

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему:
«Технологія біосинтезу лимонної кислоти»

Рівень вищої освіти перший (бакалаврський)
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма Біотехнологія

Виконав: студент групи ББТ-20

Кужель А.А.

Науковий керівник: к.т.н., доц. Охмат О.А.

Рецензент: к.т.н., доц. Волошина І.М.

Київ 2024

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра
Рівень вищої освіти перший (бакалаврський)
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма Біотехнологія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БШХ

_____ Олена МОКРОУСОВА
«__» _____ 20__ р.

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Кужелю Андрію Антоновичу

1. Тема кваліфікаційної роботи: Технологія біосинтезу лимонної кислоти

Науковий керівник роботи Охмат Олена Анатоліївна, к.т.н., доц.
затверджені наказом КНУТД від «01» березня 2024 року № 49-уч

2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; наукова література щодо технології біосинтезу лимонної кислоти; технологічні схеми промислового отримання лимонної кислоти; матеріали переддипломної практики

3. Зміст кваліфікаційної роботи: техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва, характеристика біологічного агента, опис технологічної схеми, контроль якості, висновки, список використаних джерел, додаток.

4. Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи	Орієнтовний терміни виконання	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1 Техніко-економічне обґрунтування		
3	Розділ 2 Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва		
4	Розділ 3 Характеристика біологічного агента		
5	Розділ 4 Опис технологічної схеми		
6	Розділ 5 Контроль якості		
7	Висновки		
8	Оформлення кваліфікаційної роботи (чистовий варіант)		
9	Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для відгуку		
10	Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 14 днів до захисту)		
11	Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		
12	Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

З завданням ознайомлений:

Студент _____ Андрій КУЖЕЛЬ

Науковий керівник _____ Олена ОХМАТ

АНОТАЦІЯ

**Кужель Андрій. Технологія біосинтезу лимонної кислоти –
Рукопис.**

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія». – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2024 рік.

Кваліфікаційну роботу присвячено технології біосинтезу лимонної кислоти за допомогою високопродуктивного штаму *A. niger* CGMCC 5751.

У кваліфікаційній роботі представлено технологічну схему біосинтезу лимонної кислоти при культивуванні штаму *A. niger* CGMCC 5751. Обґрунтовано вибір біологічного агенту і наведено його основні характеристики, обрано склад поживного середовища, умови культивування та вибір технологічного обладнання. Проведено розрахунки для реалізації біосинтезу. Проектна технологічна схема передбачає стадію допоміжних робіт, стадію технологічного процесу, стадію біосинтезу, стадію знешкодження відходів. Обрано методики контролю на виробництві.

Ключові слова: лимонна кислота, *A. niger* CGMCC 5751, біосинтез, якість.

ABSTRACT

Andriy Kuzhel. Technology of citric acid biosynthesis – Manuscript.

Qualification work on specialty 162 "Biotechnologies and bioengineering".
– Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, 2024.

The qualification work is devoted to the technology of citric acid production using a highly productive strain of *A. niger* CGMCC 5751.

The qualification work presents the technological scheme of citric acid biosynthesis using the strain *A. niger* CGMCC 5751. The choice of the biological agent is justified and its main characteristics are given, the composition of the culture medium, cultivation conditions and the choice of technological equipment are selected. The calculations for the implementation of biochar are carried out. The technological scheme of the project includes a stage of auxiliary works, a stage of technological preparation, a stage of biosynthesis and a stage of waste disposal. The methods of production control are selected.

Key words: citric acid, A. niger CGMCC 5751, *biosynthesis, quality.*

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	4
ABSTRACT	5
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	10
1.1 Характеристика цільового продукту	10
1.2 Потреба у цільовому продукті	11
1.3 Розрахунок потужності виробництва	13
1.4 Розрахунок кількості виробничих циклів отримання культуральної рідини та розрахунок об'єму ферментера	13
РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА	15
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агенту та поживного середовища для його культивування	15
2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу	20
2.3 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу, підготовка поживного середовища та параметри стерилізації	22
2.3.1 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	22
2.3.2 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі та колбах на качалці	23
2.3.3 Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для отримання інокуляту і виробничого біосинтезу	24
РОЗДІЛ 3 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	26
3.1 Таксономічний статус	26

					КР.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис			

3.2 Морфолого-культуральні властивості	26
3.3 Фізіолого-біохімічні ознаки	27
РОЗДІЛ 4 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	29
4.1 Поетапна блок-схема технології	29
4.2 Опис технологічної схеми	29
РОЗДІЛ 5 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ	43
5.1 Мікробіологічний контроль	43
5.2 Визначення продуктивності росту штаму	43
5.3 Визначення концентрації джерела азоту	44
5.4 Визначення концентрації джерела вуглецю	44
5.5 Визначення концентрації цільового продукту	44
ВИСНОВКИ	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	47
Додаток А	51

					КР.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га		

ВСТУП

Актуальність теми. Лимонна кислота є універсальною сполукою з широким спектром застосувань. У харчовій промисловості вона використовується як консервант, підсилювач смаку та регулятор кислотності. У медицині її використовують як антикоагулянт, а також як складову у засобах для зменшення болю та запалення. У фармацевтичній промисловості її додають до ліків для регулювання кислотності та зменшення набряків. У косметичі лимонна кислота покращує текстуру кремів і лосьйонів, а також використовується у засобах для очищення шкіри. У побутовій хімії вона ефективна для видалення накипу і плям, а також підвищує ефективність пральних засобів, пом'якшуючи воду. У промисловості лимонна кислота застосовується для очищення металевих поверхонь, видалення іржі та як реагент у виробництві пластмас і барвників. Щорічно в Україні виробляють близько 20 тисяч тонн лимонної кислоти.

Мета роботи полягає у використанні штаму *A. niger* CGMCC 5751 для здійснення біосинтезу лимонної кислоти.

Завдання роботи:

1. Вивчити властивості цільового продукту.
2. Визначити ефективність застосування різних біологічних агентів для реалізації технології біосинтезу лимонної кислоти.
3. Провести розрахунок потужності підприємства для здійснення біосинтезу лимонної кислоти.
4. Обґрунтувати та розробити схему біосинтезу лимонної кислоти.
5. Обґрунтувати методи контролю на виробництві.

					КР.ПЗ.162.04			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив	Кужель А.А.				ВСТУП	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив	Охмат О.А.							
Н.Контр.					КНУТД, гр. ББТ-20			
Затвердив								

Об’єктом дослідження є властивості штаму *A. niger* CGMCC 5751 та його застосування для здійснення біосинтезу лимонної кислоти.

Предмет дослідження – технологія біосинтезу лимонної кислоти.

Методи дослідження. У кваліфікаційній роботі використано методи добору та аналізу наукової та технічної літератури; чисельні методи.

Новизна одержаних результатів – розроблено схему здійснення біосинтезу лимонної кислоти для фармацевтичної промисловості за рахунок культивування штаму *A. niger* CGMCC 5751.

Практичне значення одержаних результатів обумовлене широкою практикою застосуванням лимонної кислоти для виробництва лікарських засобів.

Апробація. Результати роботи за темою оприлюднені на IX Всеукраїнській науково-практичній конференції «Інноваційні тенденції підготовки фахівців в умовах полікультурного та мультилінгвального глобалізованого світу» (КНУТД, Київ, 11 квітня 2024 р.).

Публікації. За темою кваліфікаційної роботи опубліковано тези доповіді конференції Всеукраїнського рівня (Додаток А):

Kuzhel Andrii, Denysenko Vitalina. Microorganisms – producers of citric acid. *Інноваційні тенденції підготовки фахівців в умовах полікультурного та мультилінгвального глобалізованого світу* : зб. тез доповідей IX Всеукр. наук.-практ. конф. (м. Київ, 11 квітня 2024р.) ; за ред. І. А. Махович. Київ : КНУТД, 2024. С. 181–182.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Основний текст кваліфікаційної роботи викладений на 44 сторінках, містить 5 розділів, висновки та список використаної літератури з 31 джерела, 1 додаток.

						Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	та		

РОЗДІЛ 1

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

Лимонна кислота є значущою природною сполукою, відомою з кінця XVIII століття. У 1784 році шведсько-німецький хімік-першопроходець Карл Вільгельм Шеєле виділив її з лимонного соку. Згодом лимонну кислоту було виявлено також в інших citrusових фруктах, ананасах і навіть у тканинах тварин. Багато вчених зробили внесок у відкриття та вивчення циклу лимонної кислоти. Серед них ключову роль відіграли американський біохімік угорського походження Альберт Сент-Дьйорді та німецько-англійський біохімік Ганс Адольф Кребс. Вони були нагороджені Нобелівською премією з фізіології та медицини в 1937 та 1953 роках відповідно.

1.1 Характеристика цільового продукту

Лимонна кислота (2-гідрокси-1,2,3-пропантрикарбонова кислота) – кристалічна речовина білого кольору з хімічною формулою $C_6H_8O_7$ (рис. 1.1).

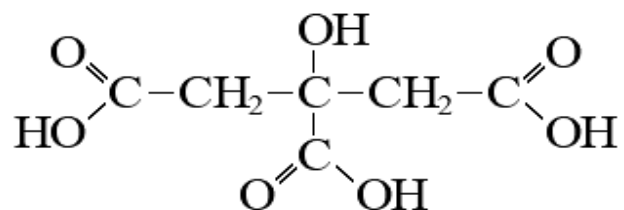


Рисунок 1.1 – Структурна формула лимонної кислоти

Молекулярна маса лимонної кислоти 192,123 г/моль. Температура плавлення 156 °С. Температура кипіння розклад. вище 175 °С.

