, термометр	Кожну операцію	20°C
ТП 8 Гасіння фільтрату вапняним молоком Кт 8.1	Культуральна рідина	Фізичний, термометр	Кожну операцію	100°C
ТП 8 Гасіння фільтрату вапняним молоком Кх 8.2	Культуральна рідина. рН	Фізичний, рН-метр	Кожну операцію	6,8-7,0
ТП 8 Гасіння фільтрату вапняним молоком Кт 8.3	Процес. Час стабілізації	Фізичний, секундомір	Кожну операцію	45 хв

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

127

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ТП 9 Фільтрація цитрату кальцію Кт 9.1	Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	30°C
ТП 9 Фільтрація цитрату кальцію Кт 9.2	Промивна вода. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	50-60°C
ТП 9 Фільтрація цитрату кальцію Кх 9.3	Цитрат кальцію. рН	Фізичний, рН-метр	Кожну операцію	6,8-7,0
ТП 10 Сушіння цитрату кальцію Кт 10.1	Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	105°C
ТП 10 Сушіння цитрату кальцію Кт 10.2, Кх 10.3	Вага цитрату кальцію	Фізичний, аналітичний. Ваги	Кожну операцію	До постійного значення
ПМВ 11. Пресування цитрату кальцію Кт 11.1	Вага мішків цитрату кальцію	Фізичний, аналітичний. Ваги	Кожну операцію	25 кг
ЗВ 12 Знешкодження відходів та викидів Кх 12.1	Стічні води. рН	Фізичний, рН-метр	Кожну операцію	7,0

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

128

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
ЗВ 12 Знешкодження відходів та викидів Кт 12.2	Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	85-90°C
ЗВ 12 Знешкодження відходів та викидів Кх 12.3	Розчин з біомасою. рН	Фізичний, рН-метр	Кожну операцію	7,0
ЗВ 12 Знешкодження відходів та викидів Кт 12.4	Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
ЗВ 12 Знешкодження відходів та викидів Кт 12.5	Обробка гострою парою. Тривалість операції	Фізичний, секундомір	Кожну операцію	45 хв
ЗВ 12 Знешкодження відходів та викидів Кт 12.6	Обробка гострою парою. Тривалість операції	Фізичний, секундомір	Кожну операцію	45 хв

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

129

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ЗВ 12 Знешкодження відходів та викидів Кт 13.1	Обробка гострою парою. Тривалість операції	Фізичний, секундомір	Кожну операцію	45 хв
ЗВ 12 Знешкодження відходів та викидів Кт 13.2	Процес. Інтенсивність перемішування	Візуальний, фізичний, тахометр	Кожну операцію	100 об/хв
ЗВ 12 Знешкодження відходів та викидів Кт 13.3	Відпрацьоване повітря. Розмір часток	Фізичний, аспіраційний, датчик запиленості	Двічі на місяць	0,6 мкм
ПВ 13 Переробка відходів та викидів Кт 13.1	Очищене повітря. Ефективність очистки	Фізичний, аспіраційний, датчик запиленості	Двічі на місяць	99,995%
ПВ 13 Переробка відходів та викидів Кт 13.2	Тиск	Фізичний, манометр	Кожну операцію	450-650 Па

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

130

Кінець таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ПВ 13 Переробка відходів та викидів КТ 13.3	Промивна вода. Температура	Фізичний, термометр	Кожну операцію	20°C

РОЗДІЛ 5 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Ферментер – закрита система, в яку вводять біологічні агенти поряд з іншою сировиною таким чином, що це призводить до їх розмноження або до продукування ними інших речовин шляхом взаємодії з іншою сировиною. Ферментери звичайно обладнані регулюючими та контролюючими приладами, а також засобами для з'єднання, додавання або усунення речовин [123].

Культитивування *Aspergillus niger* проводиться глибинним суспензійним методом в умовах активної аерації. Оскільки даний гриб потребує великої кількості кисню для продукування лимонної кислоти, то необхідно не тільки підводити повітря через вмонтований барботер, а й розподіляти його рівномірно по об'єму поживного середовища за допомогою механічного перемішуючого пристрою. Окрім того, теплоту, що виділяється при ферментації, відводять через охолодження води, що подається у теплообмінну сорочку.

Метою процесу перемішування є гомогенізація, тобто надання однорідності суміші речовин. Фізичні процеси, які протікають у біореакторі можна розділити на три основні категорії: процеси переносу розчинених речовин, частинок та теплоти, мета якої надання концентраційної та температурної однорідності в усьому об'ємі середовища; процеси дроблення крапель та бульбашок, результат яких визначається інтенсивністю мікромасштабної турбулентності, що залежить в першу чергу від фізико-хімічних властивостей середовища та дифундуючих речовин,

					ДП БТ-9122.00 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 5. Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	Стадія	Арк.	Акрцвів
Розроб.	Шопова З. С.						132	177
Конс.	Шибєцький В. Ю.					КПІ ім. І. Сікорського		
						ФБТ		
Керівн.	Дзигун Л. П.							
Затв.								

а також мікромасштабна структура потоку рідини; явища тепло- та масообміну на границях систем рідина – внутрішня стінка апарату, рідина – частинки, краплі, бульбашки, рідина – рідина, що залежать від характеристик пограничного шару в наближенні до міжфазної поверхні [124].

У випадку біотехнологічного розмноження біологічного агенту в ферментері, його основне призначення полягає у насиченні організму поживними речовинами та киснем, а також підтриманні оптимальної температури культуральної рідини.

Перемішування – це процес рівномірного розподілу частинок однієї речовини (перша фаза) в іншій (друга фаза) у всьому об'ємі, яке має на меті підтримання дисперсної фази у зваженому стані задля отримання суспензії та емульсій або інтенсифікації біохімічних та інших процесів [125]. Даний процес не є самочинним, тому він потребує підведення енергії до середовища. На основі способів підведення енергії виділяють наступні способи перемішування [126]:

- Пневматичне – перемішування, яке здійснюється газами або водяною парою, найчастіше використовується в мікробіологічній та бродильній промисловості при культивуванні мікроорганізмів; [127]
- Циркуляційне перемішування здійснюється багатократним перекачуванням рідини по замкненому колу. Такі пристрої використовують для одержання гомогенних розчинів і неоднорідних систем – суспензій та емульсій, для сатурації рідини з метою отримання газованих напоїв; [126]
- Механічне перемішування проводить в апаратах з механічними перемішувачами; [127]
- Поточне перемішування відбувається за рахунок створення високошвидкісного потоку рідини [128].

Сутність процесу перемішування з фізичної сторони полягає у багатократному відносному перемішуванні макроскопічних елементів об'єму рідкого середовища під дією імпульсу, що передається середовищу механічною

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						133
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

мішалкою, струменем газу або рідини. Під час перемішування градієнти температур і концентрацій асимптотично наближаються до своїх мінімальних значень.

В основу пневматичного перемішування лежить ерліфтний ферментер (рис. 5.1) – барботажний апарат з центральним дифузором, в якому перемішування рідкої фази відбувається за рахунок енергії повітря [129]. В таких реакторах над барботером розташований дифузор у вигляді порожнього циліндра. Рідина частково спускається по кільцевому просторі між дифузором та корпусом апарату і циркулює безперервно.

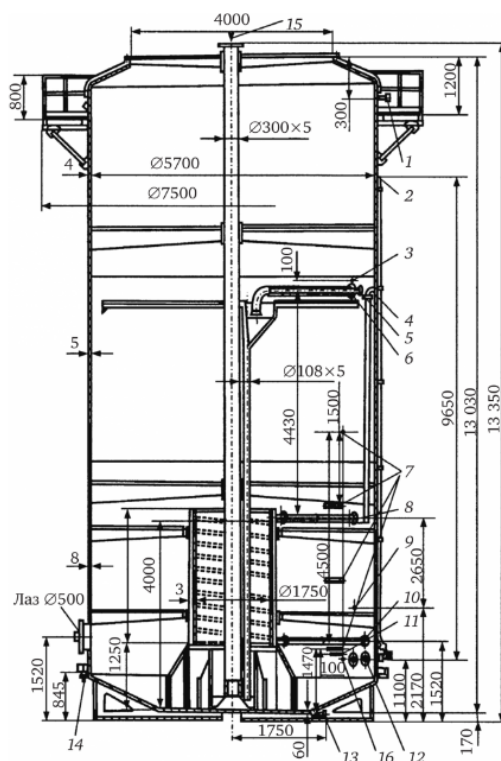


Рисунок 5.1 – Циліндричний ерліфтний ферментер: 1 – вхід в колектор, 2 – рівнемір, 3 – вхід мінеральних солей, 4 – вхід чистої культури, 5 – вхід води, 6 – вхід субстрату, 7 – пробовідбір, 8 – вихід води із змійовика, 9 – пробовідбір, 10 – вхід води в змійовик, 11 – карман для термометру, 12 – вихід культуральної рідини, 13, 14 – злив у каналізацію, 15 – подача повітря, 16 – штуцер [130]

Ерліфтні біореактори бувають двох основних типів: перший тип – ємність з центральною трубою для забезпечення циркуляції культуральної рідини (реактори з внутрішньою циркуляцією) (рис. 5.2); другий тип характеризується тим, що культуральна рідина проходить через окремі, незалежні канали (реактор з зовнішньою циркуляцією) (рис. 5.3). Конструкція ерліфтних ферментерів простіша, але в них обмежена регуляція швидкості циркуляції повітря [130].

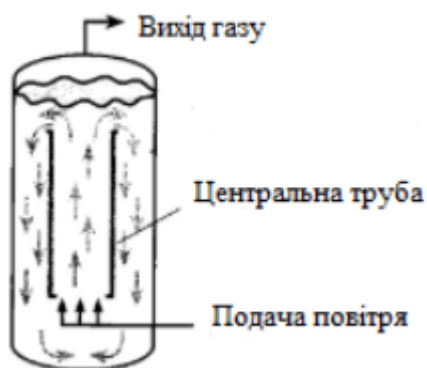


Рисунок 5.2 – Ерліфтний біореактор з внутрішньою циркуляцією [130]

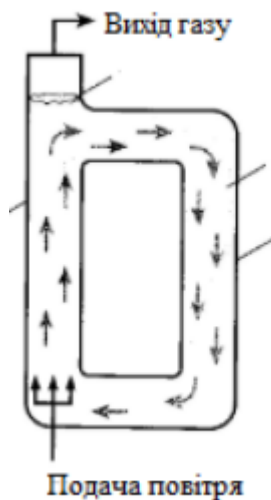


Рисунок 5.3 – Ерліфтний ферментер із зовнішньою циркуляцією [130]

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

135

Конструкційні особливості барботажних і ерліфтних біореакторів мають певні переваги в порівнянні з ферментерами з механічним перемішуванням: перші більш економічні, оскільки перемішування в них відбувається за рахунок потоку повітря, а отже даний процес не потребує додаткових витрат енергії для забезпечення обертання механічного перемішувача. Окрім того, потік повітря не здатен занадто сильно збурювати культуральну рідину і, таким чином, механічно не шкодить клітинами, оскільки не відбувається активна турбулізація потоків. Проте насичення киснем у даному випадку не є достатнім для повного забезпечення потреб *Aspergillus niger* через низьку інтенсивність масообміну за киснем (об'ємний коефіцієнт масопередачі $K_La=1-2$ кг/м³·год). Пояснюється це недостатньою вертикальною циркуляцією середовища та недостатнім диспергуванням газу [130].

Окрім ерліфтних ферментерів в біотехнологічній галузі використовується також біореактори з мішалками – пристроями, у яких перемішування рідини відбувається за рахунок підведення енергії. Принциповий вид механічних біореакторів це вертикальний циліндричний апарат з мішалкою, вісь обертання якої співпадає з віссю апарату. Об'єм таких пристроїв коливається від 10 г/дм³ до 2000 м³. Корпус має бути виконаний зі сталі, або алюмінію, титану та їхніх сплавів [124]

Усі фізико-хімічні процеси, що здійснюються в хімічних, фармакологічних або біотехнологічних апаратах вимагають наявності ємності, обмеженої корпусом, що повинні бути досить міцними і у переважній більшості випадків герметичними. У біотехнологічних та фармацевтичних виробництвах найбільш широке застосування знайшли циліндричні корпуси [131]. Днища і кришки реакторів виконують еліптичними (найбільш поширені), конічними або плоскими [132].

Мішалки кріпляться до валу і відіграють провідну роль у механічному перемішуванні, оскільки вони задають турбулізацію рідини за рахунок тертя

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						136
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

шарів при переміщуванні в об'ємі під час обертання мішалки. Вибирають мішалку залежно від цільового призначення рідкої системи і фізико-механічних характеристик і властивостей її компонентів. В основному на вибір мішалки впливають об'єм системи, її в'язкість та густина, наявність дисперсійної фази та її концентрація в системі [133].

Складний рух рідини, який виникає при обертанні мішалки, можна розкласти на радіальну, тангенційну та осьову складові. У мішалках різних конструкцій ці складові знаходяться у різних співвідношеннях.

Найбільш простими є лопатеві мішалки: на валу розташовують декілька пар лопатей, повернутих на 90° на певній відстані. У такому типі переважає радіальне перемішування, осьова складова достатньо мала, її циркуляція незначна і перемішування відбувається з невеликою інтенсивністю. Низька швидкість не дозволяє використовувати такий тип мішалок для рідин з в'язкістю $\mu \geq 50 \text{ Па}\cdot\text{с}$ і є непридатними для перемішування суспензій. Різновидами лопатевих мішалок є (рис. 5.4): листові (переважає тангенційна складова швидкості), якірні (можна використовувати при $\mu \leq 100 \text{ Па}\cdot\text{с}$), якірно-лопатеві або рамні [134]. Число обертів таких мішалок складає 0,25-0,75 об/с. Основні переваги таких мішалок – простота та низька собівартість, а недолік – низька насосна дія, яка створюється характером циркуляційного потоку. Створення турбулентного руху відбувається дуже повільно, тому сама циркуляція незначна. Після перемішування залишається великий градієнт концентрацій, що робить її непридатною для змішування кількох речовин [135].

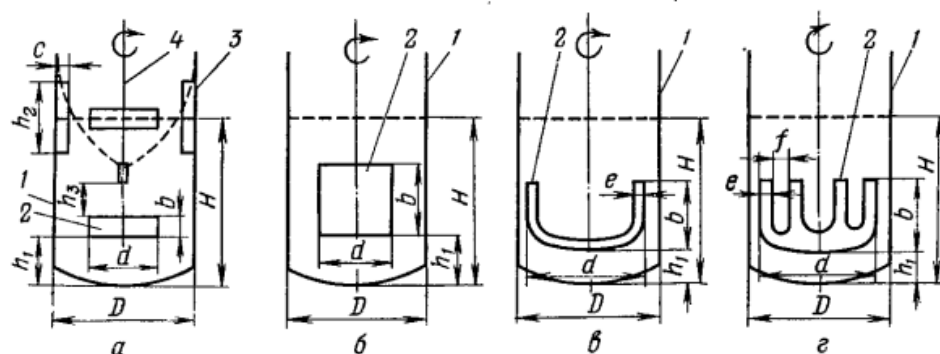


Рисунок 5.4 – Механічні мішалки: а – лопастна, б – листова, в – якірна, г – якірно-лопастна (рамна) [134]

Турбінні мішалки складаються з набору (від 4 до 12) вертикальних лопатей прямокутної форми. Створює переважно радіальний потік, що вимагає спеціальну форму посудини [135]. При обертанні цієї мішалки утворюється розрідження, а на периферії – надлишковий напір, завдяки чому рідина на стінках апарату поділяється на два потоки, які всмоктуються зверху та знижу, як це показано на рис. 5.5. Зі збільшенням в'язкості або переміщення рідини ближче до днища апарату падає інтенсивність циркуляції. Така мішалка дозволяє перемішувати рідини з в'язкістю до 100 Па·с, але що важливіше, використання енергії не змінюється у широкому діапазоні в'язкостей, що дозволяє використовувати їх для середовищ зі змінною в'язкістю. Область використання співпадає з лопатевими мішалками, проте турбінні більш ефективні у диспергуванні рідин та газів у рідинах [134].

Для інтенсивного перемішування рідин з в'язкістю до 10 Па·с використовують пропелерні мішалки (рис. 5.6), кругова швидкість яких досягає 10 м/с. Такі мішалки працюють без передачі на повних обертах двигуна, що забезпечує значне скорочення втрат механічної енергії. Робочим органом таких мішалок є лопаті (від 2 до 6) з неперервно змінним нахилом. Така мішалка спричинює радіальний та осьовий рух рідини (на рівні з обертальним).

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

138

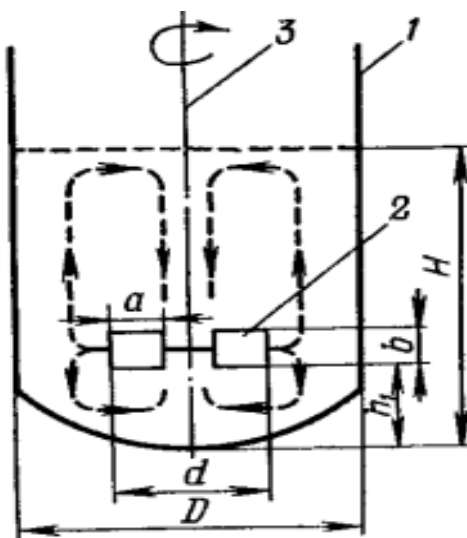


Рисунок 5.5 – Зображення турбінної мішалки [134]

В результаті виникають циркуляційні потоки, вказані на рис. 5.6. Значна величина осьової складової потоку та великий насосний ефект є безперечними перевагами, оскільки дозволяють істотно скоротити тривалість перемішування. Недоліками є ретельні розрахунки, що підвищує накладні витрати.

