



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Завідувач кафедри  
біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ  
“ 01 ” листопада 2024 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ТУТИКА Олександра Геннадійовича  
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез каротиноїдів дріжджами *Rhodotorula glutinis*

керівник роботи РЕЗНИЧЕНКО Юрій Миколайович, доц., к.т.н.,  
( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: об'єм ферментера геометричний 1 м<sup>3</sup>, коефіцієнт заповнення 0,63

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика	01.11.2024-13.01.2024	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	01.11.2024-13.01.2024	
3	Техніко-економічне обґрунтування	14.11.2024-30.11.2024	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва	01.12.2024-15.12.2024	
5	Специфікація обладнання виробництва	16.12.2024-30.12.2024	
6	Опис технологічної схеми біосинтезу	09.01.2025-19.01.2025	
7	Контроль виробництва	20.01.2025-28.01.2025	
8	Охорона довкілля	29.01.2025-31.01.2025	
9	Оформлення пояснювальної записки	01.02.2025-07.02.2025	
10	Виконання графічної частини проекту	20.01.2025-07.02.2025	

Здобувач \_\_\_\_\_ Олександр ТУТИК  
 (підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи \_\_\_\_\_ Юрій РЕЗНІЧЕНКО  
 (підпис) (ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічної та апаратурної схем біосинтезу каратиноїдів штамом *Rhodotorula glutinis* strain YM25079, який синтезує 220,0 мг/л каратиноїдів. Каратиноїди захищають сітківку від вікових хвороб очей - катаракти та макулярної дегенерації. Однією з головних властивостей всіх каротиноїдів є антиоксидантний ефект, тобто боротьба з вільними радикалами, які пошкоджують клітини й викликають різноманітні хвороби. Ця боротьба допомагає імунній системі бути сильною і захищати організм від бактерій та вірусів.

Розрахована потужність біотехнологічного виробництва складає 4,8 кг каратиноїдів на рік. Технологічна схема біосинтезу каратиноїдів включає допоміжні роботи (підготовка стерильного аераційного повітря, приготування та стерилізацію поживних середовищ), а також безпосередньо технологічний процес три стадії вирощування інокуляту (у колбах на качалках, в інокуляторі об'ємом 10 л та інокуляторі об'ємом 100 л) та виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1,0 м<sup>3</sup> із коефіцієнтом заповнення 0,63.

Кваліфікаційна робота має у своєму складі вступ, дев'ять розділів, список використаної літератури (39 найменувань), технологічну (формат А1) та апаратурну (формат А1) схеми. Загальний обсяг роботи – 64 сторінок, 14 таблиць.

**Ключові слова:** каратиноїди, *Rhodotorula glutinis*, біосинтез, дріжджі.

## ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological and hardware schemes for the biosynthesis of carotenoids by the *Rhodotorula glutinis* strain YM25079, which synthesizes 220.0 mg/l of carotenoids. Carotenoids protect the retina from age-related eye diseases - cataracts and macular degeneration. One of the main properties of all carotenoids is the antioxidant effect, i.e. the fight against free radicals that damage cells and cause various diseases. This fight helps the immune system to be strong and protect the body from bacteria and viruses.

The estimated capacity of biotechnological production is 4.8 kg of carotenoids per year. The technological scheme of carotenoid biosynthesis includes auxiliary work (preparation of sterile aeration air, preparation and sterilization of nutrient media), as well as the technological process itself (three stages of growing seed material (in flasks on rockers, in inoculators with a volume of 10 l and 100 l) and biosynthesis in a fermenter with a volume of 1.0 m<sup>3</sup> with a filling factor of 0.63).

The qualification work consists of an introduction, nine sections, a list of used literature (40 items), technological (format A1) and hardware (format A1) schemes. The total volume of the work is 64 pages, 14 tables.