Температура плавлення лимонної кислоти складає 153 °С. Сполука добре розчинна у воді; розчинна в етанолі, малорозчинна в діетиловому ефірі. Є слабкою триосновною кислотою.

					КР.ПЗ.162.04			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Кужель А.А.			РОЗДІЛ 1	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Охмат О.А.						
Н.Контр.								
Затвердив								
						КНУТД, гр. ББТ-20		

Лимонну кислоту відносять до третього класу небезпеки, технічну лимонну кислоту – до другого.

За Міжнародною системою класифікації і нумерації харчових добавок лимонна кислота є регулятором кислотності і відноситься до добавок – E330.

Хімічна класифікація речовини: CAS 77-92-9, PubChem 311 [1].

Використовується у багатьох галузях: харчовій, переробній, фармацевтичній, хімічній, видобувній тощо. Лимонну кислоту можуть використовувати для зниження жорсткості води, як консервант або антикоагулянт, фіксатор кольору продукту. Серед країн світу Китай є провідним світовим виробником лимонної кислоти. На другому місці знаходяться Сполучені Штати Америки, на третьому – країни Європи.

1.2 Потреба у цільовому продукті

Найпоширенішими препаратами, що містять лимонну кислоту, є препарати для профілактики або лікування сечокам'яних хвороб. За статистикою щорічна захворюваність на сечокам'яну хворобу у світі складає від 0,5 до 5,3 % залежно від країни.

На вітчизняному фармацевтичному ринку представлено ряд препаратів, що містять лимонну кислоту [2].

«Арстифен» (Kusum Healthcare Pvt Ltd). Фармгрупа – засоби, що застосовуються для розчинення сечових конкрементів. Діюча речовина: калію гідрокарбонат, лимонна кислота, натрію цитрат. 1 таблетка містить: кислоти лимонної безводної 1197 мг. Мінімальна ціна – 478,49 грн./уп.

«Блемарен» (Лабораторіос Медікаментос Інтернасьоналес, С.А., Іспанія). Фармгрупа – засоби, що застосовуються для розчинення сечових конкрементів. Діюча речовина: лимонна кислота, натрію цитрат, калію гідрокарбонат. 1 таблетка містить кислоти лимонної безводної 1197 мг. Мінімальна ціна – 728,43 грн./уп.

					КР.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га		

«Цитрокель таблетки» (Лабораторіос Медікаментос Інтернасьоналес, С.А., Іспанія). Фармгрупа – гомеопатичний лікарський засіб. Діюча речовина: лимонна кислота. Мінімальна ціна – 514,00 грн./уп.

«Коензим композитум», розчин д/ін. (Biologische Heilmittel Heel GmbH). Фармгрупа – комплексний гомеопатичний препарат. Діюча речовина: сірка, нікотинамідаденіндинуклеотид, марганцю фосфат, коензим А, оксіглютарова кислота, пірвіноградної кислоти натрієва сіль, янтарна кислота, буряк звичайний, яблучна кислота, фумарова кислота, аконітова кислота, барій щавелевобурштинно-кислий, аденозин трифосфат динатрієва сіль, церій щавлевокислий, ліпоева кислота, печінка вапняна сірчана, сон-трава лучна, натрію оксалоацетат, аскорбінова кислота, цистеїн, вітамін В1, рибофлавін вітамін В2, вітамін В6, нікотинамід, лимонна кислота, магнію оротат. Мінімальна ціна – 806,08 грн./уп.

На ринку фармацевтичних матеріалів відсутні препарати вказаної фармгрупи вітчизняного виробництва. Тому орієнтуємося на іноземні аналоги і передбачаємо випуск аналога на території України.

З вище перелічених препаратів орієнтуємося для подальших розрахунків на препарат «Арстифен» (Kusum Healthcare Pvt Ltd, Індія).

Критерії відбору препарату для подальших розрахунків:

- Лікарський засіб, не є гомеопатичним препаратом;
- Наявна державна реєстрація: UA/18754/01/01 з 25.05.2021 по 25.05.2026 р.;
- Дата останнього оновлення інструкції: 21.10.2023 р.,
- Найнижча ціна у групі порівнюваних препаратів.

«Арстифен» застосовується для лікування сечокам'яної хвороби з метою підлужування сечі. Доза препарату визначається для кожного пацієнта індивідуально із розрахунку: значення рН свіжої сечі має бути скориговано

					КР.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га		

до 6,8–7,4. Добова доза препарату зазвичай складає 3 шипучі таблетки. За необхідності, добова доза може бути збільшена до 5 шипучих таблеток.

Інструкцією лікарського засобу передбачено, що шипучі таблетки приймають 1 раз на добу по 3 штуки (або по 1 таблетці 3 рази на добу).

Відповідно, мінімальна добова кількість таблеток складає:

$$N = 1 \cdot 3 = 3 \text{ таблетки}$$

Курс лікування у середньому складає 80 днів. Відповідно, розраховуємо кількість таблеток за курс:

$$N_{\text{курс}} = 3 \cdot 80 = 240 \text{ таблеток}$$

1.3 Розрахунок потужності виробництва

За статистичними даними, враховуючи динаміку збільшення захворюваності на сечокам'яну хворобу серед осіб працездатного віку та її прогнозування до 2024 року виявлено, що захворюваність складає близько 0,8 %. Населення України у 2024 році становить 31 млн., а, отже, кількість потенційно хворих людей складає 248000 осіб.

Вважатимемо, що 10 % хворих на сечокам'яну хворобу людей будуть застосовувати препарат «Арстифен»:

$$N_{\text{люд}} = (248000 \cdot 10)/100 = 24800 \text{ осіб.}$$

Отже, річна потреба населення України в препараті «Арстифен» при одноразовому прийомі становить:

$$N_{\text{потр}} = 24800 \cdot 240 = 5952000 \text{ таблеток}$$

Звідси, щоб забезпечення 10 % населення України достатньою кількістю «Арстифену» на один курс необхідно 5952000 таблеток.

1.4 Розрахунок кількості виробничих циклів отримання культуральної рідини та розрахунок об'єму ферментера

									Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га					

КР.ПЗ.162.04

Для виробництва фармацевтичного препарату використовують лимонну кислоту зневоднену. Кожна таблетка у своєму складі містить 1,2 г лимонної кислоти.

Отже загальні потреби у лимонній кислоті складають:

$$5952000 \cdot 1,2 = 7142400 \text{ г}$$

Продуктивність пропонованого для використання у роботі штаму *A. niger* CGMC 5751 складає 151,67 г/л.

Отже, об'єм робочої рідини становить:

$$7142400/151,67 = 47092 \text{ л} = 47,1 \text{ м}^3$$

Оскільки передбачено здійснення технологічного процесу, тривалість якого складає 5–10 діб. Обираємо для розрахунку середню тривалість – 7 діб. Приймаємо, що у році 330 робочих днів, і розраховуємо кількість циклів за рік:

$$N_{\text{цикл}} = 330/7 = 47 \text{ циклів/рік.}$$

Звідси, об'єм культуральної рідини на 1 цикл

$$V_{\text{кр}} = 47092/47 = 1012 \text{ л за цикл.}$$

						КР.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га			

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агенту та поживного середовища для його культивування

Ряд мікроорганізмів накопичує лимонну кислоту: *A. niger*, *A. awamori*, *A. nidulans*, *A. fonsecaeus*, *A. luchensis*, *A. phoenicus*, *A. goesii*, *A. saitoi*, *A. flavus*, *Absidia sp.*, *Acremonium sp.*, *Botrytis sp.*, *Eupenicillium sp.*, *Mucor piriformis*, *Penicillium janthinellum*, *P. restrictum*, *Talaromyces sp.*, *Trichoderma viride*, *Ustilina vulgaris*. Для промислового виробництва також можуть використовувати дріжджі, які виробляють лимонну кислоту з різних джерел вуглецю: *Candida* (*C. tropicalis*, *C. catenula*, *C. Guilliermondii*, *C. intermedia*), *Debaromyces*, *Hansenula*, *Kloekera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torula*, *Torulopsis*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces* [3].

Гриби *Aspergillus niger* найбільш традиційний біологічний агент у виробництві лимонної кислоти. Вказаний вид характеризується високим виходом цільового продукту. Останнім часом, зважаючи на попит різних галузей у лимонній кислоті, створена велика кількість високопродуктивних штамів *Aspergillus niger*. Розробки стосуються не тільки підвищення продукування лимонної кислоти штамом, але і зменшення вартості поживного середовища для культивування *Aspergillus niger*.

Склад поживного середовища для біосинтезу лимонної кислоти має включати джерела: вуглецю, азоту, фосфору.

КР.ПЗ.162.04

					КР.ПЗ.162.04		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			
Розробив		Кужель А.А.				Літ.	Аркуш
Перевірив		Охмат О.А.					Аркушів
Н.Контр.					РОЗДІЛ 2		
Затвердив					КНУТД, гр. ББТ-20		

Для порівняння обираємо штами: *A. niger* W5, *A. niger* CGMC 5751, *A. niger* B60, *Y. lipolytica* W29(Y1AMPD Y1YHM2) [4].

Зазначене порівняння проводимо у два етапи.