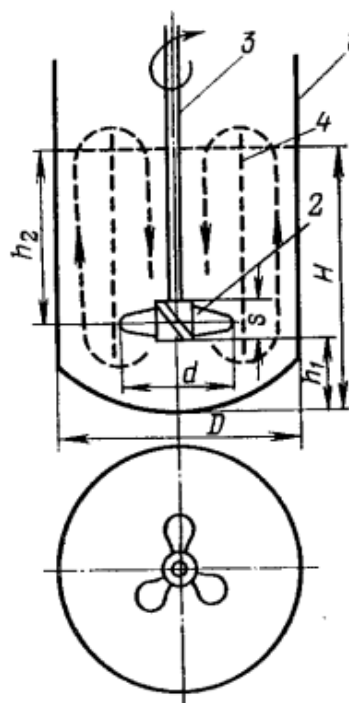


Рисунок 5.6 – Пропелерна мішалка: 1 – апарат, 2 – робоче колесо, 3 – вал, 4 – дифузор [134]

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

139

Окрім того, інтенсивність пропелерних мішалок дуже залежить від форми посудини, тому їх рекомендують використовувати при випуклому днищі. Для прямокутних, плоских та увігнутих днищ такі мішали є непридатними [135]. Пропелерні мішалки рекомендують для перемішування і утворення малов'язкісних емульсій, для процесів розчинення і хімічного перетворення, утворення тонких суспензій, для диспергування газів у рідинах [134]. Проте конструкція пропелерних мішалок не є достатньо придатною для гомогенізації середовища, що складається з рідкою та газової фази. Відповідно, використання таких пристроїв неможливе у випадку активної аерації у промисловому культивуванні з барботуванням середовища.

Існують також спеціальні запатентовані механічні мішалки, наприклад дискові мішалки для неперервної екстракції або для приготування вибухових речовин; стрічкові для перемішування пасто- та тістоподібних мас; конусні мішалки для надконцентрованих суспензій; вібраційні мішалки, які змушують рідину перемішуватись за рахунок обернено-поступальних рухів, тощо [135].

Для культивування *Aspergillus niger* з метою отримання високої концентрації лимонної кислоти, що утворюється в дихальному ланцюжку ЦТК доцільно використовувати ферментер з механічним перемішуючим пристроєм у вигляді пропелерної мішалки, який також містить теплообмінну сорочку для підтримання сталої температури перемішування розчину.

Реактор оснащений 11 фланцями різного призначення: для входу поживного середовища, входу біологічного агента, виходу культуральної рідини, входу та виходу теплоагента, люком для проведення технічних робіт, смотровим вікном, установками для термометра та рівнеміра. Окрім того, необхідною складовою змішувачів є загальнозаводське обладнання, таке як мотори або насоси, допоміжне обладнання у вигляді опор, тощо.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						140
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Апарат призначений для культивування мікроміцета *Aspergillus niger*.

- | | | |
|-----|---------------------------------|----------------------|
| 1. | Номінальний об'єм апарату | 5 м ³ ; |
| 2. | Тривалість процесу змішування | 7200 хв; |
| 3. | Середовище в апараті | культуральна рідина; |
| 4. | Середовище в сорочці | вода; |
| 5. | Відсоток заповнення апарату | 65%; |
| 6. | Торцеве ущільнення | одинарне; |
| 7. | Перемішуючий пристрій | |
| | тип мішалки | пропелерна; |
| | діаметр мішалки | 450 мм; |
| | потужність приводу | 2,2 кВт; |
| | кількість мішалок | 1; |
| | кількість відбивних перегородок | 4; |
| 8. | Температура розчину | 30°C; |
| 9. | Площа поверхні теплообміну | 12 м ² ; |
| 10. | Частота обертання мішалки | 3 с ⁻¹ ; |
| 11. | Габаритні розміри | |
| | довжина | 2040 мм; |
| | висота | 4150 мм; |
| | ширина | 2320 мм; |
| 12. | Маса | 297,4 кг; |

Метою розрахунку є: визначення необхідної для процесу потужності перемішування; розрахунок параметрів перемішуючого пристрою; тепловий розрахунок апарату.

Конструктивний розрахунок

Таблиця 5.1. Вхідні дані для конструктивного розрахунку

№ з/п	Найменування параметру	Познач.	Розмірн.	Значення
1	Температура поживного середовища	t_p	°C	30
2	Коефіцієнт заповнення апарату	φ	-	0,65
3	Тривалість культивування	τ	хв.	7200
4	Абсолютний тиск в апараті	p_a	МПа	0,02
5	Тип перемішуючого пристрою	Пропелерна мішалка		
6	Частота обертання мішалки	n		3 c^{-1}
7	Номінальний об'єм ферментера	V	м^3	5

1. Значення реологічних та теплофізичних властивостей культуральної рідини, що знаходиться в апараті, приймаємо як для для 8%-го розчину меляси (оскільки в склад поживного середовища входить 80 г/дм^3 меляси, а вміст мінеральних солей не досягає в сумі і 0,2%, що дозволяє ними знехтувати)

1.1. Визначення густини:

$$\begin{aligned}\rho_p &= 1007,3 + 4,11(C - 0,11t_c) = 1007,3 + 4,11(8 - 0,11 \cdot 30) = \\ &= 1026,6 \text{ кг/м}^3\end{aligned}$$

1.1. Коефіцієнт динамічної в'язкості:

$$\mu_p = (2,7 + 0,192C)t^{-m} = (2,7 + 0,192 \cdot 8)30^{-0,426} = 994,7 \cdot 10^{-6} \text{ Па} \cdot \text{с}$$

1.2. Питома теплоємність розчину розраховується за формулою:

$$c_p = 4,073 - 0,00134(14,4C - t) = 4,073 - 0,00134(14,4 \cdot 8 - 30) =$$

$$= 3,96 \frac{\text{кДж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}$$

1.3. Поверхневий натяг:

$$\sigma_p \cdot 10^3 = 75 - 0,183(1,46C + t) = 75 - 0,183(1,46 \cdot 8 + 30) = 67,37 \text{ Н/м}$$

1.4. Теплопровідність визначається методом інтерполяції. В таблиці 5.2 наведені значення теплопровідності для розчинів меляси з різною концентрацією:

Таблиця 5.2 – Значення теплопровідності розчинів меляси з різною концентрацією

C, %	λ , Вт/м·К при температурі 30°C
7,3	0,582
9,2	0,565

$$\lambda_p = \lambda_p^{7,3} - \frac{\lambda_p^{7,3} - \lambda_p^{9,2}}{9,2 - 7,3} (8 - 7,3) = 0,576 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}}$$

2. Конструктивний розрахунок апарату і окремих складових елементів

2.1. Розраховуємо робочий об'єм V_p біореактора:

$$V_p = V_H \cdot \varphi = 5 \cdot 0,65 = 3,25 \text{ м}^3$$

2.2. Обираємо реактор спираючись на номінальний об'єм:

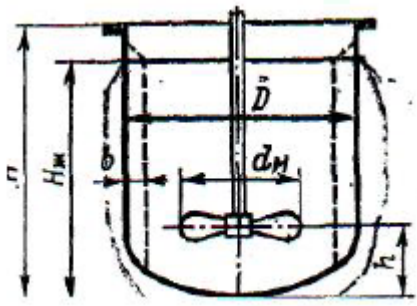
Обираємо реактор з еліптичним днищем і еліптичною кришкою (тип 0), з гладкою сорочкою (тип 01) згідно з ГОСТ 6533-78: номінальний об'єм $V_p=5 \text{ м}^3$, діаметр апарату $D = 1800 \text{ мм}$, Площа поверхні теплообміну сорочки $F_p = 12 \text{ м}^2$, діаметр вала мішалки $d_v = 65;80;95$. Відповідно до ГОСТ 9931-85 $H = 2230 \text{ мм}$, площа внутрішньої поверхні $F = 14,5 \text{ м}^2$.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						143
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.3. Розраховуємо параметри мішалки:

Основні співвідношення для реактора з пропелерною мішалкою наведені у таблиці 5.3.

Таблиця 5.3 – Основні співвідношення для пропелерної мішалки у ферментері

Вид мішалки: пропелерна	Основні співвідношення
	$D/d_M = 3 \div 4$; $h/d_M = 0,4 \div 1$; $b/d_M = 0,1$; $\xi_M = 0,56$

Нехай $D/d_M = 4$, $h/d_M = 0,4 \div 1,0$; тоді

$$d_M = \frac{D_B}{4} = \frac{1800}{4} = 450 \text{ мм}$$

$$b = d_M \cdot 0,1 = 450 \cdot 0,1 = 45 \text{ мм}$$

$$h = d_M \cdot (0,4 \div 1,0) = 450 \cdot (0,4 \div 1,0) = (180 \div 450) \text{ мм}$$

2.4. Розраховуємо параметри днища:

Згідно з ГОСТ 6533-78: для реактора з $D_B = 1800$ мм маємо висоту еліптичного днища $h_B = 450$ мм, оскільки значення h_B є сталим і дорівнює $h_B = 0,25D_B$

Для того, щоб знайти значення відбортаної частини днища h_1 треба визначити товщину стінки еліптичного днища S_d :

$$S = \frac{P_p \cdot R}{2 \cdot [\sigma] \cdot \varphi - 0,5P_p} + C = \frac{0,02 \cdot 1,8}{2 \cdot 130 \cdot 0,8 - 0,5 \cdot 0,02} + 0,008 = 0,0082 \text{ м}$$

Для стандартних еліптичних днищ, для яких $h_B = 0,25D_B$, тоді радіус кривизни $R = \frac{D_B^2}{4h_B} = D_B$

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		144

Товщина стінки циліндричної частини апарату S:

$$S = \frac{P_p \cdot D_B}{2 \cdot [\sigma] \cdot \varphi - P_p} + C = \frac{0,02 \cdot 1,8}{2 \cdot 130 \cdot 0,8 - 0,02} + 0,008 = 0,0082 \text{ м} = 8,2 \text{ мм}$$

де P_p – робочий тиск у ферментері, МПа;

$[\sigma]$ – допустиме напруження на розтяг для матеріалу апарату, МПа (для сталі X18H10T – 130МПа [Теплообменные аппараты и методы их расчета: учебное пособие / Л. В. Таранова. – 2-е изд., перераб. и доп. – Тюмень : ТюмГНГУ, 2012. – 198 с., с.60]);

φ – коефіцієнт міцності зварного шва 0,8;

C – прибавка на корозію 8 мм (приймається у діапазоні від 1 до 8мм в залежності від корозійних властивостей матеріалу [20])

Відповідно до розрахованих значень товщини стінки обираємо стандартизовані $S=10$ мм, тоді значення відбортеної частини днища $h_1 = 40$ мм, значення внутрішньої поверхні еліптичного днища $F_{\text{дн}} = 3,74 \text{ м}^2$, об'єму еліптичного днища $V_{\text{дн}} = 0,8617 \text{ м}^3$

2.5. Знаходимо висоту рівня рідини в реакторі:

$$H_p = \frac{4 \cdot (V_p - V_{\text{дн}})}{\pi \cdot D_B^2} + h_1 + h_B = \frac{4 \cdot (3,25 - 0,8617)}{\pi \cdot 1,8^2} + 0,04 + 0,45 = 1,43 \text{ м}$$

2.6. Розраховуємо глибину воронки

Глибину воронки знаходять за формулою:

$$h_B = \frac{B \cdot n^2 \cdot d_m^2}{2 \cdot g}$$

де B – параметр глибини воронки

g – прискорення вільного падіння, $9,81 \text{ м/с}^2$

Визначення параметру глибини воронки поділяється на кілька етапів:

2.6.1. Параметр висоти завантаження:

$$\gamma = 8 \cdot \frac{H_p}{D_b} + 1 = 8 \cdot \frac{1,43}{1,8} + 1 = 7,35$$

2.6.2. Параметр гідравлічного опору мішалки E

$$E = \frac{\gamma}{\xi_m \cdot z_m \cdot Re_{\text{ец}}^{0,25}}$$

де ξ_m – коефіцієнт гідравлічного опору мішалки

z_m – кількість мішалок на валу, шт (приймаємо, що на валу одна мішалка);

$Re_{\text{ец}}$ – критерій Рейнольдса відцентрового перемішування

2.6.2.1. Критерій Рейнольдса:

$$Re_{\text{ец}} = \frac{n \cdot \rho_p \cdot d_m^2}{\mu_p} = \frac{3 \cdot 1026,6 \cdot 0,45^2}{994,7 \cdot 10^{-6}} = 0,627 \cdot 10^6$$

Режим руху рідини в мішалці – турбулентний.

2.6.2.2. Параметр E:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_m \cdot z_m \cdot Re_{\text{ец}}^{0,25}} = \frac{7,35}{0,56 \cdot 1 \cdot (0,627 \cdot 10^6)^{0,25}} = 0,466$$

За номограмою до розрахунку глибини воронки знаходимо значення $\psi = 1$, $B = 13$ за рис. 5.7

Знаходимо висоту воронки:

$$h_b = \frac{B \cdot n^2 \cdot d_m^2}{2 \cdot g} = \frac{13 \cdot 3^2 \cdot 0,45^2}{2 \cdot 9,81} = 1,2 \text{ м}$$

2.6.3. Розраховуємо гранично допустиму глибину воронки:

$$h_{\text{гр}} = H_p - h = 1,43 - 0,45 = 0,85 \text{ м}$$

Оскільки $h_b > h_{\text{гр}}$ отже, треба встановлювати перегородки

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						146
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

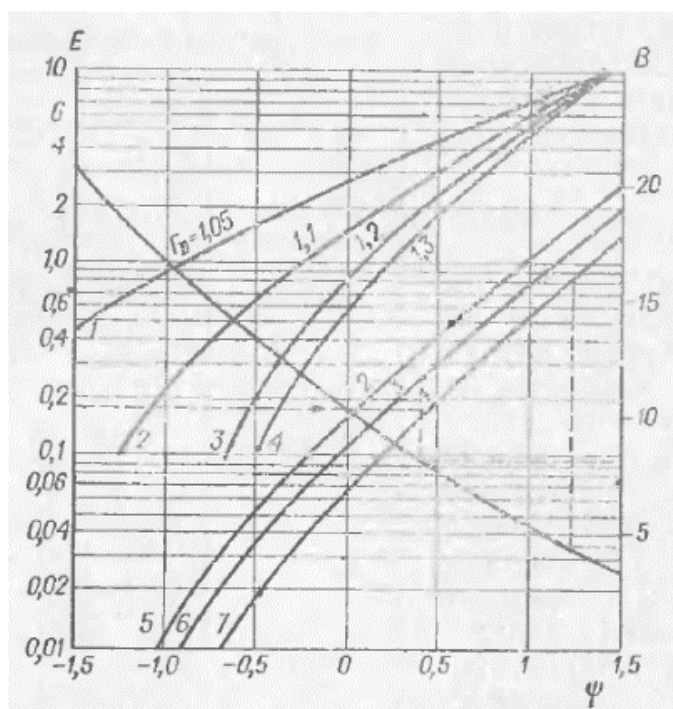


Рисунок 5.7 – Параметр розподілення швидкості ψ та B для пропелерної

мішалки (7) за умови що $\Gamma_D = \frac{D_B}{d_M} \geq 1,5$

2.6.4. Товщина відбивної перегородки

$$b = d_M \cdot 0,1 = 450 \cdot 0,1 = 45 \text{ мм}$$

2.7. Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

$$N_{p-r} = \frac{0,695 \cdot (K_N \cdot \rho_p)^{0,9} \cdot n^{3,15} \cdot d_M^{5,85}}{V_\Pi^{0,25}}$$

де K_N – коефіцієнт потужності є залежністю функції $K_N = f(Re_{ec})$ (рис.

5.8)

ρ_p – густина розчину, $\rho_p = 1026,6 \text{ кг/м}^3$

n – число обертів мішалки, $n = 3 \text{ с}^{-1}$

d_M – діаметр мішалки, $0,45 \text{ м}$.

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

147

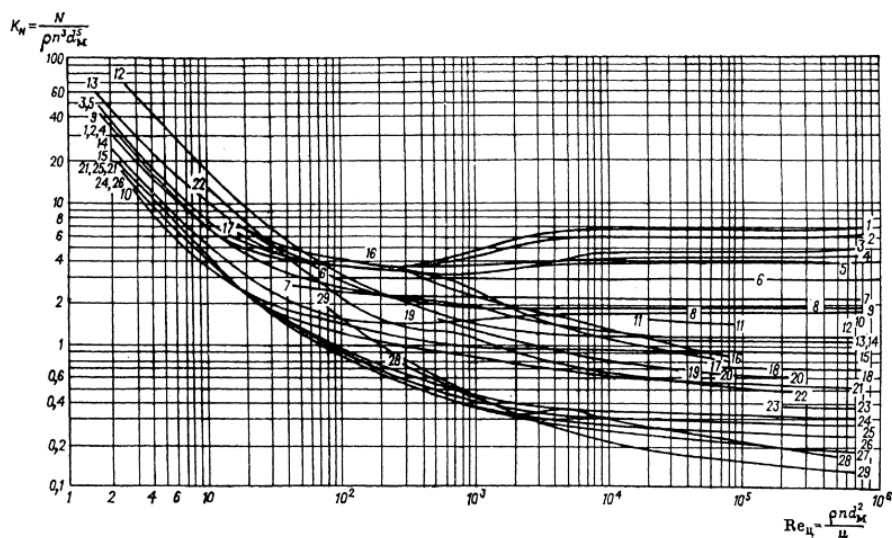


Рисунок 5.8 – Залежність $K_N = f(Re_{ц})$ для пропелерної мішалки з перегородками - 15

Отже, для раніше знайденого значення $Re_{ц} = 0,627 \cdot 10^6$ знаходимо значення $K_N = 0,9$.

$$N_{\text{пер}} = \frac{0,695(K_N \cdot \rho_p)^{0,9} \cdot n^{3,15} \cdot d_m^{5,85}}{V_{\text{п}}^{0,25}} = \frac{0,695(0,9 \cdot 1026,6)^{0,9} \cdot 3^{3,15} \cdot 0,45^{5,85}}{0,0325^{0,25}} =$$

$$= 227,7 \text{ Вт}$$

$V_{\text{п}} = 1,95 \text{ м}^3/\text{хв} = 0,0325 \text{ м}^3/\text{с}$ – витрати повітря в апараті

2.8. Розрахунок потужності привода мішалки

2.8.1. Знаходимо діаметр вала мішалки:

$$d_{\text{в}} = C \cdot d_{\text{м}} = 0,166 \cdot 0,45 = 0,075 \text{ м}$$

де C – коефіцієнт, для пропелерної $C = 0,166$.