На першому етапі відбору порівняємо показники культивування продуцентів (табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Порівняльна характеристика реалізації
культивування продуцентів

Біологічний агент	Склад поживного середовища	Показники синтезу		Тривалість процесу, год.	Особливості біологічного процесу	Використана література
		кількість продукту, г/л	продуктивність г/л/год.			
<i>A. niger</i> W5	Пептон, агар-агар, глюкоза, сахароза, допоміжні речовини	98,1	0,68	6	Склад поживного середовища: мікологічний пептон – 10,0; глюкоза - 40,0; агар – 15,0 (рН 5,6±0,2)/ Сахароза - 160,0; NaNO ₃ – 4,0; MgSO ₄ – 0,23; FeCl ₃ – 0,02; ZnSO ₄ – 0,0012; MnCl ₂ – 0,0012	[5]
<i>A. niger</i> CGMCC 5751	Екстракт кукурудзяний, допоміжні речовини	151,67	1,58	4	Спори інокують у рідке кукурудзяне середовище, збагачене допоміжними речовинами, і культивують при тиску 0,1	[6]

Біологічний агент	Склад поживного середовища	Показники синтезу		Тривалість процесу, год.	Особливості біологічного процесу	Використана література
		кількість продукту, г/л	продуктивність г/л/год.			
					МПа, за вентиляційної потужності 330 л/год., 350 об / хв. і 35°C, упродовж 96 год.	
<i>A. niger</i> B60	Шкірка гранату, метанол	351,5	1,79	8	Поживне середовище - шкірка гранату, рН 8.0, 25 °С, 8 діб	[7]
<i>Y. lipolytica</i> W29(Y1A MPD Y1YHM2)	Глюкоза, екстракт дріжджовий, пептон	97,1	0,58	7	Культивують 5 діб, 30 °С	[8]

З таблиці видно, що найбільш продуктивним є штам *A. niger* B60, продуктивність якого складає 351,5 г/л. Однак, слід зауважити, що поживне середовище для культивування продуценту містить переважно шкірку гранату – продукту специфічного і дороговартісного на території України. Саме тому слід звернути увагу на інший біологічний агент – *A. niger* CGMCC 5751, продуктивність якого вища за інші біологічні агенти і складає 151,67 г/л. Ще однією перевагою застосування вказаного штаму є те, що культивування триває 4 доби.

На другому етапі проводимо порівняння економічної складової культивування продуцентів (табл. 2.2).

									Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га					

КР.ПЗ.162.04

**Таблиця 2.2 – Вартість поживних середовищ
для культивування продуцентів**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Концентрація у поживному середовищі, г/л	Ціна компонента грн/кг	Вартість компонента на 1 л середовища, грн.	Джерело
<i>A. niger</i> W5	пептон	10	1120	11,2	[9]
	агар-агар	15	1200	18	[10]
	NaNO ₃	4	190	0,76	[11]
	глюкоза	40	120	4,8	[12]
	сахароза	160	100	16	[13]
	MgSO ₄	0,23	35	0,00805	[14]
	FeCl ₃	0,02	340	0,0068	[15]
	ZnSO ₄	0,0012	80	0,000096	[16]
	MnCl ₂	0,0012	214	0,0002568	[17]
Вартість одного літра середовища, грн.:				50,78	
<i>A. niger</i> CGMCC 5751	екстракт кукурудзяний	30	65	1,95	[18]
	екстракт дріжджовий	0,004	1000	0.004	[19]
	FeSO ₄	0,03	80	0.0024	[20]
	CaCl ₂	0,02	117	0,000234	[21]
	MnCl ₂	0,007	214	0,001498	[17]
	CuSO ₄	0,0003	184	0,0000552	[23]

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Концентрація у поживному середовищі, г/л	Ціна компонента грн/кг	Вартість компонента на 1 л середовища, грн.	Джерело
	ZnSO ₄	0,01	80	0,0008	[16]
	глюкоза	60,7	120	7,284	[12]
	MgSO ₄	0,3	35	0,105	[14]
	K ₂ H PO ₄	0,3	420	0,126	[26]
Вартість одного літра середовища, грн.:				9,47	
<i>A. niger</i> B60	шкірка граната	10	86	0,86	[27]
	метанол	30	360	10,8	[28]
Вартість одного літра середовища, грн.:				11,66	
<i>Y. lipolytica</i> W29(YIAM PD Y1YHM2)	глюкоза	20	120	2,4	[12]
	екстракт дріжджовий	10	1000	10	19
	пептон	10	1600	16	[9]
Вартість одного літра середовища, грн.:				28,4	

Зважаючи на те, що найбільш використовуваним мікроорганізмом у культивуванні лимонної кислоти є гриб *Aspergillus niger* [21], який здатен накопичувати велику кількість лимонної кислоти, використовуючи достатньо недороге поживне середовище.

Дивлячись на інформацію в таблиці можна зробити висновок, що саме штам *A. niger* CGMCC 5751 буде більш вигідним у промисловому

										Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га						

КР.ПЗ.162.04

використанні через низьку ціну матеріалів для культивування. Вартість одного літра поживного середовища для вказаного штаму складає 9,47 грн.

2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу

Біосинтез – основний технологічний процес у виробництві лимонної кислоти [26–28].

Для забезпечення біосинтезу аліквоту частину спор, отриманих зі штаму *A. niger* CGMCC 5751, інокують у зріджене кукурудзяне середовище, збагачене допоміжними матеріалами (див.табл.2.2), та культивують при вентиляції 330 л/год., при перемішуванні 350 об/хв. за температури 35 °С упродовж 96 годин у ферментері.

Зважаючи на високу швидкість перемішування, ферментер обираємо з розрахунку, щоб коефіцієнт заповнювання був нижчим за 0,7.

Ґрунтуючись на потужність виробництва, розраховану у 1 розділі, нам потрібен ферментер об'ємом 2000 л для здійснення глибинного біосинтезу. Глибинне культивування дозволяє забезпечити більший вихід цільового продукту в результаті здійснення біосинтезу.

Основними вимогами до біореактора глибинного культивування є:

- стерильність (посіву, відбору проб, біопроцесу);
- гомогенність культурального середовища;
- простота обслуговування;
- автоматична система контролю здійснене біосинтезу, яка передбачає керування технологічним процесом та автоматичне визначення: температури та рівня рН, вмісту кисню, швидкості обертання мішалки, сили тиску, ступеня піноутворення.

При використанні глибинного способу культуральна рідина містить 5 – 12 % органічних кислот. Об'єм лимонної кислоти при цьому становить до 98 % від об'єму всіх органічних кислот.

КР.ПЗ.162.04

Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га

Аркуш

Для реалізації стадії біосинтезу пропонуємо для використання ферментер «Solaris» (рис. 2.1). Технічні характеристики якого дозволяють ефективно здійснювати та контролювати стадію біосинтезу, застосовувати автоматизовану систему управління, забезпечувати безпеку у роботі.



Рисунок 2.1 – Загальний вигляд біореактора «Solaris» [29]

Загальні характеристики біореактора:

1. матеріал корпусу – Нержавіюча сталь, полірована;
2. електричний нагрівач, теплообмінник для контурів нагріву-охолодження;
3. перемішування – якірна або лопатеві мішалки, Ерліфт;
4. система фільтрації – стерильні фільтри, керамічні фільтри; фільтри на випускових клапанах;
5. аерація – так;

									Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га					

КР.ПЗ.162.04

6. механічний піногасник – наявна функція зменшення утворення піни;
7. оснащення – інокуляційний порт, стаціонарні трубопроводи, насоси, системи перекачування матеріалів; пневматичні клапани; дозувальні пристрої;
8. відбір проб – автоматичний або ручний;
9. автоматична система керування всіма вузлами, програмування параметрів здійснення технологічного процесу, можливість під'єднання системи до дистанційного керування через мережу Інтернет; система управління дозволяє об'єднувати кілька агрегатів;
10. відповідає нормам GMP.

2.3 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу, підготовка поживного середовища та параметри стерилізації

2.3.1 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Об'єм культуральної рідини на 1 цикл складає за розрахунками 1012 л. Виробничий біосинтез здійснюємо у ферментері з корисним об'ємом 1012 л.

Отже, нам буде потрібен ферментер об'ємом 2000 л.

При наявних розрахунках коефіцієнт заповнювання ферментера складатиме: $1012/2000=0,51$.

Зважаючи на інтенсивне перемішування під час реалізації біосинтезу, коефіцієнт заповнювання, рівний 0,51, є доцільним.

Розрахункова кількість посівного матеріалу для ферментера зазвичай теоретично складає 10 % об'єму середовища. Тобто кількість середовища за розрахунком становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб1}}}{1+X\phi} = \frac{1012}{1+0,1} = 920 \text{ л}$$

де: $V_{\text{роб1}}$ – робочий об'єм ферментера, л;

$X\phi$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

									Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га					

КР.ПЗ.162.04

Відповідно, розрахуємо кількість посівного матеріалу для ферментера:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 1012 - 920 = 92 \text{ л.}$$

Приймаємо об'єм посівного матеріалу рівним 92 л.

Об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме 92 л (без урахування втрат).

Вважаємо, що коефіцієнт заповнення дорівнює $K_{\text{зап}} = 0,6$, відповідно повний об'єм інокулятора складає:

$$V_{\text{роб2}} = 92/0,6 = 153,3 \text{ л.}$$

Наявне інтенсивне перемішування, тож приймаємо за об'ємом інокулятор $V_{\text{ін}} = 250 \text{ л}$. Уточнюємо коефіцієнт заповнювання:

$$K_{\text{зап2}} = \frac{V_{\text{роб2}}}{V_{\text{ін}}} = \frac{153,3}{250,0} = 0,61$$

Коефіцієнт заповнення інокулятора кореговано за розрахунком, але його значення відповідає нормі (0,6–0,8).

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{92,0}{1 + 0,1} = 83,6 \text{ л}$$

Відповідно, кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 92,0 - 83,6 = 8,4 \text{ л}$$

2.3.2 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

Для одержання 8,4 л ($V_{\text{пм4}}$) посівного матеріалу використовуємо двадцять колб Ерленмейера об'ємом 750 мл. В кожную колбу можемо додати 420 мл. Коефіцієнт заповнювання колби при вирощуванні, зважаючи на інтенсивне перемішування складає: $420/750=0,56$.

									Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га					

КР.ПЗ.162.04

2.3.3 Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для отримання інокуляту і виробничого біосинтезу

Вирощування конідій та здійснення біосинтезу відбувається на поживному середовищі наступного складу, г/л:

- екстракт кукурудзяний – 30;
- екстракт дріжджовий – 0,004;
- FeSO_4 – 0,03;
- CaCl_2 – 0,02;
- MnCl_2 – 0,007;
- CuSO_4 – 0,0003;
- ZnSO_4 – 0,01;
- глюкоза – 60,7;
- MgSO_4 – 0,3;
- K_2HPO_4 – 0,3.

Об'єм поживного середовища, необхідного для вирощування посівного матеріалу в колбах, становить 8,4 л. Стерилізацію запропоновано здійснювати в автоклаві.

Для стерилізації поживного середовища об'ємом 92 л для вирощування культури використовуємо інокулятор.

Зважаючи на склад середовища та, відповідно, різні режими стерилізації для окремих компонентів, поживне середовище розділяємо на дві окремі композиції. Також слід звернути увагу на присутність у складі поживного середовища K_2HPO_4 , наявність якого може призвести до утворення осаду при приготуванні поживного середовища. Тому передбачене підкислення середовища для запобігання утворенню осаду.

Відповідно до режимів стерилізації та складу реагентів поживне середовище розділяємо на 2 к

КР.ПЗ.162.04

						Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га		

Композиція I: кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт, глюкоза. Стерилізацію здійснюємо за температури 121 °С упродовж 30 хв.

Композиція II: FeSO₄, CaCl₂, MnCl₂, CuSO₄, ZnSO₄, MgSO₄. Стерилізацію здійснюємо за температури 131 °С упродовж 40 хв.

Культивування *A. niger* передбачає підживлення біологічного агента на стадії його культивування. Склад розчину для підживлення передбачає використання: води, глюкози або меляси, гексаціаноферату калію. Стерилізація розчину для підживлення біологічного агента відбуватиметься в автоклаві за температури 120 °С упродовж 10 хв. Після стерилізації розчину передбачено його охолодження до температури 35 °С.

РОЗДІЛ 3

ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

Вперше рід *Aspergillus* був описаний біологом П'єром Антоніо Мікелі у 1729 році. Свою назву *Aspergillus* отримав через вигляд спороутворюючої структури, яка нагадує аспергіллум – інструмент для окроплення святою водою під час літургій. *Aspergillus* – сапрофіти, нестатеві, сумчасті гриби.

3.1 Таксономічний статус

Царство: Гриби (*Fungi*)

Відділ: Аскомікотові гриби (*Ascomycota*)

Клас: Євроціоміцети (*Eurotiomycetes*)

Порядок: Євроціальні (*Eurotiales*)

Родина: Аспергілові (*Aspergillaceae*)

Рід: Аспергіл (*Aspergillus*)

Вид: *Aspergillus niger*

3.2 Морфолого-культуральні властивості

A. niger зазвичай продукує конідії (спори), які надають його колоніям коричневого або чорного кольору (рис. 3.1).

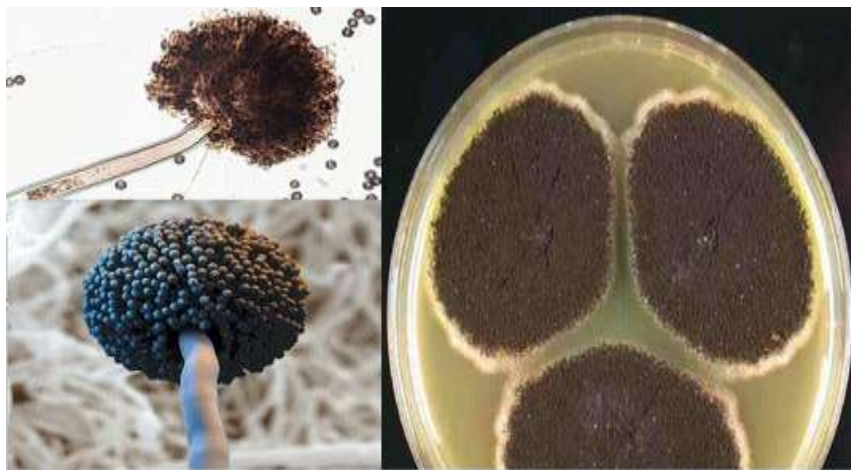


Рисунок 3.1 – *Aspergillus niger*

					КР.ПЗ.162.04			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Кужель А.А.			РОЗДІЛ 3	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Охмат О.А.						
Н.Контр.								
Затвердив								
						КНУТД, гр. ББТ-20		

Міцелій є прозорим і поділений на сегменти поперечними стінками. Колонії ростуть за температури 37 °С. Колір колоній змінюється. Колонії молочно-білого кольору на 2–3 добу починає змінюватися коричневий або чорний, вкриваючись міцелієм.

Основні характеристики:

Колонії:

- Швидко ростуть, спочатку білі, згодом чорні,
- Діаметр колоній 5-7 см.

Конідії:

- Чорні, круглі або злегка овальні, діаметром 3-5 мкм.

Конідиеносці:

- Вертикальні, гладкі або злегка шорсткі, довжиною 1-2 мм.

Міцелій:

- Прозорий або білий, розгалужений.

Ріст на середовищах:

- Поживний агар, картопляний декстрозний агар (PDA), агар

Сабуро.

3.3 Фізіолого-біохімічні ознаки

Aspergillus niger – аероб.

Оптимальна температура культивування складає 25–30°C.

Оптимальний рівень рН для культивування становить 6,0–7,0.

Може рости в умовах високої концентрації цукру або солі.

Добре розвивається в умовах високої вологості.

Наявність іонів металів (наприклад, таких Fe^{2+} або Mn^{2+}) у мінімальних кількостях стимулює виробництво лимонної кислоти при культивуванні *Aspergillus niger*. Підвищеному синтезу лимонної кислоти сприяє і висока концентрація цукру (глюкози) в середовищі.

									Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га					

Штам *Aspergillus niger* CGMCC 5751 гіперпродуцент лимонної кислоти, було отримано у лабораторії промислової мікробіології (Тяньцзінь, Китай).

Штам *Aspergillus niger* CGMCC 5751 чутливий до антиміцину А.

Оптимальною температурою для культивування штаму є 35 °С.

Культивування передбачає здійснення аерації в процесі біосинтезу та інтенсивного перемішування.

Культивують штам з перемішуванням зі швидкістю 350 об/хв. за температури 35 °С упродовж 96 годин.

						Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га		

РОЗДІЛ 4

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1 Поетапна блок-схема технології

Технологічну схему біосинтезу лимонної кислоти можна розділити на кілька частин.

Допоміжні роботи (ДР), які налічують: санітарну підготовку персоналу, підготовку мийних та дезинфікувальних розчинів, підготовку повітря; підготовку приміщень, підготовку комунікацій та обладнання.

Друга стадія – стадія біосинтезу, тобто основного технологічного процесу (ТП).

Третя стадія – стадія знешкодження відходів: рідких, твердих, газоподібних.

Поетапна блок-схема наведена у графічній частині кваліфікаційної роботи

4.2 Опис технологічної схеми

Технологічна схема отримання лимонної кислоти за допомогою продуценту *Aspergillus niger* CGMCC 5751 включає:

ДР.1 Підготовка персоналу

До роботи допускаються працівники, які пройшли медичний огляд та інструктаж з техніки безпеки, мають знання та вміння у галузі біотехнологій.

					КР.ПЗ.162.04			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4	Літ.	Аркуш	Аркушів
Розробив		Кужель А.А.						
Перевірів		Охмат О.А.						
Н.Контр.								
Затвердив								
						КНУТД, гр. ББТ-20		

ДР.1.1 Навчання персоналу

Навчання персоналу включає проходження первинних інструктажів з техніки безпеки при прийомі на роботу і навчання залежно від посади працівника. Персонал, який працюватиме в чистих приміщеннях, проходить додатковий інструктаж про роботу у асептичних умовах. Персонал, який здійснюватиме технічне обслуговування обладнання та оснащення, проходить навчання щодо охорони праці, безпеки життєдіяльності, пожежної безпеки і правил поводження з обладнанням.

ДР.1.2 Медичне обстеження персоналу

Регламентовано проходження медогляду перед прийомом на роботу. Працівники біотехнологічних підприємств повинні проходити щорічне медичне обстеження.

Працівники із наявними ознаками захворювання, відкритими ранами на тілі до роботи не допускаються.