Обираємо стандартизоване значення $d_{\text{в}} = 0,08 \text{ м}$

2.8.2. Потужність, що витрачається на тертя в одинарному торцевому ущільненні, вважаємо що розчин неагресивний:

$$N_{\text{ущ}} = 6020 \cdot d_{\text{в}}^{1,3} = 6020 \cdot 0,065^{1,3} = 172,34 \text{ Вт}$$

2.8.3. Потужність привода мішалки:

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9122.00 ПЗ

Арк.

148

$$N_{\text{ел}} = \frac{[(K_{\text{п}} \cdot K_{\text{н}}) \cdot (\sum K_i \cdot N) \cdot N_{\text{пер}} + N_{\text{ущ}}]}{\eta} = \frac{1,25 \cdot 0,89 \cdot 1,2 \cdot 4 \cdot 227,7 + 172,34}{0,85} =$$

$$= 1633,2 \text{ Вт}$$

де $K_{\text{п}}$ – коефіцієнт, що залежить від наявності в апараті відбивних перегородок (за наявності $K_{\text{п}} = 1$, якщо перегородки відсутні $K_{\text{п}} = 1,25$);

$K_{\text{н}}$ – коефіцієнт, що враховує рівень рідини в апараті, $K_{\text{н}} = \sqrt{\frac{H_{\text{р}}}{D_{\text{в}}}} = \sqrt{\frac{1,43}{1,8}} = 0,89$;

K_i – коефіцієнт, що враховує витрати потужності на подолання опору внутрішніх пристроїв реактора (приймають $K_i = 1,1 \div 1,2$);

N – кількість внутрішніх пристроїв реактора, маємо 4 шт. – для заміру температури, для заміру рівня рідини, трубопровід для наповнення рідиною, трубопровід для подачі біологічного агенту;

η – коефіцієнт корисної дії привода ($\eta = 0,85 \div 0,9$).

Отже, обираємо асинхронний трифазний електродвигун з потужністю 2,2 кВт і короткозамкненим ротором.

2.9. Розрахунок барботеру

2.9.1. Висота барботажного пристрою:

$$h_{\text{б}} = 0,25 \cdot d_{\text{м}} = 0,25 \cdot 0,45 = 0,1125 \text{ м}$$

2.9.2. Діаметр, на якому розміщені отвори в барботері:

$$D_{\text{o}} = 0,5 \cdot d_{\text{м}} = 0,5 \cdot 0,45 = 0,225 \text{ м}$$

2.9.3. Діаметр, на якому розміщені отвори в барботері:

$$d_{\text{o}} = 2 - 5 \text{ мм}$$

Площа отворів при $d_{\text{o}}=2 \text{ мм}=0,002 \text{ м}$ становить $F_{\text{o}}=1,963 \cdot 10^{-5} \text{ м}^2$

2.9.4. Відстань від мішалки до барботеру:

$$h_{\text{мб}} = 0,25 \cdot d_{\text{м}} = 0,25 \cdot 0,45 = 0,1125 \text{ м}$$

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		149

Згідно рекомендацій, на 1 одиницю об'єму культуральної рідини за 1 хв витрачається 0,6 одиниць об'єму повітря. Отже, на робочий об'єм 3,25 м³ витрати повітря складають: $V_{\pi}=1,95 \text{ м}^3/\text{хв}=0,0325 \text{ м}^3/\text{с}$

2.9.5. Швидкість газу в отворах складає $W_{\pi}=25 \text{ м/с}$

2.9.6. Внутрішній діаметр барботеру:

$$d_{\text{б.вн}} = \sqrt{\frac{4 \cdot V_{\pi}}{W_{\pi} \cdot \pi}} = \sqrt{\frac{4 \cdot 0,0325}{25 \cdot \pi}} = 0,042 \text{ м}$$

2.9.7. Середній діаметр барботера:

$$D_{\text{сер}} = 6 \cdot d_{\text{б.вн}} = 6 \cdot 0,042 = 0,252 \text{ м}$$

2.9.8. Кількість отворів в барботері:

$$z_o = \frac{4 \cdot V_{\pi}}{W_{\pi} \cdot \pi \cdot d_o} = \frac{4 \cdot 0,0325}{25 \cdot \pi \cdot 0,002} = 414 \text{ шт}$$

2.9.9. Кількість отворів в 1 ряду:

$$z_1 = \frac{\pi \cdot D_o}{t} = \frac{\pi \cdot 0,225}{0,025} = 28 \text{ шт}$$

Де t – крок між отворами, приймаємо $25 \text{ мм}=0,025 \text{ м}$

2.9.10. Кількість рядів отворів:

$$n = \frac{z}{z_1} = \frac{414}{28} \approx 15 \text{ рядів}$$

2.9.11. Сумарна площа поперечного перерізу отворів барботера:

$$S_{\text{отв}} = \frac{\pi}{4} \cdot d_o^2 \cdot z = \frac{\pi}{4} \cdot 0,002^2 \cdot 414 = 0,0013 \text{ м}^2$$

Тепловий розрахунок

Охолодження культуральної рідини відбувається до температури 30°C. Даний процес – екзотермічний, тому охолодження відбувається через подачу води в теплообмінну сорочку.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		150

3. Параметри культуральної рідини, поживного середовища, біологічного агенту:

Густина поживного середовища: $\rho_p = 1026,6 \text{ кг/м}^3$

Коефіцієнт динамічної в'язкості поживного середовища: $\mu_p = 994,7 \cdot 10^{-6} \text{ Па} \cdot \text{с}$

Питома теплоємність розчину поживного середовища: $c_p = 3,96 \frac{\text{кДж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}$

Поверхневий натяг поживного середовища: $\sigma_p \cdot 10^3 = 67,37 \text{ Н/м}$

Теплопровідність поживного середовища: $\lambda_p = 0,576 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}}$

3.1. Густина повітря розраховується за формулою:

$$\rho_{\text{п}} = 1,29 \cdot \frac{273}{t + 273} = 1,29 \cdot \frac{273}{30 + 273} = 1,16 \text{ кг/м}^3$$

3.2. Маса повітря:

$$m_{\text{п}} = \rho_{\text{п}} \cdot V_{\text{п}} = 1,16 \cdot 0,0325 = 0,0377 \text{ кг}$$

3.3. Маса поживного середовища:

$$m_{\text{пс}} = \rho_p \cdot V_p = 1026,6 \cdot 3,25 = 3336,5 \text{ кг}$$

3.4. Маса культуральної рідини:

$$m_{\text{кр}} = m_{\text{ба}} + m_{\text{пс}} = 3336,5 + 522 = 3858,5 \text{ кг}$$

4. Надходження теплоти в апарат

4.1. Теплота від поживного середовища:

$$E_{\text{пс}} = m_{\text{пс}} \cdot c_p \cdot t = 3336,5 \cdot 3960 \cdot 30 = 396,4 \text{ МДж}$$

4.2. Теплота від біологічного агенту:

$$E_{\text{ба}} = m_{\text{ба}} \cdot c_p \cdot t = 522 \cdot 3960 \cdot 30 = 62 \text{ МДж}$$

4.3. Теплота від повітря:

$$E_{\text{п}} = m_{\text{п}} \cdot c_{\text{п}} \cdot t \cdot \tau = 0,0377 \cdot 1000 \cdot 30 \cdot 432000 = 488,6 \text{ МДж}$$

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		151

4.4. Теплота що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від повітря:

$$E_{\text{дис}} = V_{\text{п}} \cdot \Delta p \cdot \tau = 0,0325 \cdot 14,4 \cdot 432000 = 202,176 \text{ кДж}$$

$$\Delta p = \rho_{\text{р}} \cdot H_{\text{р}} \cdot g = 1026,6 \cdot 1,43 \cdot 9,81 = 14,4 \text{ кДж}$$

4.5. Теплота від перемішуючого пристрою:

$$E_{\text{м}} = N_{\text{пер}} \cdot \tau = 227,7 \cdot 432000 = 98,3 \text{ МДж}$$

4.6. Теплота від реакції:

Вміст цукру в мелясі складає 45%, тобто від 8%-го розчину це 3,6%:

$$m_{\text{ц}} = m_{\text{пс}} \cdot 0,06 = 3336,5 \cdot 0,06 = 120,1 \text{ кг}$$

1 кг цукру при окисленні дає 3744 ккал тепла, тоді теплота від реакції при $r=16,5$ МДж/кг:

$$E_{\text{р}} = m_{\text{ц}} \cdot \frac{r}{\tau} = 120,1 \cdot \frac{16,5}{120} = 16,51 \text{ МДж}$$

4.7. Сумарна кількість теплоти:

$$E_{\text{над}} = \sum E = E_{\text{пс}} + E_{\text{ба}} + E_{\text{п}} + E_{\text{дис}} + E_{\text{м}} + E_{\text{р}} = 1062 \text{ МДж}$$

5. Втрати теплоти в апараті:

5.1. Втрати теплоти в навколишнє середовище приймаємо 10%:

$$E_{\text{вит}} = 0,1 \cdot \sum E = 0,1 \cdot 1062 = 106,2 \text{ МДж}$$

5.2. Втрати теплоти культуральної рідини:

$$E_{\text{кр}} = m_{\text{кр}} \cdot c_{\text{р}} \cdot t = 3858,5 \cdot 3960 \cdot 30 = 458,4 \text{ МДж}$$

5.3. Втрати теплоти повітря:

$$E_{\text{п2}} = V_{\text{п}} \cdot c_{\text{р}} \cdot t \cdot \tau = 0,0325 \cdot 1000 \cdot 30 \cdot 432000 = 421,2 \text{ МДж}$$

6. Рівняння теплового балансу:

$$E_{\text{пс}} + E_{\text{ба}} + E_{\text{п}} + E_{\text{дис}} + E_{\text{м}} + E_{\text{р}} + E_{\text{Т1}} = E_{\text{кр}} + E_{\text{п2}} + E_{\text{вит}} + E_{\text{Т2}}$$

$$E_{\text{Т1}} - E_{\text{Т2}} = m_{\text{Т}} \cdot c_{\text{Т}}(t_1 - t_2) = E_{\text{над}} - E_{\text{вит}}$$

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						152
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$Q = \Delta = E_{T1} - E_{T2} = -E_{\text{над}} + E_{\text{вит}} = -1062 + (106,2 + 421,2 + 458,4) = -76,2 \text{ МДж}$$

Оскільки $\Delta < 0$, то $t_1 < t_2$, а значить ферментер потребує охолодження. Приймаємо, що температура води на вході сорочку 20°C (відповідно до стадії допоміжних робіт з підготовки води).

7. Матеріальний баланс:

$$c_{\text{кр}} \cdot m_{\text{кр}} \cdot \Delta t_{\text{кр}} + c_{\text{ф}} \cdot m_{\text{ф}} \cdot \Delta t_{\text{ф}} + Q_{\text{в}} = c_{\text{в}} \cdot G \cdot \Delta t_{\text{в}}$$

8. Визначення маси теплоносія:

$$t_{\text{кр}} - \Delta t_{\text{ср}} = t_{\text{Т}}$$

Приймаємо $\Delta t_{\text{ср}} = 10^\circ\text{C}$

$$t_{\text{Т}} = t_{\text{кр}} - 10^\circ\text{C} = 30 - 10 = 20^\circ\text{C}$$

$$t_2 = t_{\text{Т}} + 1^\circ\text{C} = 20 + 1 = 21^\circ\text{C}$$

$$t_1 = t_{\text{Т}} - 1^\circ\text{C} = 20 - 1 = 19^\circ\text{C}$$

$$m_{\text{Т}} \cdot c_{\text{Т}}(t_1 - t_2) = \Delta$$

$$m_{\text{Т}} = \frac{\Delta}{c_{\text{Т}}(t_1 - t_2)} = \frac{76,2 \cdot 10^6}{4190 \cdot (21 - 19)} = 9093,1 \text{ кг}$$

$C_{\text{Т}} = 4190 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$ – питома теплоємність води

Тоді масові витрати:

$$G_{\text{Т}} = \frac{m_{\text{Т}}}{\tau} = \frac{9093,1}{432000} = 0,021 \frac{\text{кг}}{\text{с}}$$

$$W_{\text{Т}} = \frac{G_{\text{Т}}}{998} = 0,021 \cdot 10^{-3} \frac{\text{м}^3}{\text{с}}$$

9. Для визначення поверхні теплообміну знаходимо коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія (води) у сорочці та від середовища, а також коефіцієнт теплопередачі:

9.1. Коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія (культуральна рідина):

$$\alpha = \frac{D_{\text{с}} - 2\delta_{\text{ст}} - D}{2} = \frac{2,1 - 0,02 - 1,8}{2} = 0,14 \text{ м}$$

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		153

$$b = 0,15 - a = 0,01 \text{ м}$$

9.1.1. Діаметр сорочки D_c приймаємо на 0,2 м більше за діаметр реактора

9.1.2. Еквівалентний діаметр:

$$d_{\text{екв}} = \frac{2ab}{a+b} = \frac{2 \cdot 0,14 \cdot 0,01}{0,14 + 0,01} = 0,0186 \text{ м}$$

9.1.3. Середній діаметр ферментера:

$$D_{\text{сер}} = D_c - a = 2 - 0,14 = 1,86 \text{ м}$$

9.1.4. Визначаємо критерій Нуссельта:

$$Nu_{\text{кр}} = 1,35 Re_{\text{кр}}^{0,59} \cdot Pr_{\text{кр}}^{0,38} \left(\frac{\mu_p}{\mu_{\text{ст}}} \right)^{0,14} = 1,35 \cdot (6,5 \cdot 10^5)^{0,59} \cdot 6,83^{0,38} = 7534,12$$

Значенням $\left(\frac{\mu_c}{\mu_{\text{ст}}} \right)^{0,14}$ можна знехтувати, оскільки приймаємо, що біля стінки температура відрізняється на 1 градус.

9.1.5. Критерій Рейнольдса:

$$Re_{\text{кр}} = \frac{d_M}{\nu_p} (n \cdot d_M + 4 \cdot W_{\text{п}}) = \frac{0,45}{0,97 \cdot 10^{-6}} (3 \cdot 0,45 + 4 \cdot 0,012) = 6,5 \cdot 10^5$$

$$W_{\text{п}} = \frac{4 \cdot V_{\text{п}}}{\pi \cdot D^2} = \frac{4 \cdot 0,0325}{\pi \cdot 1,8^2} = 0,012 \text{ м/с}$$

$$\nu_p = \frac{\mu_p}{\rho_p} = \frac{994,7 \cdot 10^{-6}}{1026,6} = 0,97 \cdot 10^{-6} \text{ Па} \cdot \text{с}$$

9.1.6. Критерій Прандтля:

$$Pr_{\text{кр}} = \frac{\mu_p \cdot c_p}{\lambda_p} = \frac{994,7 \cdot 10^{-6} \cdot 3960}{0,576} = 6,83$$

9.1.7. Тоді коефіцієнт тепловіддачі від культуральної рідини становить:

$$\alpha_{\text{кр}} = \frac{Nu_{\text{кр}} \cdot \lambda_p}{D} = \frac{7534,12 \cdot 0,576}{1,8} = 2410,9 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		154

9.2. Визначаємо коефіцієнт тепловіддачі для теплоносія (вода):

9.2.1. Об'ємні витрати води:

$$W_T = \frac{G_T}{998} = 0,021 \cdot 10^{-3} \text{ м}^3/\text{с}$$

Де густина води при 20°C становить 998 кг/м³

9.2.2. Швидкість руху води:

$$W_B = \frac{W_T}{ab} = \frac{0,021 \cdot 10^{-3}}{0,14 \cdot 0,01} = 0,015 \frac{\text{м}}{\text{с}}$$

9.2.3. Критерій Рейнольдса для води:

$$Re_B = \frac{W_B \cdot d_{\text{екв}}}{\nu_B} = \frac{0,015 \cdot 0,0186}{1,01 \cdot 10^{-6}} = 276,2$$

Де кінематична в'язкість води при 20°C становить 1,01·10⁻⁶ м²/с

Отже, у сорочці протікає вільна конвекція.