ДР 1.3 Підготовка одягу

Працівників забезпечують засобами індивідуального захисту залежно від місця роботи: рукавичками, шапочками, спеціальним взуттям, бахілами, костюмами, халатами, окулярами.

ДР. 2 Санітарна підготовка виробництва

На даній стадії відбувається підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів, санітарна обробка приміщення, підготовка приміщень.

ДР 2.1 Підготовка робочих розчинів

На даному етапі потрібно підготувати миючі та дезінфікуючі засоби для поверхонь, приготувати розчин для обробки рук персоналу, миючий розчин для миття обладнання.

					КР.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га		

ДР 2.1.1 Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів для поверхонь

Пропонується використання «Новохлор-екстра» (Інтердез, Україна) – рідкого універсального концентрованого лужного дезінфекційного засобу на основі гіпохлориту натрію з комплексом допоміжних функціональних компонентів. Засіб відносять до 3 класу небезпеки.

Засіб ефективний проти: грам позитивних і грам негативних бактерій, *Pseudomonas aeruginosa*, *S.aureus*, *Listeria monocytogenes*, бактерій роду *Proteus*, мікобактерій туберкульозу, збудників черевного типу, дифтерії, менінгококової інфекції, паратифів; вегетативних і спорових форм спороутворювальних бактерій роду *Clostridium*; полівірусів вірусів, вірусів гепатитів А, В, С, вірусів грипу всіх типів; грибів роду *Candida*, збудників дерматомікозів, плісняві гриби *Aspergillus niger* в спорових формах, спор мікроорганізмів, а також збудників бруцельозу, псевдотуберкульозу, лептоспірозу тощо.

Робочі розчини дезінфікуючого засобу «Новохлор-Екстра» мають лужне рН; відрізняються емульгуючою, мийною і високою змочувальною здатністю; з оброблених поверхонь легко змиваються водою; не фіксують на поверхнях обробки органічні забруднення; не ушкоджують вироби з металу, скла, гуми, полімерних та композиційних матеріалів.

Засіб «Новохлор-Екстра» може бути використаний як для ручного прибирання, так і для механічної мийки.

Робочі концентрації мийного засобу становлять 0,01 до 0,5 %.

Розчин «Новохлор-Екстра» готують у ємності лабораторного приміщення, розчиняючи необхідну кількість препарату у воді. Готують робочі розчини концентрацією 0,1 % (до ДР 2.2.1) та 0,5 % (до ДР 2.2.2).

Термін зберігання приготованих робочих розчинів складає до 24 год.

Порожня тара від використаного розчину передається на етап знешкодження твердих відходів (до ЗВ 9.2).

					КР.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га		

ДР 2.1.2. Приготування мийного розчину гідроксид натрію

Гідроксид натрію (каустична сода) – сильний луг, є універсальним дезінфікантом. Використовується розчин каустичної соди для миття та очищення обладнання у концентрації 2 % розчину (до ДР 3.2).

Порожню тару від використаного засобу направляють на етап знешкодження твердих відходів (до ЗВ 9.2).

ДР 2.1.3 Підготовка дезінфікуючого розчину для обробки рук персоналу та поверхонь

В лабораторному приміщенні у скляних ємностях готують 70 % розчин етилового спирту.

Порожня тара від використаного розчину передається на етап знешкодження твердих відходів (до ЗВ 9.2).

ДР 2.2 Підготовка приміщень

Стадія передбачає підготовку приміщення для подальшої роботи, а саме: щоденне та генеральне прибирання.

ДР 2.2.1 Щоденне прибирання

Проводиться вологе прибирання: миття підлоги, миття поверхонь (від ДР 2.1.1). Використаний для прибирання розчин направляється на етап знешкодження рідких відходів (до ЗВ 9.1).

ДР 2.2.2 Генеральне прибирання

Приміщення прибирають один раз на 4 тижні. Прибирання передбачає миття всіх поверхонь, підлоги, вікон, стін, дверей (від ДР 2.1.1). Окремі поверхні протираються додатково 70 % розчином спирту (від ДР 2.1.3). Використаний для прибирання розчин направляється на етап знешкодження рідких відходів (до ЗВ 9.1).

					КР.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га		

ДР 3 Підготовка ферментера

Підготовка біореактора до здійснення технологічного процесу передбачає його ретельне миття, технічну перевірку, стерилізацію.

ДР 3.1 Первинне ополіскування ферментера

Етап передбачає обробку ферментера водою температурою 75-90 °С під тиском 0,6-1 МПа упродовж 5–10 хв. Витрати води загальні складають до 0,5 м³.

Використаний для ополіскування розчин направляється на етап знешкодження рідких відходів (до ЗВ 9.1).

ДР 3.2 Миття ферментера

Для миття розчином гідроксиду натрію (від ДР 2.1.2) заповнюємо ферментер на 30 % об'єму обладнання, вмикаємо перемішувальний пристрій. Тривалість обробки – 1 год. за температури 25–35 °С.

Після миття і зливання миючого розчину, ферментер знову заповнюють водою на 50 % об'єму та включають перемішувальний пристрій ще на 30 хв.

Використаний для миття розчин направляється на етап знешкодження рідких відходів (до ЗВ 9.1).

ДР 3.3 Повторне ополіскування ферментера

Ополіскування проводять водою з температурою 25–35°С для відмивання залишків мийного засобу з апарату і комунікацій.

Використаний для ополіскування розчин направляється на етап знешкодження рідких відходів (до ЗВ 9.1).

ДР 3.4 Технічний огляд ферментера

Здійснюється візуальний контроль чистоти ферментера, цілісності його конструкцій та конструкцій його комунікацій; відсутності тріщин, вм'ятин, пошкоджень.

										Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га					КР.ПЗ.162.04	

ДР 3.5 Перевірка на герметичність

Під час цього етапу потрібно впевнитись у герметичності усіх складових біореактора. Для цього закривають всю запірну арматуру і створюють у системі тиск силою 0,1–0,2 МПа. Фіксують показник встановленого тиску, який за 40–60 хвилин перевірки не має зменшитись більше ніж на 0,01 МПа. У випадку зниження тиску впродовж вказаного інтервалу часу, всі з'єднання ферментеру обробляють мильним розчином для виявлення точки розгерметизації. Після її визначення, проводять запобіжні заходи: змінюють прокладку, затягують вузли комунікацій. Після чого перевірку на герметичність повторюють.

Використане для перевірки повітря направляють на етап знешкодження газоподібних відходів (до ЗВ 9.3).

ДР 3.6 Стерилізація обладнання

Під час цього етапу відбувається стерилізація водяною парою під тиском 0,2 МПа. Температура стерилізації становить 120-126 °С, тривалість – 60 хв.

ДР 4. Підготовка повітря

ДР 4.1 Забір повітря з атмосфери

Забір повітря на виробництво відбувається через шахту або трубу за допомогою турбонасосу. Забір відбувається у найчистішій ділянці території підприємства з урахуванням забрудненості атмосфери, відсутності промислових димарів, очисних збірників та споруд. Висота шахти/труби повинна сягати не менше 10 метрів.

ДР 4.2 Попередня очистка

Попереднє очищення повітря відбувається через фільтри з розміром пор 10 мкм. Необхідно запланувати заміну фільтрів через кожні 200-240 годин експлуатації.

					КР.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	та		

ДР 4.3 Стиснення повітря

Стиснення очищеного повітря відбувається за допомогою спеціальних установок для повітропідготовки. Установки оснащені додатковими фільтрами з розміром пор 10 мкм і регуляторами тиску від 0,8-1,5 МПа [30]. Під час стиснення повітря спостерігається його нагрів до температури вище за 120 °С.

ДР 4.4 Охолодження повітря

Повітря охолоджують у теплообміннику до температури 25–30 °С, конденсат, що утворився, направляють на етап знешкодження рідких відходів (до ЗВ 9.1).

ДР 4.5 Нагрівання повітря до температури культивування

Повітря нагрівають до температури культивування 35 °С за допомогою теплообмінника. Вологість повітря утримують на рівні 50 % для унебезпечення від утворення конденсату на фільтрах.

ДР 4.6 Стерилізація повітря на фільтрах

Очищення повітря відбувається за допомогою індивідуальних фільтрів. Ступінь очищення повітря складає 99,9 %.

ДР 5. Підготовка розчинів для підживлення та корегування рН

ДР 5.1 Приготування та стерилізація розчину для підживлення

Склад розчину для підживлення передбачає використання: води, глюкози, гексаціаноферату калію. Біосинтез обраного штаму триває 4 доби, починаючи з 2 доби через зниження концентрації цукру у культуральній рідині, проводять 2-3 підживлення введенням розчину 25-28 % цукру. Підживлення проводять до рівня цукру у робочому розчині 12-15 % початкової його концентрації (до ТП 7.3, ТП 7.4, ТП 8).

					КР.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	та		

Стерилізація розчину для підживлення здійснюється в автоклаві за температури 120 °С упродовж 10 хв. Після стерилізації розчину передбачено його охолодження до температури 35 °С.

ДР 5.2 Приготування розчинів для корегування рН

Для коригування рівня рН при здійсненні культивування використовують 10 % розчини КОН та H₂SO₄.

Приготування розчину сірчаної кислоти відбувається у мірнику об'ємом 150 л, в який вносять 90 кг води та обережно додають 10 кг сірчаної кислоти (в перерахунку на активність кислоти).

Приготування розчину гідроксиду калію відбувається розрідженням концентрованого стандартного розчину до 10 % концентрації у мірнику.

Приготовані розчини зберігають 6 днів за температури 20–25 °С (до ТП 6.2.2, ТП 6.3.2, ТП 7.3, ТП 7.4, ТП 8).

ДР 6. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 6.1 Приготування поживного середовища для одержання інокуляту в посівному апараті об'ємом 15 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі технологічної схеми необхідно приготувати 8,4 л поживного середовища. Перелік та концентрація компонентів для приготування 8,4 л поживного середовища наведено у табл. 3.1.

					КР.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га		

**Таблиця 3.1 – Розрахунок вмісту компонентів
для приготування 8,4 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 8,4 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
екстракт кукурудзяний	30	252	I	5,6
екстракт дріжджовий	0,004	0,336		
глюкоза	60,7	509,88		
FeSO ₄	0,03	0,252	II	2,8
CaCl ₂	0,02	0,168		
MnCl ₂	0,007	0,0588		
CuSO ₄	0,0003	0,00252		
ZnSO ₄	0,01	0,084		
MgSO ₄	0,3	2,52		
K ₂ HPO ₄	0,3	2,52		

ДР 6.1.1 Приготування і стерилізація композиції I

На аналітичних вагах зважують по 252 г екстракту кукурудзяного; 0336 г екстракту дріжджового, 509,88 г глюкози. Наважки поміщаємо у збірник об'ємом 10 л, додаємо дистильовану воду до об'єму 5,6 л. Вміст ємності перемішуємо. Стерилізація відбувається у збірнику за температури 121°C упродовж 30 хв. Після стерилізації, колби охолоджують до 40 °C і зливають в одну ємність.

ДР 6.1.2 Приготування і стерилізація композиції II

На аналітичних вагах зважують компоненти II композиції, г: 0,252 FeSO₄; 0,168 CaCl₂; 0,0588 MnCl₂; 0,00252 CuSO₄; 0,084 ZnSO₄; по 2,52 MgSO₄ та K₂HPO₄.

Наважки поміщають у ємність об'ємом 5 л, додають дистильовану воду до об'єму 2,8 л. Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію корегують рівень рН, знижуючи його розчином сірчаної кислоти (від ДР 5.2)

					КР.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га		

до значення 4,0-4,5. Вміст ємності перемішують до повного розчинення реагентів. Отриманий розчин розливають по 1,4 л у три колби об'ємом 1 л кожна. Колби закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 131°C упродовж 40 хв. Після стерилізації, колби охолоджують до 40 °С.

У стерильних умовах композицію I (від ДР 6.1.1) змішують з композицією II (від ДР 6.1.2) і передають на стадію вирощування до ТП 7.3.

ДР 6.2 Приготування поживного середовища для одержання інокуляту в посівному апараті об'ємом 250 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 63,6 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 63,6 л поживного середовища наведено в табл. 3.2. Для засіву поживного середовища у ферментері необхідно внести 8,4 л рідкого інокуляту, тому сумарна кількість води для композиції становить 55,2 л.

**Таблиця 3.2 – Розрахунок вмісту компонентів
для приготування 92 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 92 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
екстракт кукурудзяний	30	2460	I	36,8
екстракт дріжджовий	0,004	0,368		
глюкоза	60,7	5 584,4		
FeSO ₄	0,03	2,76	II	18,4
CaCl ₂	0,02	1,84		
MnCl ₂	0,007	0,644		
CuSO ₄	0,0003	0,0276		
ZnSO ₄	0,01	0,92		
MgSO ₄	0,3	27,6		
K ₂ HPO ₄	0,3	27,6		

						Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	та		

ДР 6.2.1 Приготування і стерилізація композиції I

На аналітичних вагах зважують по 2460 г екстракту кукурудзяного; 0,368 г екстракту дріжджового, 5 584,4 г глюкози. Наважки поміщаємо у збірник і додаємо дистильовану воду до об'єму 36,8 л. Вміст збірника перемішуємо. Стерилізація відбувається у збірнику за температури 121°C упродовж 30 хв.

ДР 6.2.2 Приготування і стерилізація композиції II

На аналітичних вагах зважують компоненти II композиції, г: 2,76 FeSO₄; 1,84 CaCl₂; 0,644MnCl₂; 0,0276 CuSO₄; 0,92 ZnSO₄; по 27,6 MgSO₄ та K₂HPO₄.

Наважки поміщають у збірник і додають дистильовану воду до об'єму 18,4 л. Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію корегують рівень рН, знижуючи його розчином сірчаної кислоти (від ДР 5.2) до значення 4,0-4,5. Вміст збірника перемішують до повного розчинення реагентів і стерилізують за температури 131°C упродовж 40 хв.

Після охолодження до 40 °C у стерильних умовах композицію I (від ДР 6.2.1) змішують з композицією II (від ДР 6.2.2) і передають на стадію вирощування до ТП 7.4.

ДР 6.3 Приготування поживного середовища для одержання інокуляту в посівному апараті об'ємом 2000 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 1012 л поживного середовища (табл. 3.3). Для засіву поживного середовища у ферментері необхідно внести 92 л рідкого інокуляту, тому сумарна кількість води для композиції становить 920 л.

					КР.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га		

**Таблиця 3.3 – Розрахунок вмісту компонентів
для приготування 1012 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 1012 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
екстракт кукурудзяний	30	30360	I	600
екстракт дріжджовий	0,004	4,048		
глюкоза	60,7	61 428,4		
FeSO ₄	0,03	30,36	II	320
CaCl ₂	0,02	20,24		
MnCl ₂	0,007	7,084		
CuSO ₄	0,0003	0,3036		
ZnSO ₄	0,01	10,12		
MgSO ₄	0,3	303,6		
K ₂ HPO ₄	0,3	303,6		

ДР 6.3.1 Приготування і стерилізація композиції I

На аналітичних вагах зважують по 30360 г екстракту кукурудзяного; 4,048 г екстракту дріжджового, 61 428,4 г глюкози. Наважки поміщаємо у збірник, додаємо дистильовану воду до об'єму 600 л. Вміст збірника перемішуємо. Отриманий розчин стерилізуємо за температури 121°C упродовж 30 хв.

ДР 6.3.2 Приготування і стерилізація композиції II

На аналітичних вагах зважують компоненти II композиції, г: 30,36 FeSO₄; 20,24 CaCl₂; 7,084 MnCl₂; 0,3036 CuSO₄; 10,12 ZnSO₄; по 303,6 MgSO₄ та K₂HPO₄.

Наважки поміщають збірник, додають дистильовану воду до об'єму 320 л. Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію корегують

рівень рН, знижуючи його розчином сірчаної кислоти (від ДР 5.2) до значення 4,0-4,5. Вміст збірника перемішують до повного розчинення реагентів і стерилізують за температури 131°C упродовж 40 хв.

Після охолодження до 40 °С у стерильних умовах композицію I (від ДР 6.3.1) змішують з композицією II (від ДР 6.3.2) і передають на стадію біосинтезу до ТП 7.

ТП 7. Підготовка посівного матеріалу

ТП 7.1 Зберігання музейної культури

Вихідні музейні культури зберігають у вигляді конідій (сухих спор) у суміші зі стерильним активованим вугіллям або тальком у співвідношенні 1:2 відповідно. Оброблені вказаним способом конідії можна зберігати 1-2 роки.

ТП 7.2 Одержання посівного матеріалу

Перед використанням у промисловому біосинтезі конідії ретельно перевіряють на мікробіологічну чистоту та біохімічну активність.

Посівний матеріал вирощують на чашках Петрі з агаризованим середовищем упродовж 72 годин за температури 35 °С. Спори з поверхні чашок Петрі збирають рідким способом, використовуючи 5 мл стерильної води (до ТП 7.3).

ТП 7.3 Вирощування інокуляту в колбах на качалці

Поживне середовище – суміш композиції I (від ДР 6.1.1) та композиції II (від ДР 6.1.2), у кількості по 420 мл стерильно вносять у 20 колб в об'ємом 750 мл. До поживного середовища додають по 1 мл приготованої суспензії (від ТП 7.2). Через 24 години культивування починають корегувати вміст цукру внесенням за 2-3 прийоми розчину для підживлення (від ДР 5.1). Культивування проводять упродовж 96 годин на качалці за температури 35°C та швидкості перемішування 200 об/хв. (до ТП 7.4).

ТП 7.4 Вирощування в інокуляторі об'ємом 250 л

									Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га				КР.ПЗ.162.04	

Поживне середовище – суміш композиції I (від ДР 6.2.1) та композиції II (від ДР 6.2.2) стерильно вносять в інокулятор. До поживного середовища стерильно додають культуру, вирощену у колбах на качалці (від ТП 7.3). Через барботер в інокулятор подається стерильне повітря (від ДР 4.6). Відведення газів відбувається через спеціальні газовідвідні клапани, оснащені індивідуальними фільтрами на стадію знешкодження газоподібних відходів (до ЗВ 9.3).

Через 24 години культивування корегують вміст цукру в інокуляторі внесенням розчину для підживлення (від ДР 5.1). Через кожні 3 години культуральну рідину відбирають для здійснення мікробіологічного контролю.

Культивування проводять упродовж 96 годин за температури 35°C та швидкості перемішування 200 об/хв. (до ТП 8).

ТП 8. Біосинтез

У ферментер за допомогою мембранних насосів стерильно закачують поживне середовище: суміш композиції I (від ДР 6.3.1) та композиції II (від ДР 6.3.2). Із дотриманням асептичних умов вносять посівний матеріал (від ТП 7.4).