9.2.4. Критерій Прандтля:

$$Pr_B = \frac{\mu_B \cdot c_B}{\lambda_B} = \frac{1000 \cdot 10^{-6} \cdot 4190}{0,599} = 6,99$$

Де динамічна в'язкість води при 20°C становить 1000·10⁻⁶ Па·с

Де теплоємність води при 20°C становить 4190 Дж/кг·К

Де питома теплопровідність води при 20°C становить 0,599 Вт/м·К

9.2.5. Визначаємо критерій Нуссельта:

$$Nu_{\text{кр}} = 0,037 Re_B^{0,8} \cdot Pr_B^{0,43} = 0,037 \cdot (276,2)^{0,8} \cdot 6,99^{0,43} = 7,7$$

9.2.6. Тоді коефіцієнт тепловіддачі від культуральної рідини становить:

$$\alpha_B = \frac{Nu_B \cdot \lambda_B}{d_{\text{екв}}} = \frac{7,7 \cdot 0,599}{0,0186} = 248 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

9.3. Коефіцієнт теплопередачі:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_{\text{кр}}} + \frac{S}{\lambda_{\text{ст}}} + \frac{1}{\alpha_{\text{в}}}} = \frac{1}{\frac{1}{2410,9} + \frac{0,01}{16} + \frac{1}{248}} = 197,16 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

Де питома теплопровідність стінки ферментера зі сталі становить 16 Вт/м·К

9.4. Розраховуємо необхідну площу поверхні теплообміну:

$$F = \frac{Q}{K \cdot \tau_{\text{п}} \cdot \Delta t_{\text{ср}}} = \frac{72,6 \cdot 10^6}{197,16 \cdot 432000 \cdot 10} = 0,09 \text{ м}^2$$

9.5. Дійсна поверхня теплообміну:

$$F_{\text{д}} = H_{\text{с}} \cdot \pi \cdot D = (H_{\text{р}} - h_{\text{д}}) \cdot \pi \cdot D = (1,43 - 0,45) \cdot \pi \cdot 1,8 = 5,5$$

$$F_{\text{д}} > F$$

$$5,5 \text{ м}^2 > 0,09 \text{ м}^2$$

Умова теплообміну виконується. Обраний ферментер задовільняє потреби у теплообміні. Робимо висновок, що даний апарат забезпечить заданий температурний режим протягом роботи.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						156
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

Для забезпечення функціонування виробничого ферментеру з механічним перемішуючим пристроєм у вигляді пропелерної відкритої мішалки, підведенням поживного середовища, біологічного агенту, теплоносія у сорочку ферментера, тощо, необхідно встановлювати відцентрові насоси.

Наноси використовують для відкачування, транспортування, подачі або циркуляції рідини за рахунок механічної енергії. Для вибору насоса проводять розрахунок загального гідравлічного опору, який створює певний напір в сорочці:

$$\Delta P_{\text{заг}} = \Delta P_{\text{під}} + \Delta P_{\text{атм}} + \Delta P_{\text{вит}} = (\rho_v \cdot g \cdot H_{\text{сор}} + \Delta P_{\text{атм}}) \cdot 1,2 \quad (5.71)$$

де $\Delta P_{\text{під}}$ – втрата тиску на підйом води

$\Delta P_{\text{атм}}$ – атмосферний тиск

$\Delta P_{\text{вит}}$ – втрата напору на місцеві опори, зміни напрямку руху і тд, приймаємо 20%

$$\begin{aligned} \Delta P_{\text{заг}} &= (\rho_v \cdot g \cdot H_{\text{сор}} + \Delta P_{\text{атм}}) \cdot 1,2 = (998 \cdot 9,81 \cdot 1,5 + 101325) \cdot 1,2 \\ &= 139212,7 \text{ Па} \end{aligned}$$

$\rho_v = 998 \text{ кг/м}^3$ – густина води при температурі 20°C

$H_{\text{сор}}$ – висота сорочки. Оскільки розрахована висота рівня рідини в апараті складає 1,43 м, то доцільно взяти висоту сорочки 1,5 м.

Згідно з отриманим значенням гідравлічного опору знаходимо необхідну потужність насосу:

$$N_{\text{н}} = \frac{\Delta P_{\text{заг}} \cdot G_v}{1000 \cdot \rho_v \cdot \eta} = \frac{139212,7 \cdot 0,051}{1000 \cdot 998 \cdot 0,8} = 0,01 \text{ кВт} \quad (5.72)$$

Обираємо відцентровий насос Calpeda NM 1/AE потужністю 0,37 кВт.

Відцентрові насоси використовуються для транспортування рідин шляхом

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						157
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

перетворення кінетичної енергії обертання в гідродинамічну енергію потоку рідини. Обертальна енергія, як правило, передається від двигуна або електродвигуна.

Проте обирати насос треба спираючись також на фізико-хімічні властивості рідини, яка буде перекачуватись, тому обраний насос – це лише рекомендація.

Для очищенні повітря, яке поступає на аерацію, доцільно використовувати фільтри грубої очистки класу G з ефективністю E до 90%, а для високоефективної очистки – фільтри з ефективністю до 99,9995%. Стерилізуючими є фільтри класу H (HEPA) та U (ULPA). Фільтри HEPA забезпечують очищення з ефективністю E = 99-99,995%. Також доцільно використовувати фільтри на основі тканини Петрянова.

5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Будь-який персонал допускається до робочого місця лише у випадку проходження повного інструктажу з техніки безпеки та ознайомленням зі своїми посадовими обов'язками. Нормальна тривалість робочого часу працівників не може перевищувати 40 годин на тиждень. Разом з цим, підприємства і організації при укладенні колективного договору можуть встановлювати меншу норму тривалості робочого часу. Загальна тривалість щорічних основної та додаткових відпусток не може перевищувати 59 календарних днів, а для працівників, зайнятих на підземних гірничих роботах, – 69 календарних днів.

Оскільки на стадії виробничого біосинтезу найвища вірогідність порушити асептичність, то перед початком робочого дня працівники надягають спеціальний захисний одяг: халати, захисні окуляри та маски, шапочки та бахіли, які видаються на підприємстві і є одноразовими. Деякі працівники мають право замість бахіл носити змінне комфортне взуття. Одяг повинен бути закритий для уникнення потрапляння реагентів на шкіру. Окрім того необхідно пильнувати за дотриманням класу стерильності приміщення – А або В.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						158
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Небезпечні для персоналу виробничі фактори можуть бути різного характеру і включають [136]:

- Механічні фактори – удари, тиск, тертя, вібрації, шум, що можуть призвести до травм, захворювань опорно-рухової системи, погіршення слуху та інших проблем здоров'я.
- Хімічні фактори – токсичні речовини, які можуть викликати отруєння, подразнення шкіри, очей, дихальних шляхів, алергічні реакції, рак і інші захворювання.
- Біологічні фактори – мікроорганізми, які можуть викликати інфекційні захворювання, алергії.
- Фізичні фактори – електромагнітні поля, іонізуюче випромінювання, ультразвук, тепло, холод, які можуть викликати опіки, термічний та радіаційний стрес, порушення терморегуляції.
- Психологічні фактори – стрес, психоемоційне перенапруження, втома, депресія, які можуть викликати порушення психічного здоров'я.
- Ергономічні фактори – незручна поза, неправильне розташування робочого місця, неправильно підібраний інструмент і техніка роботи, які можуть викликати травми опорно-рухової системи, втому, стрес.

Для зменшення ризику виникнення негативних наслідків від дії небезпечних виробничих факторів важливо дотримуватися норм і правил з охорони праці, використовувати засоби індивідуального захисту, проводити регулярні медичні огляди [136].

Основні задачі Служби охорони праці (або іншого органу, який проводить перевірки щодо належності виробництва) спираються на ISO 9001 і полягають в організації проведення профілактичних заходів, спрямованих на усунення шкідливих і небезпечних виробничих факторів, запобігання нещасним випадкам на виробництві, професійним захворюванням та іншим випадкам загрози життю або здоров'ю працівників; вивчення та сприяння впровадженню у виробництво

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						159
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

досягнень науки і техніки, прогресивних і безпечних технологій, сучасних засобів колективного та індивідуального захисту працівників, контроль за дотриманням працівниками вимог законів та інших нормативно-правових актів з охорони праці, охорони навколишнього природного середовища та нормативних актів, що діють в межах підприємства; інформування та надання роз'яснень працівникам з питань охорони праці, охорони навколишнього природного середовища та пожежної безпеки [136].

Працівники Служби охорони праці мають проводити перевірки дотримання працівниками вимог нормативно-правових актів з охорони праці та охорони навколишнього природного середовища; проводити вступний інструктаж питань охорони праці з усіма новоприйнятими на постійну або тимчасову роботу працівниками та з працівниками, які перебувають у відрядженні на підприємстві і беруть безпосередню участь у виробничому процесі; вести облік та проводити аналіз причин виробничого травматизму, професійних захворювань, аварій на виробництві, заподіяної ними шкоди, а також інші функції, передбачені Нормативними актами підприємства [136].

Після аерації культуральної рідини на виході залишається велика кількість використаного повітря, яке необхідно очистити перед викидами в атмосферу або повторним використанням. Для цього його направляють на фільтри попередньої очистки для видалення крупних часток, ресивер для вловлювання вологи, тощо. У випадку повторного використання повітря його направляють на відповідну стадію допоміжних робіт, де воно проходить так само етапи стискання, фільтрацію тканинами Петрянова, тощо. Детальніше процес описаний в п. 4.2.

Закон "Про захист атмосферного повітря" запроваджує технічні стандарти щодо викидів та гранично допустимих викидів (ГДВ). Технічний стандарт викидів – це стандарт викидів шкідливих (забруднюючих речовин) у повітря, який встановлюється для джерел викидів, технологічних процесів, обладнання та

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						160
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

відображає гранично допустиму масу викидів шкідливих (забруднюючих речовин) в атмосферне повітря на одиницю виходу та інших показників.

Відповідно до закону про захист атмосферного повітря, викид забруднюючих речовин у повітря зі стаціонарного джерела дозволений відповідно до спеціального дозволу, що встановлює максимально дозвалені викиди та інші умови, що забезпечують захист атмосферного повітря [137].

Відходи та стічні води в даному випадку є продуктом підприємницької діяльності та можуть містити різноманітні забруднюючі речовини, які можуть бути небезпечними для навколишнього середовища та здоров'я людей, які з ними працюють або мешкають поруч.

Для фінального знезараження стічних вод, окрім очисник споруд у вигляді центрифуг та фільтрів, використовують споруди ультрафіолетового опромінення, а також обробку хлором протягом 30 хв та озонування [116].

Відповідно до вмісту різних забруднюючих речовин, відходи та стічні води можуть бути класифіковані як небезпечні або безпечні. Небезпечні відходи та стічні води містять речовини, які можуть бути токсичними, вибухонебезпечними, запальними або корозійними, і вимагають спеціальної обробки та зберігання. Безпечні відходи та стічні води містять речовини, які не є небезпечними для здоров'я людей та навколишнього середовища, та можуть бути перероблені або видалені у звичайному порядку. У технології виробництва цитрату кальцію не є присутніми небезпечні відходи.

Виробництво лимонної кислоти є екологічно безпечним процесом, оскільки він забезпечується збільшенням біомаси культури *A. niger* у ферментері, з подальшим виділенням і сушінням осаду цитрату кальцію, що проходить без використання агресивних хімічних компонентів, які необхідно відправляти на утилізацію. Вода, використана в процесі виробництва є сировиною, яку в подальшому можна використовувати повторно (після очищення) або ж передати на очисні споруди найближчого міста, інші відходи виробництва не є

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						161
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

агресивними розчинами, тому їх можна використовувати в переробній промисловості або утилізувати відповідно до встановлених законодавством норм та правил (стосується мийних та дезінфікуючих розчинів).

Відходи біотехнологічного виробництва є біологічно безпечними і розкладаються в природних умовах під дією редуцентів та фізико-хімічних впливів навколишнього середовища.

Утилізація відходів має проходити відповідно до нормативно-правових актів, що регулюють сферу поводження із відходами:

1. Закон України «Про відходи» (ЗУ № 187/98) від 05 березня 1998 року № 187/98-ВР;
2. Постанови Кабінету Міністрів України:
 - 2.1. Порядок ведення реєстру місць видалення відходів, затверджений постановою Кабінету Міністрів України, затверджений ПКМУ № 1216 від 03 серпня 1998 року;
 - 2.2. Порядок ведення реєстру об'єктів утворення, оброблення та утилізації відходів, затверджений постановою Кабінету Міністрів України, затверджений ПКМУ № 1360 від 31 серпня 1998 року;
 - 2.3. Порядок подання декларації про відходи, затверджений постановою Кабінету Міністрів України, затверджений ПКМУ № 118 від 18 лютого 2016 року;
3. Нормативно-правові акти міністерств та інших органів виконавчої влади, нормативні документи:

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						162
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВКИ

У дипломному проекті розроблено технологію отримання цитрату кальцію з використанням продуценту *A. niger*, що росте на середовищі з меляси.

1. Для виробництва кристалічного цитрату кальцію в якості промислового продуценту було обрано штам *Aspergillus niger* ВКІМ F - 722.

2. Було розглянуто біохімічні аспекти отримання попередника цитрату кальцію – лимонної кислоти та обрано метод виділення цільового продукту методом осадження за допомогою вапняного молока та подальшим сушінням.

3. Культивування проводимо глибинним суспензійним методом з активним підведенням аерації за допомогою барботера, та механічним перемішуючим пристроєм для вирівнювання градієнтів концентрації та темпартур культуральної рідини. Основні параметри культивування продуценту: температура $30 \pm 1^\circ\text{C}$, $\text{pH} < 2$, тиск 0,02-0,03 МПа, частота обертів тубінної мішалки 180 об/хв, аерація 0,6-0,7 м³/м³·хв, тривалість культивування – 5-10 діб.

4. Наведено основні методи отримання промислового продуцента та виділено найбільш ефективний спосіб обробки УФ-випромінюванням, який стимулює створення модифікованого штаму *Aspergillus niger* ВКІМ F - 722; складено технологічну схему даного методу, яка включає стадії активації музейної культури шляхом розчинення спор у 0,9%-ому розчині хлориду натрію з подальшим вирощуванням колоній на середовищі Чапека у чашках Петрі та їхнім опроміненням УФ-променями протягом 18 хв на відстані 20 см від лампи.

5. Проаналізовано необхідні характеристики сировини та матеріалів, які використовуються при виробництві цитрату кальцію, а також описано

					ДП БТ-9122.00 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Висновки	Стадія	Арк.	Акрушів
Розроб.		Шопова З. С.					163	177
Конс.		Шибєцький В. Ю.						
Керівн.		Дзигун Л. П.					КПІ ім. І. Сікорського	
Затв.							ФБТ	

фізико-хімічні показники дієтичної добавки відповідно до діючих Державних стандартів. Складено технологічну та апаратурні схеми виробництва цитрату кальцію.

6. Розраховано та спроектовано виробничий ферментер для промислового отримання цитрату кальцію з наступними характеристиками: ферментер з номінальним об'ємом $V_p=5 \text{ м}^3$, еліптичними днищем та кришкою, діаметром апарату $D = 1800 \text{ мм}$, площею поверхні теплообміну сорочки $F_p = 12 \text{ м}^2$, діаметром вала мішалки $d_v = 80 \text{ мм}$. Ферментер містить 11 штуцерів, 4 відбивні перегородки, пропелерну мішалку та барботер.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						164
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. П'янкова О. О., Васильченко О. А. Біотехнологічні аспекти отримання лимонної кислоти. Київ, 2012. С. 6.
2. М., М. М. Р. Synthesis of Citric Acid . Nature. 1880. P. 585–586.
doi:10.1038/022585f0
3. Singh R. et al. Organic acids: An overview on microbial production. Int. J. Adv. Biotechnol. Res. 2017. Vol. 8, № 1. P. 104–111.
4. Муратова Е.И., Зюзина О.В., Шуняева О.Б. Биотехнология органических кислот и белковых препаратов: учебное пособие. Тамбов: Тамб. гос. техн. ун-та, 2007. 80 с.
5. Liaud N. et al. Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. Fungal Biol. Biotechnol. 2014. Vol. 1, № 1. 1.
6. Clark D., Pazdernik N. Biotechnology. 2-nd ed. Elsevier, 2016. 850 p.
7. Khan I. et al. Microbial organic acids production, biosynthetic mechanism and applications -Mini review. Indian J. Geo Mar. Sci. 2017. Vol. 46, № 11. P. 2165–2174
8. Li D.-W. Cham. Biology of Microfungi: Springer International Publishing, 2016. 650 p.
9. Dezam A.P.G. et al. Microbial production of organic acids by endophytic fungi. Biocatal. Agric. Biotechnol. 2017. Vol. 11. P. 282–287.
10. Soccol CR, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Pandey A. New perspectives for citric acid production and application. Food Technology & Biotechnology. 2016. P. 141–149.
11. Bauweleers HMK, Groeseneken DR, Van Peij NNME. Genes useful for the industrial production of citric acid. 2014.