Через 24 години культивування починають корегувати вміст цукру внесенням за 2-3 прийоми розчину для підживлення (від ДР 5.1).

Культивування проводять при аерації, подаючи стерильне повітря (від ДР 4.6) об'ємом 330 л/год. вентиляційної ємності. Інтенсивне перемішування розчину зі швидкістю 350 об/хв. може призвести до утворення піни, гасіння якої відбувається механічним піногасником, яким оснащений ферментер. Температура культивування складає 35 °С, тривалість – 96 годин.

Через кожні 3 години відбирають зразки для здійснення мікробіологічного контролю. Постійному моніторингу підлягає рівень рН та температура здійснення біосинтезу.

									Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га				КР.ПЗ.162.04	

Стадію біосинтезу проводять до накопичення необхідної кількості цільового продукту.

ЗВ 9. Знешкодження відходів

ЗВ 9.1 Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи (від ДР 2.2.1, ДР 2.2.2, ДР 3.1, ДР 3.2, ДР 3.3, ДР 4.4) очищують, використовуючи багатоступеневу технологію очищення: фільтрацію, у т.ч. зворотнім осмосом, хімічне очищення, біологічне очищення.

ЗВ 9.2 Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи – використана пакувальна тара, у т.ч. для мийних та дезінфікувальних засобі (від ДР 2.11, ДР 2.12, ДР 2.13), відправляють до пунктів прийому вторинної сировини.

ЗВ 9.3 Знешкодження газоподібних відходів

Газоподібні відходи (від ДР 3.5, ТП 7, ТП 8) очищують на фільтрувальних установках, для чого використовують уловлювальні системи, біофільтри, озонування.

										Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га						

РОЗДІЛ 5 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

5.1 Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль є комплексом заходів для виявлення, ідентифікації та кількісної оцінки мікроорганізмів у різних середовищах.

Постійний мікробіологічний контроль на виробництві гарантує безпеку продукції, забезпечує підтримку її якості із дотриманням нормативних вимог, захищає здоров'я працівників та навколишнє середовище, допомагає уникнути економічних втрат, пов'язаних із забрудненням стерильних зон виробництва.

Регулярно здійснюється мікробіологічний контроль у приміщеннях. Контролю піддають воду та газоподібні викиди підприємства.

Регулярно здійснюють мікробіологічний контроль стерильних поживних середовищ. Дослідження проводять у чашках Петрі із поживним середовищем, придатним для виявлення грибів, дріжджів, бактерій.

Обов'язковим є визначення мікробіологічної чистоти культури *Aspergillus niger*. Дослідження включає постійний моніторинг культури, у т.ч. мікроскопічний аналіз.

5.2 Визначення продуктивності росту штаму

В лабораторії раз на місяць здійснюють контроль придатності штаму для виробництва лимонної кислоти [31].

					КР.ПЗ.162.04		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			
Розробив		Кужель А.А.				Літ.	Аркуш
Перевірив		Охмат О.А.					Аркушів
Н.Контр.					КНУТД, гр. ББТ-20		
Затвердив							

Кількість 1×10^5 спор мл^{-1} *A. niger* інокулюють у поживному середовищі при перемішуванні за температури $35\text{ }^\circ\text{C}$ впродовж 72 годин.

Діаметр міцеліальних гранул у ферментаційному бульйоні вимірювали за допомогою мікроскопіювання.

Міцелій збирають фільтрацією з відсмоктуванням у різні моменти часу, сушать до постійної маси у термостаті за температури $60\text{ }^\circ\text{C}$ упродовж 5 годин.

Сушу клітинну масу визначають за допомогою вагового методу.

5.3 Визначення концентрації джерела азоту

Визначення кількості загального азоту можна проводити, застосувавши метод К'ельдаля або метод Дюма.

Метод К'ельдаля є більш поширеним і може реалізовуватися як аналітичним шляхом, так і за умови застосування системи для визначення азоту (наприклад, Velp Scientifica).

Метод дослідження передбачає спалювання азотвмісної речовини у сірчаній кислоті у присутності каталізаторів; нейтралізацію кислоти, відгонку та визначення загального азоту титрометричним методом.

5.4 Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом карбону при культивуванні є глюкоза, її концентрацію можна визначити глюкозооксидазним методом. Глюкозооксидазний метод найбільш широко використовують для визначення глюкози в біологічних рідинах.

Принцип методу ґрунтується на здатності глюкози окиснюватись до глюконової кислоти та перекису водню в присутності глюкозооксидази. Перекис водню при цьому реагує з фенолом та 4-амінофеназоном з /утворенням хіноніміну, червоно-фіолетового забарвлення якого, можна визначити фотометричним методом.

										Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га						

КР.ПЗ.162.04

5.5 Визначення концентрація цільового продукту

Приблизно 20 мл ферментаційного бульйону в різні моменти часу збирають у пробірку, яку центрифугують при 10 000 об/хв. за температури 4 °С упродовж 5 хвилин. Супернатант видаляють у пробірку і поміщають на 10 хвилин на водяну баню при 80 °С. Зразок повторно центрифугують, а супернатант використовують для хімічного аналізу.

Для визначення концентрації лимонної кислоти ефективним також є використання газової хроматографії.

Визначення рівня рН проводять потенціометричним методом.

						Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га		

ВИСНОВКИ

1. У кваліфікаційній роботі вивчено основні властивості лимонної кислоти. Визначено сфери її застосування. Запропоновано використання лимонної кислоти для отримання лікарських засобів. Вивчено ринок лікарських засобів, що містять у складі лимонну кислоту, їх форми випуску, способи та дози прийому.

2. Проведено порівняльний аналіз ефективності використання штамів *A. niger* W5, *Aspergillus niger* CGMCC 5751, *A. niger* B60, *Y. lipolytica* W29 для отримання лимонної кислоти, в результаті якого виявлена доцільність культивування штаму *Aspergillus niger* CGMCC 5751. Вибір обґрунтовано високою продуктивністю обраного штаму та доцільністю його культивування на поживному середовищі низької вартості.

3. Проведено розрахунок потужності підприємства для здійснення біосинтезу лимонної кислоти.

4. Обґрунтовано схему біосинтезу лимонної кислоти, що включає допоміжні роботи, стадії підготовки до здійснення біосинтезу, стадію основного технологічного процесу, стадію знешкодження відходів. Розроблено технологічну схему проектної технології.

5. Обґрунтовано методи контролю на виробництві, які включають мікробіологічний контроль, контроль сировини та цільового продукту.

					КР.ПЗ.162.04			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Кужель А.А.			ВИСНОВКИ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Охмат О.А.						
Н.Контр.								
Затвердив								
						КНУТД, гр. ББТ-20		

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Citric Acid. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Citric-Acid> (дата звернення 14.05.2024).
2. Препарати. URL: <https://likicontrol.com.ua> (дата звернення 14.05.2024).
3. Carlos R. S., Vandenberghe P. S., Rodrigues C. New perspectives for citric acid production and application. *J. Food Technol. Biotechnol.* 2006. Vol. 44, № 2. P. 141–150.
4. Walid A. Lotfy, Khaled M. Ghanem, Ehab R. El-Helow. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. *Bioresource Technology.* 2007. Vol. 98, № 18, P. 3464–3469.
5. Haq Ikram-ul, Sikander Ali, M.A. Qadeer, Javed Iqbal, Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. *Bioresource Technology.* 2004. Vol.93, № 2. P. 125–130.
6. Wang L., Zhang J., Cao Z. et al. Inhibition of oxidative phosphorylation for enhancing citric acid production by *Aspergillus niger*. *Microb Cell Fact.* 2015. № 14(7). PMID: 25592678.
7. Roukas T., Kotzekidou P. Pomegranate peel waste: a new substrate for citric acid production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation under non-aseptic conditions. *Environ Sci Pollut Res.* 2020. № 27. P. 13105–13113.
8. Yuzbasheva E. Y., Agrimi G., Yuzbashev T. V., Scarcia P., Vinogradova, E. B., Palmieri L., ... Sineoky S. P. The mitochondrial citrate carrier in *Yarrowia lipolytica*: Its identification, characterization and functional significance for the production of citric acid. *Metabolic Engineering.* 2019. Vol.54. P. 264–274.
9. ПЕПТОН. URL: <https://shop.hlr.ua/ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html> (дата звернення 14.05.2024).

					КР.ПЗ.162.04			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Кужель А.А.			СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Охмат О.А.						
Н.Контр.						КНУТД, гр. ББТ-20		
Затвердив								

10. Агар-агар. URL: <https://shop.hlr.ua/ua/agar-pitatelnyy-dlya-opredeleniya-mikrobnogo-chisla-500-g-conda-138904.html> (дата звернення 14.05.2024).

11. Нітрат натрію. URL: https://all-him.com.ua/p/2164541-nitrit-natriya-pishchevoy-i-tehnicheskij-kupit-ot-1kg/?o=tG0FgrPrkLQIV3l-IMkrYg==&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&gad_source=1&gclid=CjwKCAjwuJ2xBhA3EiwAMVjkVMwqQ6EP5sHtPaqfKwiWp1ynptevGTBugnOSe7flbU4RfdevDm11JRoCcWEQAvD_BwE (дата звернення 14.05.2024).