					<i>ДП БТ-9122.00 ПЗ</i>		
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>		<i>Шопова З. С.</i>			<i>Список використаної літератури</i>	<i>Стадія</i>	<i>Арк.</i>
<i>Конс.</i>		<i>Шидецький В. Ю.</i>					<i>177</i>
						<i>КПІ ім. І. Сікорського</i>	
<i>Керівн.</i>		<i>Дзигун Л. П.</i>				<i>163</i>	
<i>Затв.</i>						<i>ФБТ</i>	

12. J. Pitt. A laboratory guide to common *Penicillium* species. 1985. doi:10.2307/3807483.
13. Méar J.-B. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interactions: More than an opportunistic criminal association. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2013. № 4 (43). C. 146–151.
14. Kwamin F. Distribution of *Candida* species among HIV-positive patients with oropharyngeal candidiasis in Accra, Ghana. *Journal of infection in developing countries*. 2013. № 1 (7). C. 41.
15. Hoog G.S. de, Guarro J. G.J. et al. Atlas of clinical fungi. 2011.
16. Зверев В.В., Бойченко М.Н. Б.А.С. Основы микробиологии и иммунологии. 2014. 368 с.
17. Yarrowia Lipolytica. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. 2011.
18. Bilge Sayın Börekçi, Güzin Kaban, Mükerrerem Kaya. Citric Acid Production of Yeasts: An Overview. 2021. P. 13.
19. Thomas P West. Citric acid production by *Candida* species grown on a soy-based crude glycerol. *Prep Biochem Biotechnol*. 2013.
20. Dashen M, Ado SA, Ameh J, Amapu T, Zakari H. Screening and improvement of local isolates of *Aspergillus niger* for citric acid production. *Bayero J Pure Appl Sci*. 6:105–111. 2014.
21. Max B, Salgado JM, Rodríguez N, Cortés S, Converti A, Domínguez JM. Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010.
22. Thangavelu Rameshcorresponding. Murugaiyan Kalaiselvam. An Experimental Study on Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Using *Gelidiella acerosa* as a Substrate. *Indian J Microbiol*. 2011.
23. R.A. Samson, C.M. Visagie, J. Houbraken, S.-B. Hong, V. Hubka. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycology*. 2014.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		166

24. Carlile MJ, Watkinson SC. The fungi. *Academic Press Inc.* 1994. P. 1-482.
25. Virag A, Harris SD. The Spitzenkorper: a molecular perspective. *Mycology Res.* 2010.
26. Basil A. AbbasM. H. KhudorM. H. KhudorRaed Najeeb AlkhursanRaed Najeeb Alkhursan. Polutry feed fungi a practical guide. 2021.
27. Diano, A. Physiology of *Aspergillus niger* under oxygen limitation. *DTU Library.* 2007. P. 140.
28. И. Хиггинс, Д. Бест, Дж. Джонс. Биотехнология. 1988. - 479 с.
29. Ілюстративний матеріал з Вікіпедія. URL: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus_niger_Micrograph.jpg
30. Кузнецов А. Ф. Ветеринарная микология. 2018. С. 356.
31. Ілюстративний матеріал. Хмельницький національний університет. URL: https://de.khnu.km.ua/dn/k_default.aspx?M=k0861&T=03&lng=1&st=0
32. Levin, A.M., de Vries, R.P., Conesa, A., de Bekker, C., Talon, M., Menke, H.H., et al. Spatial differentiation in the vegetative mycelium of *Aspergillus Niger*. *Eukaryot Cell.* 2007. P. 2311– 2322.
33. Paul Daly, Mao Peng, Hugh D. Mitchell, Young-Mo Kim, Charles Ansong. Colonies of the fungus *Aspergillus niger* are highly differentiated to adapt to local carbon source variation. *Environmental Microbiology.* 2019. V:22, Issue 3 p. 1154-1166.
34. de Vries, R.P., Jansen, J., Aguilar, G., Pařenicová, L., Benen, J.A.E., Joosten, V., et al. Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus Niger*. 2002. P. 41– 47.
35. Andersen, MR. Порівняльна геноміка *Aspergillus niger* ATCC 1015, що продукує лимонну кислоту, і CBS 513.88, що продукує фермент. *Genome Res .* 2021 , 885–897.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		167

36. Miia R. Mäkelä, María Victoria Aguilar-Pontes, Diana van Rossen-Uffink, Mao Peng & Ronald P. de Vries. The fungus *Aspergillus niger* consumes sugars in a sequential manner that is not mediated by the carbon catabolite repressor CreA. 2018.
37. Meti RS, Ambarish S, Khajure P. Enzymes of ammonia assimilation in fungi: an overview. Rec. Res. Sci. Technol. 2021. P. 28–38.
38. Marzluf GA. Regulation of sulfur and nitrogen metabolism in filamentous fungi. Annu. Rev. Microbiol. 1993. P. 47-55.
39. Johnstone IL, McCabe PC, Greaves P, Gurr SJ, Cole GE, Brow MA, Unkles SE, Clutterbuck AJ, Kinghorn JR, Innis MA. Isolation and characterization of the crnA-niiA-niaD gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. Gene 1990. P. 181–192.
40. Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. Biotech. Advan. – 2007. Vol. 25, № 3. – P. 244-263.
41. Yanagita T. Biochemical aspects on the germination of conidiospores of *Aspergillus niger*. Arch. Mikrobiol. 1957. P. 329–344..
42. Abdel-Rahim AM, Arbab HA. Nutrient requirements in germination of conidiospores of *Aspergillus niger* V. Tieghen. Mycopathologia 1985. P. 111–113.
43. D. J. D. Nicholas. A. H. Fielding. The Use of *Aspergillus Niger* (M)* for the Determination of Magnesium, Zinc, Copper and Molybdenum Available in Soils to Crop Plants. Journal of Horticultural Science. Volume 26 Issue 2. 1951.
44. A. Diano, J. Peeters, J. Dynesen, J. Nielsen. Physiology of *Aspergillus niger* in oxygen-limited continuous cultures: Influence of aeration, carbon source concentration and dilution rate. *Biotechnology and Bioengineering*. 2009. Volume 103, Issue 5 p. 956-965.

45. Wongwicharn A, McNeil B, and Harvey LM. Effect of oxygen enrichment on morphology, growth, and heterologous protein production in chemostat cultures of *Aspergillus niger* B1- D. *Biotechnol Bioeng* 1999. P. 416-424.
46. Kalidas S. Food biotechnology. 2006. P. 1989.
47. B. Kristiansen, M. Matthey, J. Linded . Citric acid biotechnology. Taylor & Francis. 1999. P. 189.
48. Yu-Long ChangJun-Hsien. WangJun-Hsien Wang. A Study of the Optimal Condition for the Growth of *Aspergillus niger* (BCRC 31494, ATCC 10864). Conference & International Symposium on Biotechnology and Bioengineering. 2018.
49. Ілюстративний матеріал. Студфайл. URL: <https://studfile.net/preview/9002837/page:6/>
50. Ka-Lai Pang, Michael Wai-Lun Chiang, Sheng-Yu Guo, Chi-Yu Shih. Growth study under combined effects of temperature, pH and salinity and transcriptome analysis revealed adaptations of *Aspergillus terreus* NTOU4989 to the extreme conditions at Kueishan Island Hydrothermal Vent Field, Taiwan. PLoS One. 2020.
51. Richard JL. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—an overview. *Int. J. Food Microbiol.* 2007. P. 3–10.
52. Pitt JJ, et al. Mycotoxins of *Aspergillus niger*. *Toxins of Plant Pathogens*. 1999. P. 67-78.
53. Abdel-Kareem, O. Monitoring, controlling and prevention of the fungal deterioration of textile artifacts in the Museum of Jordanian heritage. *Mediterr. Archeol. Archaeom.* 2010. P. 85–96.
54. Gulzar, T., Huma, T., Jalal, F., Iqbal, S., Abzar, S., Kiran, S., et al. Bioremediation of synthetic and industrial effluents by *Aspergillus niger* isolated from contaminated soil following a sequential strategy. 2017.
55. Person, A.K.; Chudgar, S.M.; Norton, B.L.; Tong, B.C.; Stout, J.E. *Aspergillus niger*: An unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. *J. Med. Microbiol.* 2010. P. 834–838.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						169
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

56. Державна фармакопея України. Доповнення 2.. Харків, 2004. 594 с.
57. John Pratt. Citric acid: structure, properties, production, and applications. Warbletoncouncil. 2021.
58. Биотехнология микробного синтеза / под ред. М.Е. Беккера. – Рига : Изд-во "Зинатне", 1980. – 350 с
59. Carlos R.S. New perspectives for citric acid production and application J. Food Technol. Biotechnol. 2006. Vol. 44, № 2. P. 141-150.
60. Käppeli O, Müller M, Fiechter A. Chemical and structural alterations at the cell surface of *Candida tropicalis*, induced by hydrocarbon substrate. J Bacteriol. 1978. P. 952–958.
61. Habison A, Kubicek CP, Rohr M. Partial purification and regulatory properties of phosphofructokinase from *Aspergillus niger*. Biochem J. 1983. P. 669–676.
62. Rohr M, Kubicek CP. Regulatory aspects of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. Process Biochem. 1981. P. 34–37.
63. Rubio MC, Maldonado MC. Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. Current Microbiology. 1995. P. 80–83
64. Steinböck F, Choojun S, Held I, Roehr M, Kubicek CP. Characterization and regulatory properties of a single hexokinase from the citric acid accumulating fungus *Aspergillus niger*. Biochim Biophys Acta, Gen Subj. 1994. P. 215–223.
65. La Nauze JM. Aconitase and isocitric dehydrogenases of *Aspergillus niger* in relation to citric acid production. J Gen Microbiol. 1966. P. 73–81.
66. Jernejc K, Cimerman A, Perdih A. Composition of *Aspergillus niger* mycelium during growth on productive and unproductive substrates. J Biotechnol. 1992. P. 341–348.
67. Pau Loke Show,ORCID Icon,Kehinde Opeyemi Oladele,Qi Yan Siew,Fitri Abdul Aziz Zakry,John Chi-Wei Lan &Tau Chuan Ling. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. 2015. P. 271-283.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		170

68. Aghdam MG, Taherzadeh M. Production of citric acid by solid state fermentation. J Biotechnol. 2008. P. 464–495.
69. Puneekar N, Vaidyanathan C, Appaji Rao N. Mechanisms of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. J Sci Ind Res. 1984. P. 398–404.
70. Ratledge C, Kristiansen B. Basic biotechnology. Cambridge University. 2001.
71. Matthey M. Citrate regulation of citric acid production in *Aspergillus niger*. FEMS Microbiol Lett. 1977. P. 71–74.
72. Arzumanov TE, Shishkanova NV, Finogenova TV. Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. Appl Microbiol Biotechnol. 2000. P. 525–529.
73. Guebel DV, Darias NVT. Optimization of the citric acid production by *Aspergillus niger* through a metabolic flux balance model. Electron J Biotechnol. 2001. P. 1–17.
74. Anastassiadis S, Rehm HJ. Citric acid production from glucose by yeast *Candida oleophila* ATCC 20177 under batch, continuous and repeated batch cultivation. Electron J Biotechnol. 2006. P. 26–39.
75. Panda T, Kundu S, Majumdar SK. Studies on citric acid production by *Aspergillus niger* using treated Indian cane molasses. J Microbiol. 1984. P. 61–66.
76. ДСТУ ГОСТ 54538-2011 Додатки харчові. Кальцію цитрат Е333(iii). Технічні умови.
77. Спосіб получения цитрата кальция: пат. RU2261915C2. Опубліковано 10.10.2005.
78. Purification method of citric acid fermentation broth. пат. Китай CN101648864B. 2009.
79. НДТ МОЗ України. Кальцій цитрат. URL: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=7744#:~:text=Показання%20для%20застос>

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		171

ування.&text=Захворювання%20шкіри%2C%20гепатити%20різного%20походження,%2C%20знижене%20зсідання%20крові%2C%20нефрити

80. Calcium Catrate. DrugBank.

[URL:https://go.drugbank.com/drugs/DB11093](https://go.drugbank.com/drugs/DB11093)

81. Brini, Marisa; Ottolini, Denis; Calì, Tito; Carafoli, Ernesto. Calcium in Health and Disease. Metal Ions in Life Sciences. Dordrecht: Springer Netherlands. 2013. с. 81–137.

82. Saladin, Kenneth S.; Miller, L. Cellular Form and Function. Anatomy&Physiology: The Unity of Form and Function (вид. 3). New York: The McGraw-Hill Companies, Inc. 2004 с. 102.

83. Andersen, M.R.; Salazar, M.P.; Schaap, P.J.; van de Vondervoort, P.J.; Culley, D.; Thykaer, J.; Frisvad, J.C.; Nielsen, K.F.; Albang, R.; Albermann, K. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. 2011.

84. Lubna; Asaf, S.; Hamayun, M.; Gul, H.; Lee, I.-J.; Hussain, A. *Aspergillus niger* CSR3 regulates plant endogenous hormones and secondary metabolites by producing gibberellins and indoleacetic acid. J. Plant Interact. 2018. P. 100–111.

85. Qadir, M.; Hussain, A.; Shah, M.; Lee, I.J.; Iqbal, A.; Irshad, M.; Sayyed, A.; Ahmad, A.; Hamayun, M. Comparative assessment of chromate bioremediation potential of *Pantoea conspicua* and *Aspergillus niger*. J. Hazard. Mater. 2021. P. 424.

86. Lubna, Sajjad Asaf, Rahmatullah Jan, Abdul Latif Khan, Saqib Bilal, Saleem Asif, Ahmed Al-Harrasi, Kyung-Min Kim. Unraveling the Genome Sequence of Plant Growth Promoting *Aspergillus niger* (CSR3) Provides Insight into the Synthesis of Secondary Metabolites and Its Comparative Genomics. 2022.

87. Debets, F., Swart, K., Hoekstra, R. F., & Bos, C. J. Genetic maps of eight linkage groups of *Aspergillus niger* based on mitotic mapping. Current Genetics, 1993. P. 47–53.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						172
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

88. Hartel, Daniel L. and Maryellen Ruvolo. Genetics: Analysis of Genetics and Genomes. Burlington: Jones & Bartlett. 2012.

89. Zhenyu Tong, Xiaomei Zheng, Yi Tong, Yong-Cheng Shi, Jibin Sun. Systems metabolic engineering for citric acid production by *Aspergillus niger* in the post-genomic era. *Microbial Cell Factories*. 2019.

90. Штамм гриба *Aspergillus niger* – продуцент лимонной кислоты: пат. Ru2088665C1. 1997.

91. Parvez, S., Rajoka, M.I., Ahmed, M.N., Latif, F., Shahid, R., Malik, K.A. Citric acid production from sugarcane molasses by 2- deoxyglucose-resistant mutant strain of *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol*. 1998. P. 59–62.

92. Ikram-ul, H., Ali, S., Qadeer, M. A., & Iqbal, J. Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. *Bioresource Technology*. 2004. P. 125–130.

93. Sadia Javed, M. Asgher, M. Asgher, Munir A. Sheikh, Haq Nawaz. Strain Improvement Through UV and Chemical Mutagenesis for Enhanced Citric Acid Production in Molasses-Based Solid State Fermentation. *Food Biotechnology*. 2010.

94. Wei Hu, Jing Liu, Ji-hong Chen, Shu-yang Wang, Dong Lu, Qing-hua Wu, Wen-jian Li. A mutation of *Aspergillus niger* for hyper-production of citric acid from corn meal hydrolysate in a bioreactor. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*. 2014.

95. Kihachiro Ogawa, Mikio Tsuchimochi, Katsuyuki Taniguchi, Seiichiro Nakatsu. Interspecific Hybridization of *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* and *Aspergillus niger* by Protoplast Fusion. *Agricultural and Biological Chemistry*. 2014. P. 9.

96. Wang L, Cao Z, Hou L, Yin L, Wang D, Gao Q, Wu Z, Wang D. The opposite roles of *agdA* and *glaA* on citric acid production in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016. P. 791–803.

97. Chen H, He XH, Geng HR, Liu H. Physiological characterization of ATP-citrate lyase in *Aspergillus niger*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2014. P. 721–731.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						173
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

98. Meijer S, Nielsen ML, Olsson L, Nielsen J. Gene deletion of cytosolic ATP: citrate lyase leads to altered organic acid production in *Aspergillus niger*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009. P. 1275–1280.
99. de Jongh WA, Nielsen J. Enhanced citrate production through gene insertion in *Aspergillus niger*. *Metab Eng*. 2008. P. 87–96.
100. Panneman H, Ruijter GJ, van den Broeck HC, Visser J. Cloning and biochemical characterisation of *Aspergillus niger* hexokinase—the enzyme is strongly inhibited by physiological concentrations of trehalose 6-phosphate. *Eur J Biochem*. 1998. P. 223–232.
101. Arisan-Atac I, Wolschek MF, Kubicek CP. Trehalose-6-phosphate synthase A affects citrate accumulation by *Aspergillus niger* under conditions of high glycolytic flux. *FEMS Microbiol Lett*. 1996. P. 77–83.
102. Legisa M, Mattey M. Changes in primary metabolism leading to citric acid overflow in *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett*. 2007. P. 181–190.
103. Meijer, M.; Houbraken, J.; Dalhuijsen, S.; Samson, R.; De Vries, R. Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black aspergilli. *Stud. Mycol*. 2011. P. 19–30.
104. Capuder M, Solar T, Bencina M, Legisa M. Highly active, citrate inhibition resistant form of *Aspergillus niger* 6-phosphofructo-1-kinase encoded by a modified pfkA gene. *J Biotechnol*. 2009. P. 51–57.
105. Karaffa L, Kubicek CP. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003. P. 189–196.
106. Wallrath J, Schmidt M, Weiss H. Concomitant loss of respiratory-chain NADH-ubiquinone reductase (complex-i) and citric-acid accumulation in *Aspergillus-niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1991. P. 76–81.
107. Xianli Xue, Futi Bi, Boya Liu, Jie Li, Lan Zhang, Jian Zhang, Qiang Gao, Depei Wang. Improving citric acid production of an industrial *Aspergillus niger*

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						174
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

CGMCC 10142: identification and overexpression of a high-affinity glucose transporter with different promoters. *Microb Cell Fact.* 2021.

108. Isato Yoshioka, Kohtaro Kirimura. Rapid and marker-free gene replacement in citric acid-producing *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L by the *CRISPR/Cas9* system-based genome editing technique using DNA fragments encoding sgRNAs. *J Biosci Bioeng.* 2021.

109. Lotfy, W., Ghanem, K., Elhelow, E. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. *Bioresource Technology.* 1998. P. 3464–3469.

110. El-Abyad, M., Hamissa, F., Gad, A. Treatment of beet molasses for citric acid production by a potent strain of *Aspergillus niger* van Tieghem. *Bioresour. Technol.* 1992. P. 191–197.

111. Mayilvahanan, D., Annadurai, G., Raju, V., Chellapandian, M., Krishnan, M.R., Jayaraman, K. Citric acid production: strategies for reduction in cycle time for targeted yields. *Bioprocess Eng.* 1996. P. 323–326.

112. Wang, J. Improvement of citric acid production by *Aspergillus niger* with addition of phytate to beet molasses. *Bioresour. Technol.* 1998. P. 243–245.

113. Поводзинський В.М. Основи проектування: Конспект лекцій для студ. спец. 6.092900 “Промислова біотехнологія” та 6.092902 “Біотехнологія біологічно активних речовин”, напряму 0929 “Біотехнологія” ден. форми навч. – К.: НУХТ, 2005. – 90 с.

114. Альперт Л.З. Основи проектування хімічних виробництв: Навч. посібник для технікумів. – Вид. 2-ге, 1976. – 272 с.

115. Кошкелева О. Які методи застосовують для очищення стічних вод молокозаводів? *ECOBUSINESS. Екологія підприємства.* №8. 2020

116. Воронов Ю. В. Водоотведение и очистка сточных вод 2006. 702 с.

117. Romo A.E. Difco & BBL Manual Manual of Microbiological Culture Media. 2-nd ed. / ed. Zimbro M. 2009. 625 p.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						175
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

118. Штамм гриба *Aspergillus niger* - продуцент лимонной кислоты: пат. RU2192460C2. 2000.

119. Матвеев В.Е. Основы асептики в технологии чистых микробиологических препаратов. Легкая и пищевая пром-сть, 1981. 312 с.

120. Кузубова Л.И. Производство кормового микробного белка. Экологические проблемы. Новосибирск: ГПНТБ СО АН, 1999. 114 с.

121. Методичні рекомендації органам місцевого самоврядування, суб'єктам господарювання та громадянам по проведенню заходів з дезінфекції для запобігання захворювання на COVID-19 / під ред. Головного управління Держпродспоживслужби у Вінницькій області. Вінниця, 2020. 7 с.

122. Смирнов В.А. Пищевые кислоты (лимонная, молочная, винная). Легкая и пищевая пром-сть, 1983. 264 с.

123. Бондар І. В., Гуляєв В. М., Винокурова Т. К. Стандартні терміни та визначення, які застосовуються в біотехнології. 2006. С. 18.

124. Л. Н. Брагінський, В. І. Бегачев, В. М. Барабаш Перемішування в рідких середовищах. - Хімія, 1984. - 332 с.

125. Перемішування в харчових технологіях: сутність, призначення, основне устаткування. URL: https://studopedia.su/16_12387_peremishuvannya.html

126. Перемішування в харчових технологіях. Студфайл. URL: <http://https://studfile.net/preview/5194235/page:16/>

127. В. Н. Стабніков Проектування процесів та апаратів харчових виробництв. - 2-ге изд. - Київ: Вища школа, 1982. - 198 с.

128. В. С. Білецького Мала гірнича енциклопедія : у 3 т.: Донецьк, 2007. 670 с. ISBN 57740-0828-2.

129. Ісламгуров І. Р., Шагівалєєв І. В., Мухачев С. Г., Валєєва Р. Т., Федорова О. В. Ерліфтний ферментер для біотехнологічних процесів. 2017. С. 3.

130. Бикова В. А. Процеси та апарати біотехнології: ферментаційні апарати. 2005. С. 278.

					ДП БТ-9122.00 ПЗ	Арк.
						176
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

131. ГОСТ 9931-85 Корпуса цилиндрические стальных сварных сосудов и аппаратов. Типы, основные параметры и размеры.

132. ГОСТ 6533-78 Днища эллиптические отбортованные стальные для сосудов, аппаратов и котлов.

133. Дитнерський Ю.І. Процеси та апарати хімічно технології., 1995. 368 с.

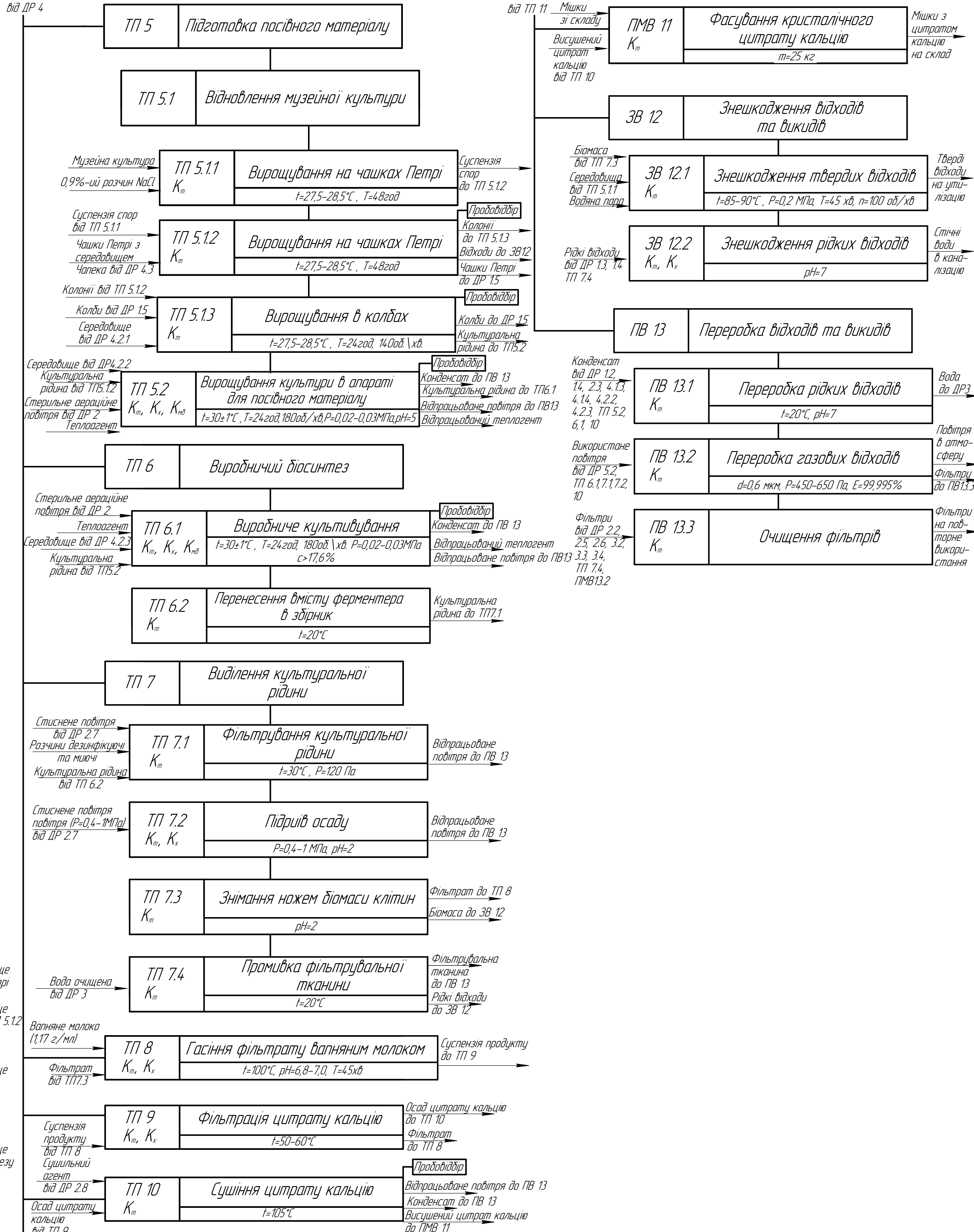
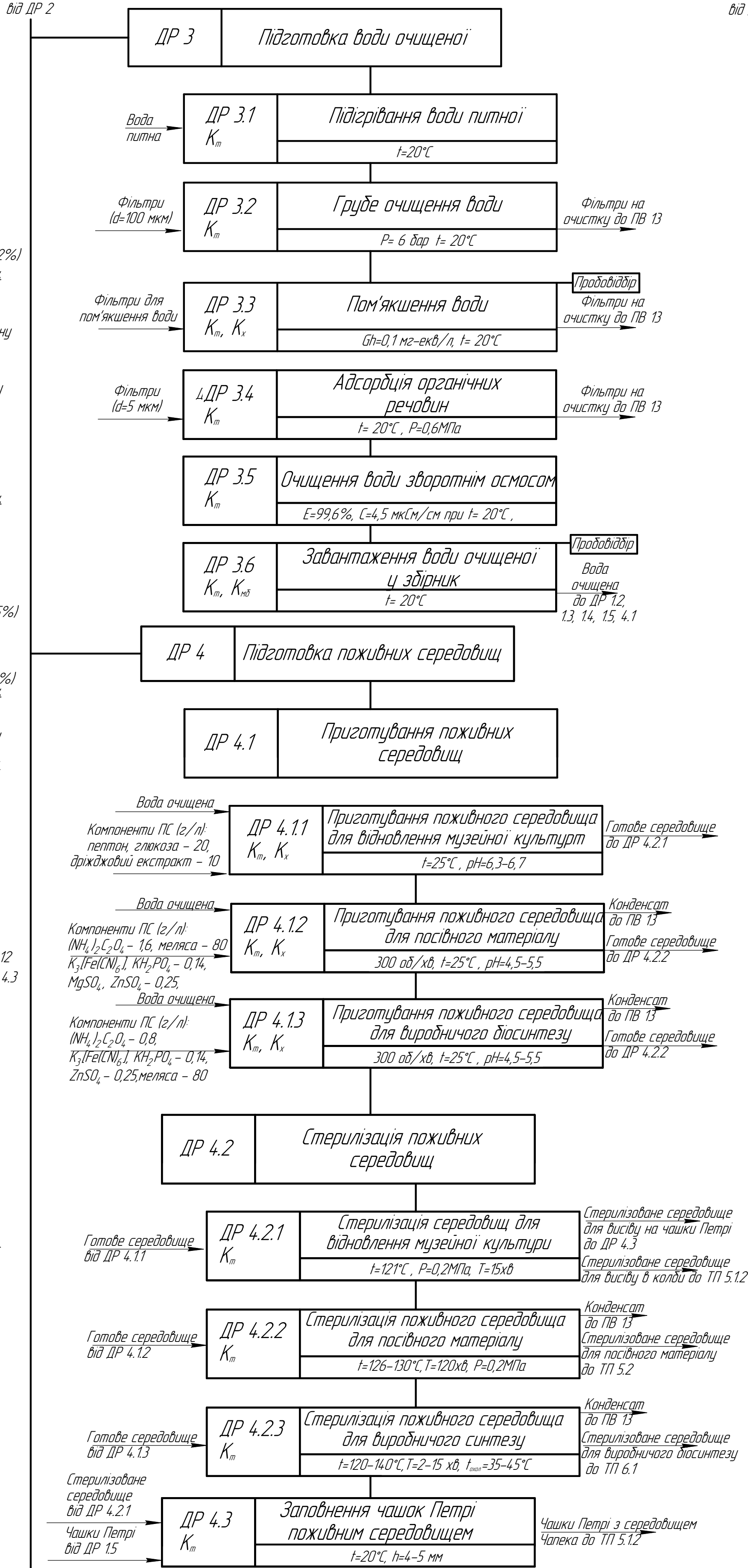
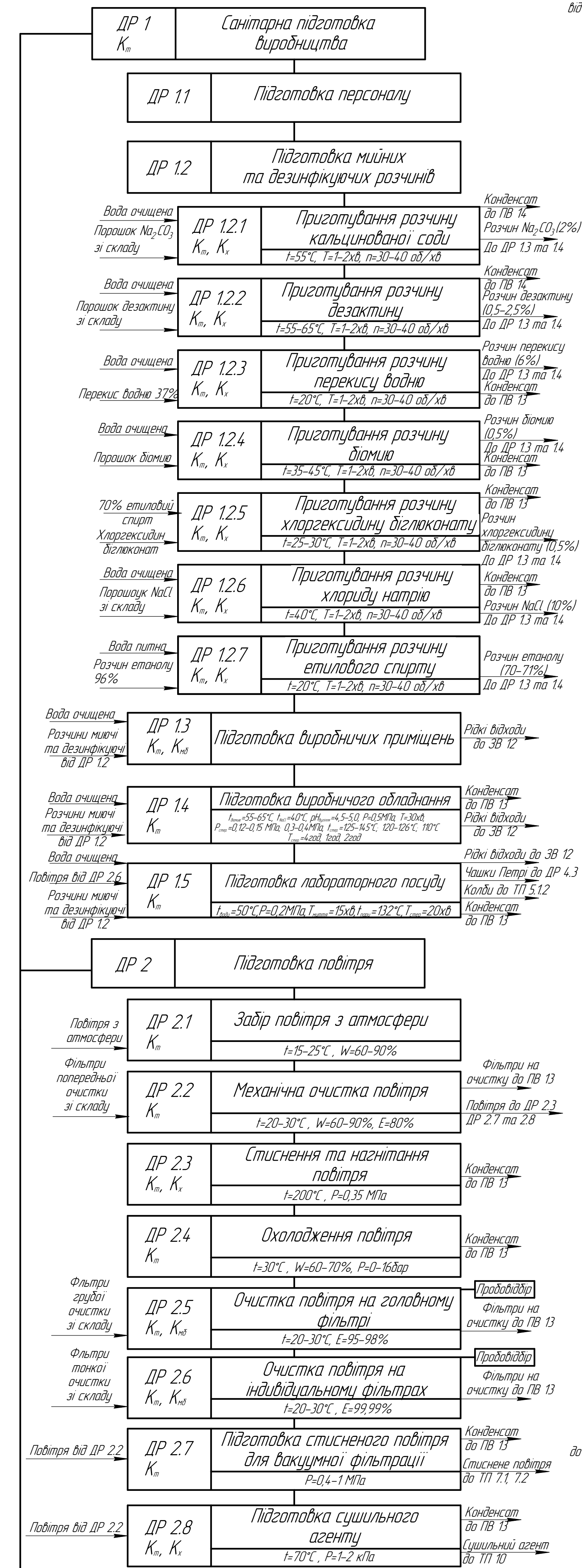
134. Гальперін Н. І. Основні процеси та апарати хімічної технології. Книга перша. - Хімія, 1981. 384 с.

135. Штербачек З., Тауск П. Перемішування в хімічній промисловості. Прага: 1963. 384 с.

136. Фарма Старт, Acino Group. European Business Association. URL: <https://eba.com.ua/member/tov-farma-start-kompaniya-asino-grup/>

137. Закон «Про охорону праці». Режим доступу URL: <http://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2694->