12. Глюкоза. URL: https://prom.ua/ua/p1419360880-glyukoza-pischevaya.html?token=v2%3AzftNKfhIL0zKdebir9R80eFend6y3eG30ZNWjXjLnzZ_zQJl118eAiKKY7Co7yoS6JnzvHvE042Yji4-nn8UEGlsV4p7G08AZGqJ35iN1HzQbZ9_wP81lpiLuc78_3aQ&campaign_id=1245615&product_id=1419360880&source=prom%3Asearch%3Atag%3Aserp&locale=uk&category_ids=225&from_spa=true (дата звернення 14.05.2024).

13. Сахароза URL: <https://prom.ua/ua/p5251530-saharoza.html> (дата звернення 14.05.2024).

14. Сульфат магнію. URL: https://prom.ua/ua/p1640474784-sulfat-magniya-sernokislyj.html?token=v2%3AWpokwGB_EcwjeBnhDKOsGBoTbVKEov94DpgZPfdGAzx9PdJ8JFLRfvajAX7nAerjN7GoP_4VfzFB_2Na1Z5cHOe7Bfa4Rua_I7zFApanuSXOOv_sz_nIdyiunUfeiqTN&campaign_id=2897869&product_id=1640474784&source=prom%3Asearch%3Aserp&locale=uk&category_ids=11503&from_spa=true (дата звернення 14.05.2024).

15. Хлорне залізо. URL: <https://mychem.in.ua/ua/p1637555171-zhelezo-iii-hlorное.html> (дата звернення 14.05.2024)

16. Цинк сірчанокислий. URL: https://prom.ua/ua/p2073893638-tsink-sernokislyj.html?token=v2%3AtdgRiNoqJBEEhOFBtJKi5Cjnyxszqp8d3EedobKT_OzFsWFjDP13VO8wC74hbqIL1LcgW0L0zitG6gISwxafi0Ce8EZ_Gdv7W6Luib_QWvBP2zWB0uCvLrT50EWi0cDGhT&campaign_id=2070855&product_id=207

3893638&source=prom%3Asearch%3Aserp&locale=uk&category_ids=8020313&from_spa=true (дата звернення 14.05.2024).

17. Марганець хлористий. URL: https://prom.ua/ua/p277934134-marganets-hloristyj-vodnyj.html?token=v2%3AA3hTTgJI7W9zA7a3WcTvPjAh_RNwxncs8TicTz11-Rs0z_13VnBX0A6kF22MZyydeaF9qD7bm2QYLKp4_1v4xzZP58IrcXgqr6pwSa2NM9olscAck9LeTYRiBuvddk8m&campaign_id=1260300&product_id=277934134&source=prom%3Asearch%3Aserp&locale=uk&category_ids=8020313&from_spa=true (дата звернення 14.05.2024).

18. Екстракт кукурудзяний. URL: https://prom.ua/ua/p1310282824-ekstrakt-kukurudzyanij-litriv.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1_5297199152&gad_source=1&gclid=CjwKCAjwuJ2xBhA3EiwAMVjkVOXWzqoTZPrRyDkWc-1xzBhe1qdYC6AFQ55TCvGHesNIoDi46iKDgBoC5SQQAvD_BwE (дата звернення 14.05.2024).

19. Дріжджовий екстракт. URL: https://shop.hlr.ua/ua/drojjevoy-ekstrakt-500-g-conda-144107.html (дата звернення 14.05.2024).

20. Сульфат заліза. URL: https://ukrchemgroup.com/ua/p1092570608-sulfat-zheleza-zheleznyj.html (дата звернення 14.05.2024).

21. Кальцій хлорид. URL: https://prom.ua/ua/p1523798573-hlorid-kaltsiyu-kaltsij.html?token=v2%3AMfK1miRirhNjepPys4EOqc7qZJo3C95UcH6auoNkisaumd6E7OdPM-Yf9fqkvSbJF-OyU7Uu_UcJoXhSMQYJbG8dFPjysoVSEAf_So4wosBDE9cZTnoqa-G4imdYwJ6j&campaign_id=1566946&product_id=1523798573&source=prom%3Asearch%3Atag%3Aserp&locale=uk&category_ids=8020313&from_spa=true (дата звернення 14.05.2024).

22. https://pum.in.ua/goods/sulfat-magniya-300-u/ (дата звернення 14.05.2024).

					КР.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га		

23. Сульфат міді. URL: <https://dniprohimprom.com.ua/ua/p1884861271-sulfat-medi-med.html> (дата звернення 14.05.2024).

24. Калій фосфорнокислий. URL: <https://shop.hlr.ua/ua/kaliy-fosfornokislyu-piro-4-h-zam-ch-97813.html> (дата звернення 14.05.2024).

25. Порошок шкірки гранату. URL: <https://rozetka.com.ua/ua/358716567/p358716567/> (дата звернення 14.05.2024).

26. Soccol C.R., Vandenberghe P.S., Rodrigues C., Pandey A. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol Biotechnol*. 2006. № 44(2). P. 141–9.

27. Ruijter G.J.G, Kubicek C.P., Visser J. Production of organic acids by fungi. *Indust Appl*. 2002. № 10. P. 213–30.

28. Torres N.V. Modeling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid production by *Aspergillus niger*: I. Model definition and stability of the steady state. *Biotechnol Bioeng*. 1994. №44. P. 104–11.

29. Industrial Scale Bioreactors. URL: <https://lavallab.com/products/fermentor-bioreactor/industrial-bioreactors-fermenters/> (дата звернення 05.06.2024).

30. Установки для підготовки стисненого повітря. URL: <https://pneumatyka.com.ua/categories/zespo-y-przygotowania-sprezonego-powietrza/> (дата звернення 01.06.2024).

31. Atlas R.M. Handbook of Microbiological Media. 2nd ed. *CRC Pr I Llc*. 1997. P. 283–284.

					КР.ПЗ.162.04	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	га		

Додаток А

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Київський національний університет технологій та дизайну
Національний університет
«Чернігівський колегіум» імені Т. Г. Шевченка
Національний авіаційний університет
Університет Григорія Сковороди в Переяславі
Одеський державний аграрний університет
Донбаська державна машинобудівна академія (м. Тернопіль)
Академія прикладних наук
Вища школа управління та адміністрації в м. Ополе (Польща)



ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ

IX Всеукраїнської науково-практичної конференції
*«Інноваційні тенденції підготовки фахівців в умовах полікультурного та
мультилінійного глобалізованого світу»*

11 квітня 2024р.

Київ

Andrii Kuzhel

Kyiv National University of Technologies and Design (Kyiv)

Scientific supervisor - senior lecturer, Vitalina Denysenko

MICROORGANISMS – PRODUCERS OF CITRIC ACID

Citric acid is widely used as a flavor additive, acidity regulator and preservative in the food industry (food additives E330). It is found in almost all fruit and vegetable juices, confectionery products, juice-containing drinks. In the oil and fat industry, citric acid significantly reduces the possibility of rancidity of fats, margarines and animal oil.

In industry, citric acid is obtained using *Aspergillus niger* micromycetes [1]. This is due to the fact that *A. niger* is able to synthesize a large amount of citric acid on cheap nutrient media. As a rule, the components of such environments are cornmeal, molasses, etc. The industry also knows the synthesis of citric acid with the help of yeast *Yarrowia lipolytica*, which also grows on inexpensive substrates. However, when producing citric acid, yeast synthesizes isocitric acid in the environment, which complicates the isolation and purification of the finished product. Unlike yeast, *A. niger* mushrooms do not synthesize such byproducts as isocitric acid [2].

There is information in the literature [2] that citric acid can also be produced by other microorganisms, namely, the bacteria *Arthrobacter paraffinens*, *Bacillus licheniformis*, *Corynebacterium* ssp, as well as the yeast *Candida tropicalis*, *C. oleophila*, *C. guilliermondii*, *C. citroformans*, *Hansenula anomala* and *Yarrowia lipolytica*. However, the yield of citric acid cannot compete with industrial strains such as *A. niger* and *Y. lipolytica*.

Also, one of the modern trends is obtaining mutant strains capable of synthesizing a larger amount of citric acid. The authors [1, 3] obtained transformants

of *A. niger* (*A. niger* CGMCC 10142), which used corn starch as a substrate. This resulted in increased glucosamylase activity and decreased α -glucosidase activity in the transformed strains. Due to this, residual reducing sugars decreased by 88%, while the yield of citric acid increased by 17% [2]. This was confirmed by other researchers [3]. They described in their works that they obtained genetically engineered strains of *A. niger*, which reduced residual sugar by 10% and increased the yield of citric acid by 12% [3, 4].

Thus, it can be concluded that using genetic engineering methods of biotechnology, mutants capable of synthesizing an excess of citric acid can be obtained.

REFERENCES

1. Wang L., Cao Z., Hou L. (2016) The opposite roles of *agdA* and *glaA* on citric acid production in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*. Retrieved from: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7324-z>
2. Mores S., Porto de Souza Vandenberghe L., Irineudo Magalhães Júnior A., César de Carvalho J.(2020) Citric acid bioproduction and downstream processing: Status, opportunities, and challenges. *Bioresource Technology*. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.124426>.
3. W. Hu W. Li jian, Yang, H. quan, Chen, J. Hong.(2019) Current strategies and future prospects for enhancing microbial production of citric acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol*.
4. Ozdal M., Kurbanoglu E.B. (2019) Citric Acid Production by *Aspergillus niger* from Agro-Industrial By-Products: Molasses and Chicken Feather Peptone. *Waste and Biomass. Valorization*.