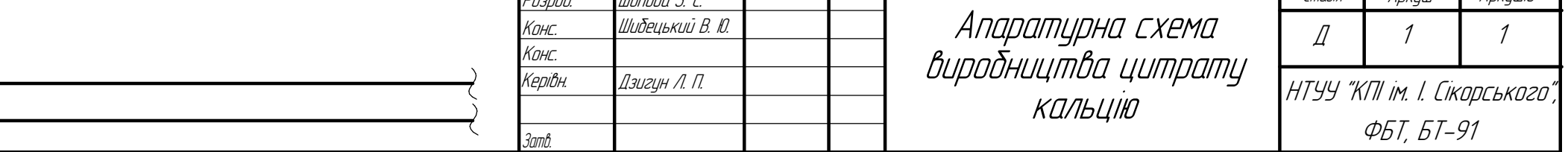
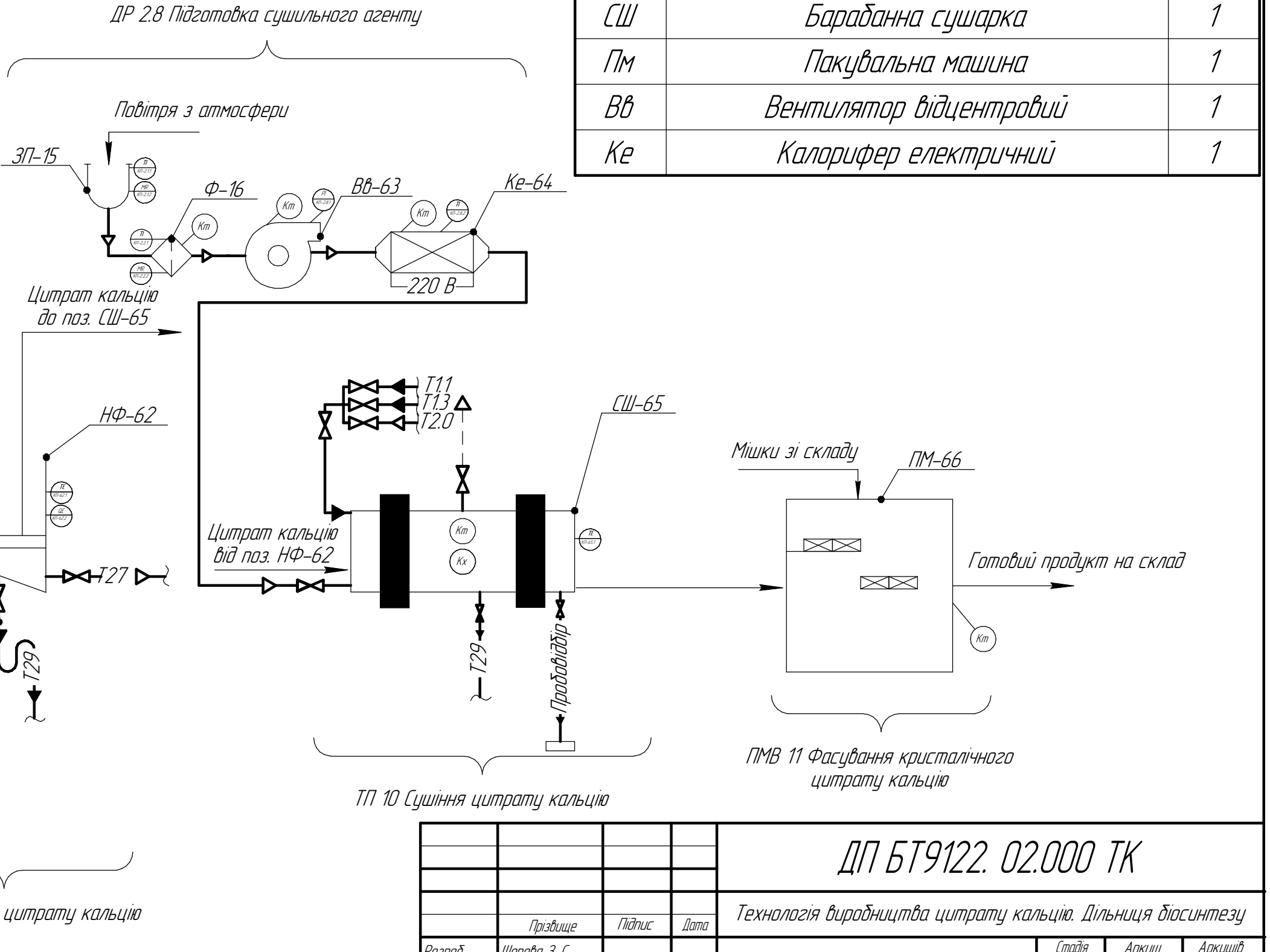
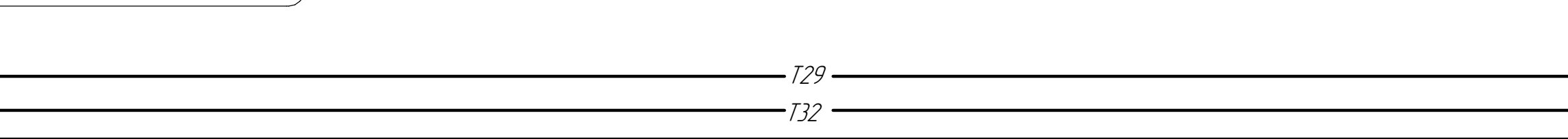
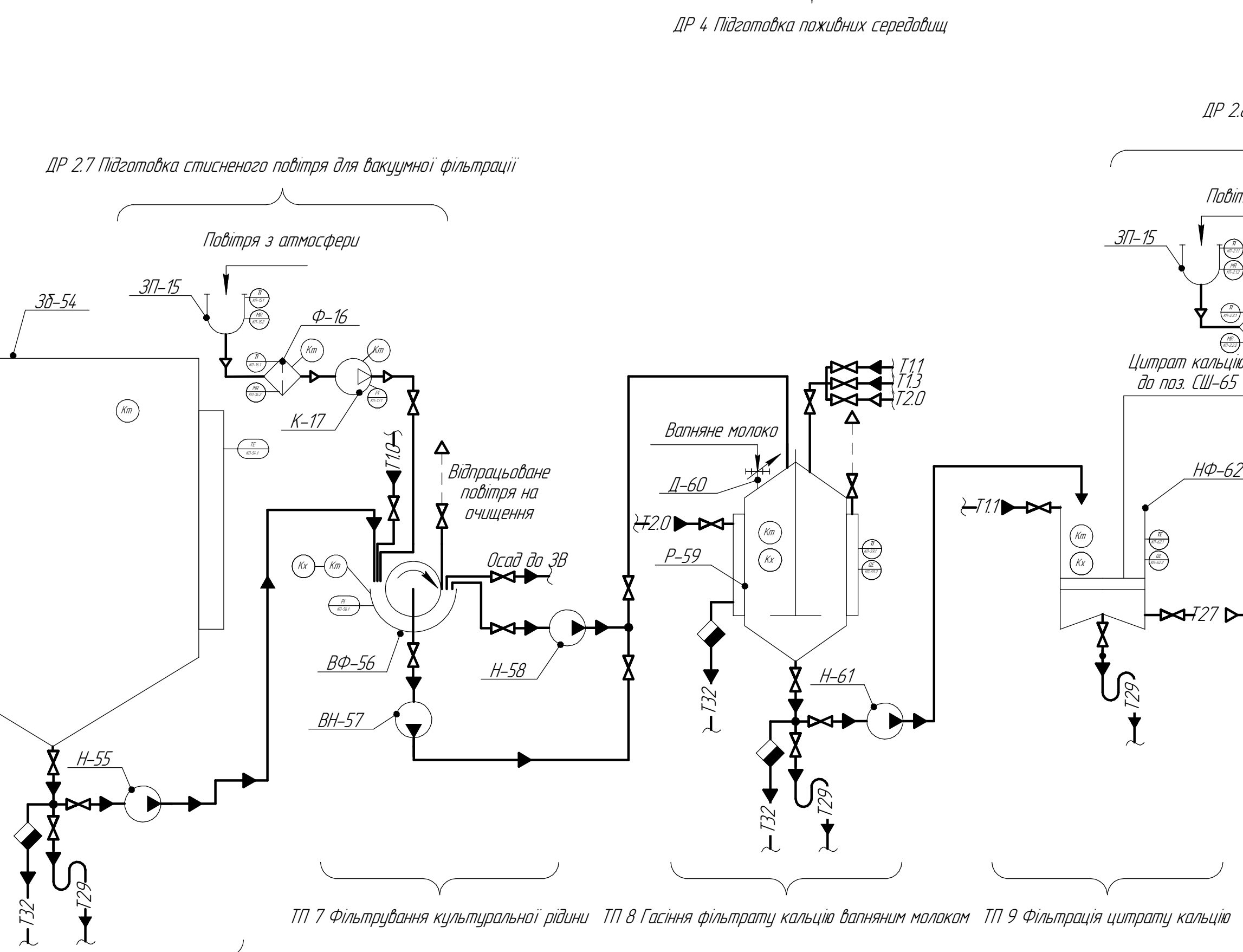
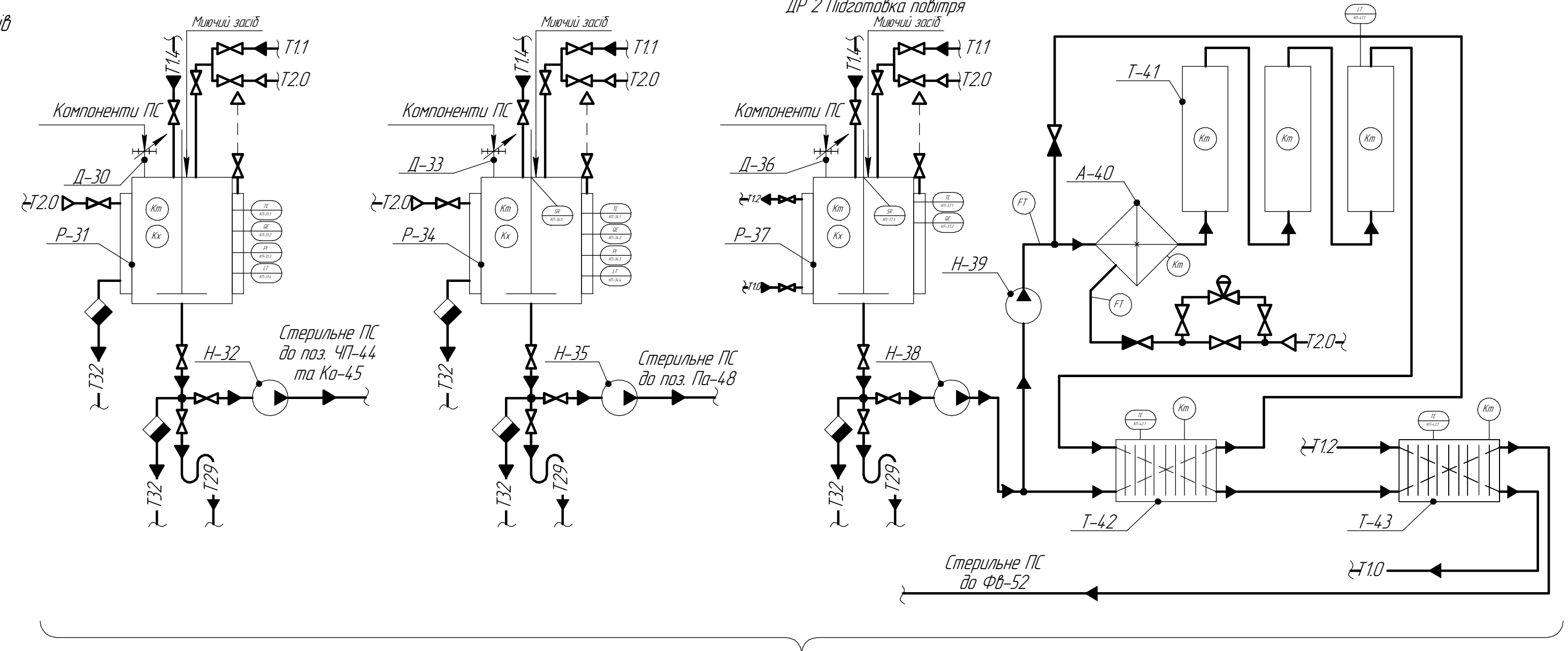
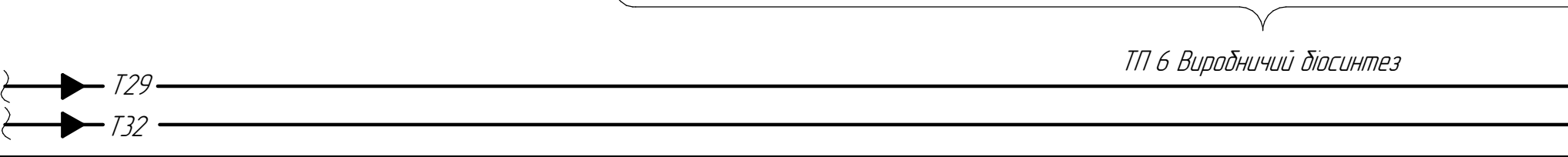
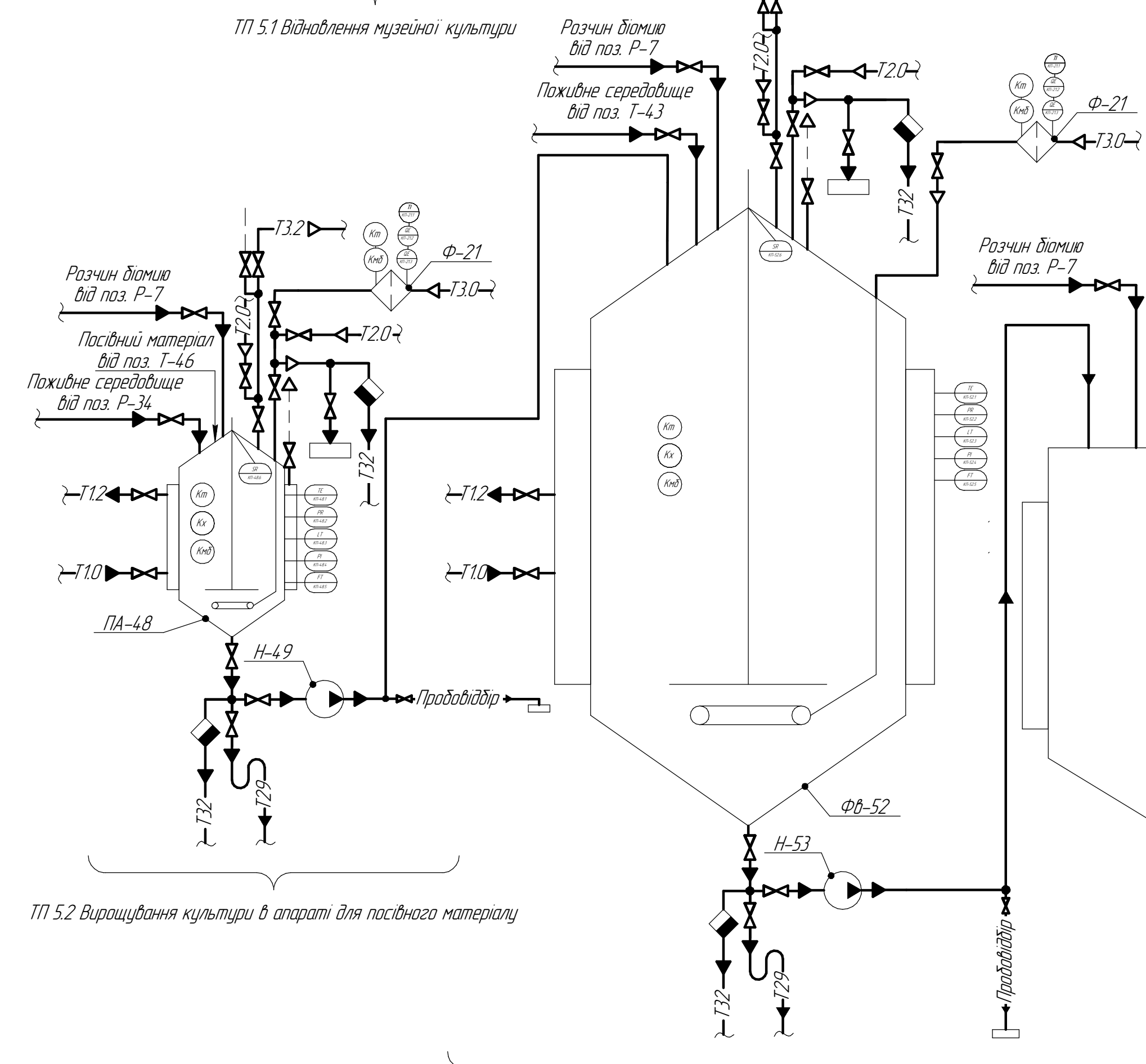
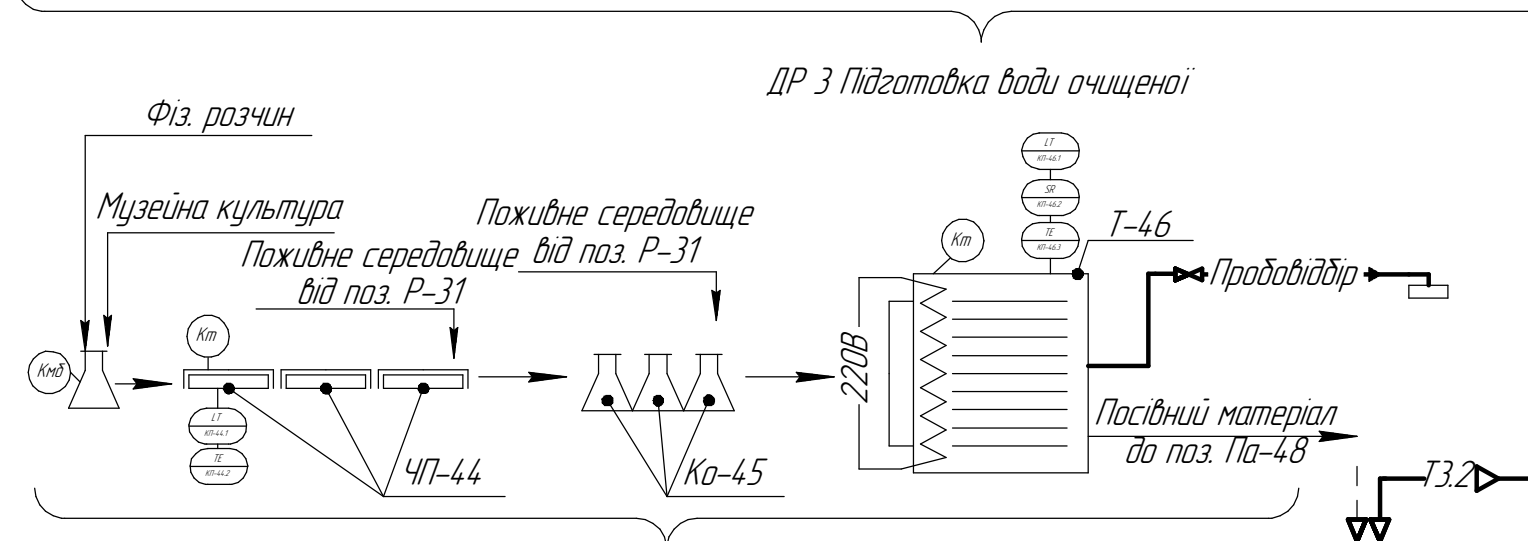
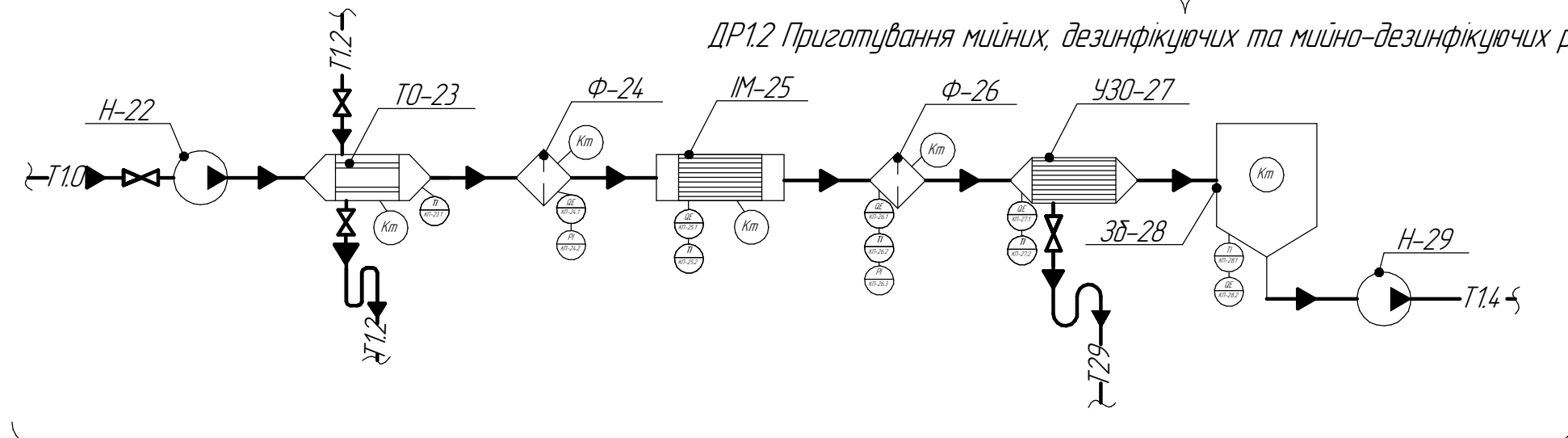
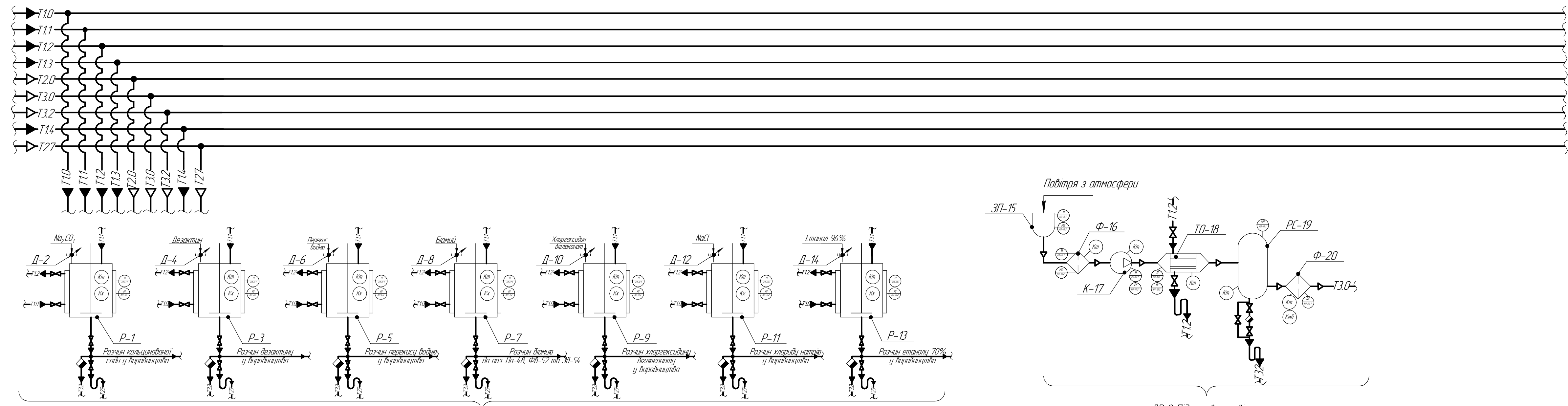
					<i>ДП БТ-9122.00 ПЗ</i>	Арк.
						177
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



до ДР 3

до ПМВ 11

				ДП БТ9122. 01.000 ТК			
				Технологія виробництва цитрату кальцію. Дільниця біосинтезу			
				Продукція	Підпис	Дата	
Розроб	Шопенко З. С.			Технологічна схема виробництва цитрату кальцію			
Конс.	Шопенченко В. Ю.						
Конс.							
Корект	Дзюбенко Л. П.						
Зам				Склад			
				Д	Архив	Архив	
				НТУУ "КПІ ім. І. Скорського"			
				ФБТ, БТ-91			



Таблиця трубопроводів		
Умовне позначення	Графічне	Найменування середовища в трубопроводі
Т10		Вода технічна гаряча
Т11		Вода питна
Т12		Вода технічна холодна
Т13		Розчини мийні та дезінфікуючі
Т14		Вода очищена
Т20		Пара
Т30		Повітря технологічне
Т32		Повітря відпрацьоване
Т27		Вакуум
Т29		Відходи рідики (Води стічні)
Т32		Конденсат

Умовні позначення		
Поз	Найменування	Кільк.
Зп	Повітроабірник	4
Ф	Фільтр	6
К	Компресор	1
То	Теплообмінник	4
РС	Ресивер	1
Н	Насос	14
ІМ	Іонамінний модуль	1
УЗО	Установка зворотнього осмосу	1
ЗБ	Збірник	2
Д	Дозатор	13
Р	Реактор	12
ЧП	Чашка Петрі	60
Ко	Колба	10
Т	Термостат	1
Па	Посівний апарат	1
ФВ	Ферментр	1
ВФ	Вакуум фільтр	1
ВН	Вакуум-насос	1
НФ	Нутч-фільтр	1
СШ	Барабанна сушарка	1
ПМ	Пакувальна машина	1
ВВ	Вентилятор відцентровий	1
Ке	Калорифер електричний	1

Затверджено			
Взам. інф. №			
Підп. і дата			
Лист № протоколу			

ДП БТ9122. 02.000 ТК			
Технологія виробництва цитрату кальцію. Дільниця біосинтезу			
Розроб	Шопенко З.С.	Листів	Дато
Корек	Шопенко В.В.	Архив	Архив
Керівн	Дзюбин Л.П.	Д	1
Зам		НТУУ "КПІ ім. І.Скорохода"	ФБТ, БТ-91
Формат А1			

Таблиця шпццерів

Познач.	Найменування	К-сть	Прохід умовн. Ду, мм	Тиск умовн. Р _у , МПа
А	Вхід рідини	1	200	0,1
Б	Вихід рідини	1	150	0,1
В	Вхід теплоагента	2	80	0,1
Г, Д	Вихід теплоагента	1	80	0,1
Е	Люк-лаз	1	530	0,1
Ж	Смотрове вікно	1	100	0,1
З	Установка термометра	1	80	0,1
К	Установка рівнемира	1	80	0,1
Л	Вхід повітря	1	45	0,1
М	Технологічний	1	80	0,1

Умовні позначення

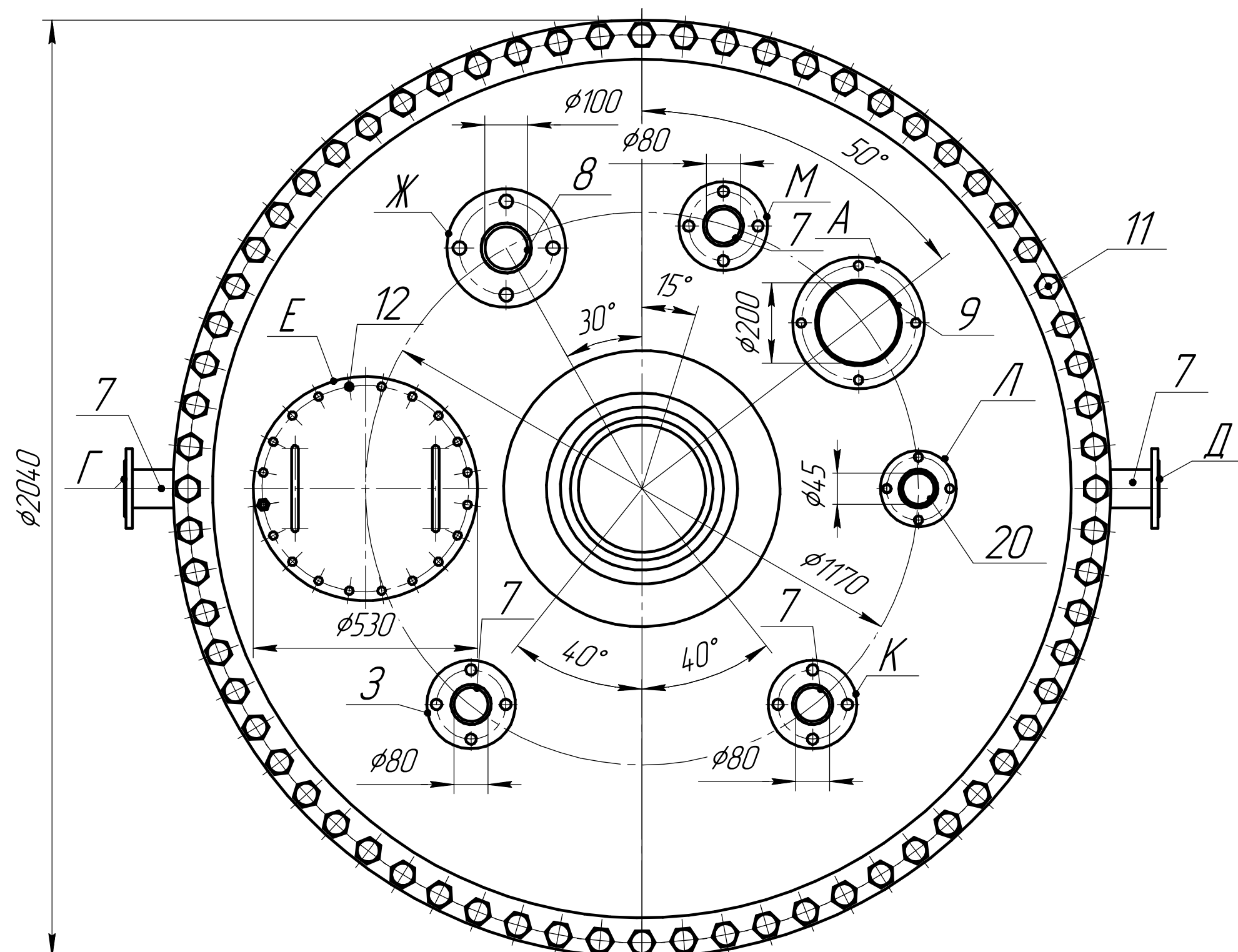
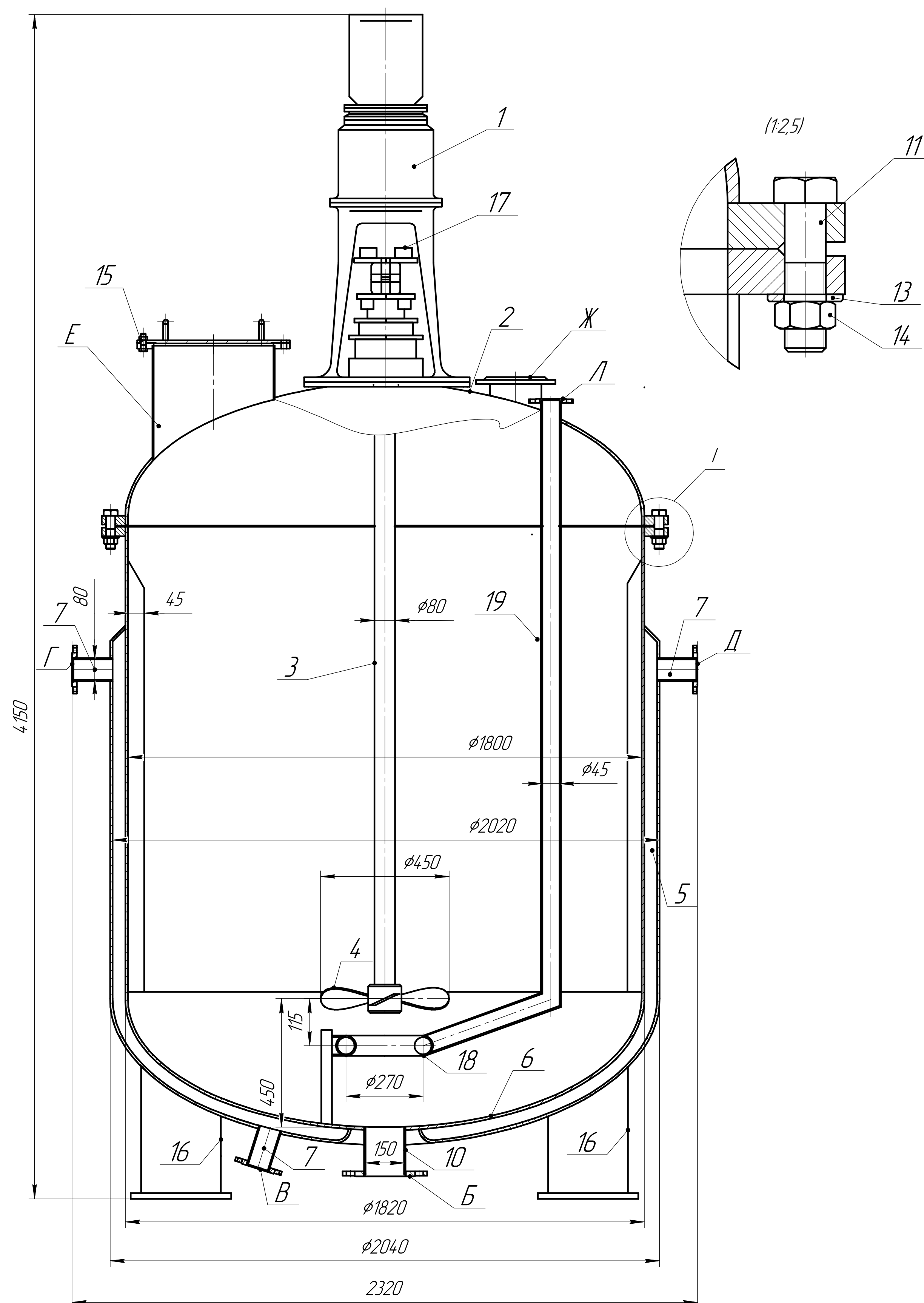
Поз.	Позначення	Найменування	К-сть	Найменування та марка матеріалу	Додаткові вказівки
1		Привід	1	Сталь 12Х18Н10Т	
2		Кришка	1	Сталь 12Х18Н10Т	
3		Вал	1	Сталь 12Х18Н10Т	
4		Мішалка	1	Сталь 12Х18Н10Т	
5		Сорочка	1	Сталь 12Х18Н10Т	
6		Днище	1	Сталь 12Х18Н10Т	
7		Фланець	6	Сталь 12Х18Н10Т	$D_{\text{ф}} = 80 \text{ мм}$
8		Фланець	1	Сталь 12Х18Н10Т	$D_{\text{ф}} = 100 \text{ мм}$
9		Фланець	1	Сталь 12Х18Н10Т	$D_{\text{ф}} = 200 \text{ мм}$
10		Фланець	1	Сталь 12Х18Н10Т	$D_{\text{ф}} = 150 \text{ мм}$
11		Болти	68	Сталь 20Х1МФ	$D_{\text{б}} = 60 \text{ мм}$
12		Болти	20	Сталь 20Х1МФ	$D_{\text{б}} = 40 \text{ мм}$
13		Шайди	68	Сталь 20Х1МФ	
14		Гайки	68	Сталь 20Х1МФ	$D_{\text{г}} = 55 \text{ мм}$
15		Гайки	20	Сталь 20Х1МФ	$D_{\text{г}} = 40 \text{ мм}$
16		Опора	2	Сталь 12Х18Н10Т	
17		Муфта	1	Сталь 12Х18Н10Т	
18		Бардотер	1	Сталь 12Х18Н10Т	
19		Труба передавлювання	1	Сталь 12Х18Н10Т	
20		Фланець	1	Сталь 12Х18Н10Т	$D_{\text{ф}} = 45 \text{ мм}$

Технічна характеристика реактора-змішувача

1	Номинальний об'єм апарату	5 м ³
2	Тривалість процесу перемішування	7200 хв
3	Середовище в апараті	культуральна рідина
4	Середовище в сорочці	вода
5	Відсоток заповнення апарату	65%
6	Торцебе ущільнення	одинарне
7	Перемішувач	
	тип мішалки	пропелерна
	діаметр мішалки	450 мм
	потужність приводу	2,2 кВт
	кількість мішалок	1
	кількість відбивних перегородок	4
8	Температура розчину	30 ⁰ С
9	Площа поверхні теплообміну	12 м ²
10	Частота обертання мішалки	3 с ⁻¹
11	Габаритні розміри	
	довжина	2040 мм
	висота	4150 мм
	ширина	2320 мм
12	Маса	297,4 кг

Технічні вимоги

1. Апарат повинен відповідати "Правилам встановлення і безпечної експлуатації апаратів, що працюють під тиском".
2. Зварні шви контролювати рентгенопрорівнюванням або УЗД.
3. Призначення штуцерів – див. таблицю штуцерів.
4. Граничні відхилення на вилот штуцерів 5 мм.
5. Фланцеві з'єднання кришки і люка опломбувати.
6. Апарат виготовлено згідно з ГОСТ 20680-2002.
7. При виготовленні, виробуванні та постачі апарату повинні виконуватись вимоги:
 - а) ГОСТ 12.2.003-74 "Обладнання виробниче. Загальні вимоги безпеки".
 - б) МСТ26-291-79 "Посудини та апарати сталеві зварні. Технічні вимоги".
8. Внутрішній об'єм апарату виробувати на міцність та щільність відповідно у вертикальному положенні під тиском 0,3 МПа.

[illegible]

Идент. № подл.	Подп. и дата	Взам. инд. №	Идент. № подл.	Подп. и дата	Средств. №	Период, примеч.