**Keywords:** carotenoids, *Rhodotorula glutinis*, biosynthesis, yeast.

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ЗМІСТ	6
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	10
1.1. Загальна інформація	
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	16
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	
2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	
2.3. Таксономічний статус біологічного агента	
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА КАРАТИНОЇДІВ	21
3.1. Потреба промисловості в каратиноїдах	
3.2. Обрахунок загальної потужності виробництва каратиноїдів	23
3.3. Розрахунок загальної кількості циклів проектованого виробництв	23
3.4. Розрахунок кількості необхідних етапів для підготовки посівного матеріалу	24
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	27
4.1. Катаболізм ростового субстрату у обраного біологічного агента	
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	28
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	30
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	
5.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря	31
5.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	33
5.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	36
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА КАРАТИНОЇДІВ	40
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА КАРАТИНОЇДІВ	43
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	48
8.1. Мікробіологічний контроль	50
8.2. Концентрація біомаси та каратиноїдів	52
8.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту	53
РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	55

9.1.Аналіз технологічної схеми виробництва каратиноїдів дріжджами <i>Rhodotorula glutinis</i>	55
9.2.Характеристика рідких відходів біосинтезу	56
9.3.Утилізація рідких відходів	57
9.4.Утилізація твердих відходів	58
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	61

## ВСТУП

Сучасна біотехнологія активно займається пошуком біологічно активних сполук, які синтезуються мікроорганізмами. Це дозволяє отримувати різноманітні продукти, що містять вітаміни, ліпіди, білки, мікроелементи та інші біологічно активні речовини через мікробний синтез. Каротиноїди є однією з найчисленніших і найбільш поширених груп природних пігментів. З кожним роком потреба в каротиноїдах зростає, що потребує розширення можливих джерел їх отримання. Нині каротиноїди можна отримати шляхом хімічного синтезу, мікробіологічних методів або екстракції з рослин.

Історично, каротиноїди почали досліджувати давно. Вперше каротин був виділений у 1831 році Вакенродером з ріпи та моркви, і саме він дав назву каротину (від латинського слова "carota" — морква). У 1961 році з епіфітної мікрофлори жита був виділений *Mycobacterium pheii*, який є активним біосинтетиком бета-каротину. Сьогодні попит на каротиноїдні препарати різко зріс, що пов'язано зі збільшенням інтересу до здорового способу життя. У західних країнах середнє споживання бета-каротину складає близько 3 мг/добу, а в США — до 1,5 мг/добу. Це створює потенційний попит на препарати, які містять каротиноїди, навіть в Україні.

Каротиноїди - це природні органічні пігменти синтезовані бактеріями, грибами, водоростями. Ці пігменти надають рослинам, овочам і фруктам яскраво-жовтий, червоний і оранжевий кольори.

На сьогоднішній день існує більше 600 різних типів каротиноїдів.

Деякі з найбільш поширених каротиноїдів включають:

- альфа-каротин
- бета-каротин
- бета-криптоксантин
- лютеїн

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.20 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Туттик О.Г.				<b>ВСТУП</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.								2 8
Керівник	Резніченко Ю.М.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

- зеаксантин
- лікопін

Альфа-каротин, бета-каротин і бета-криптоксантин можуть перетворюватися в організмі у вітамін А і називаються каротиноїдами провітаміну А. Решта перераховані каротиноїди не можуть бути перетворені в вітамін А. Замість цього вони називаються каротиноїдами, які не є провітаміном А. Для більшості людей бета каротин є основним джерелом вітаміну А.

Каротиноїди, які використовуються у вигляді харчових добавок або косметичних засобах, можуть запобігти передчасному старінню шкіри і захистити її від пошкоджень, викликаними сонячною радіацією. Вживання в їжу продуктів, багатих каротиноїдами, може захистити здорові клітини очі і запобігти зростанню ракових клітин.

# РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

## 1.1. Загальна інформація

У наукових колах сьогодні часто можна зустріти поняття "антиоксидантні вітаміни". Це пов'язано з тим, що у деяких вітамінів, які вже давно відомі та добре вивчені, нещодавно виявили нові хімічні властивості, що дало змогу повному зрозуміти їхню біологічну дію. У невеликих дозах, у складі збалансованого раціону, вони відіграють незамінну роль. Однак, перевищення рекомендованої дози може призвести до гіпервітамінозу та порушення роботи важливих систем організму. Звісно, тут йдеться про жиророзчинні вітаміни (водорозчинні не накопичуються в організмі). Розглянемо детальніше роль одного з представників цієї групи – каротиноїдів.



Каротиноїди – це природні пігменти, що виробляються рослинами та мікроорганізмами. Їхня ключова функція як у рослинних клітинах, так і в організмі людини полягає в захисті клітинних структур від пошкодження вільними радикалами. Найвідоміший представник цієї групи –  $\beta$ -каротин, який є попередником вітаміну А.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.20 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Лист</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.	Туттик О.Г.				<b>ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</b>	<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Акрушів</b>
Консульт.								6
Керівник	Резніченко Ю.М.					10		
Н. Контр.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

Антиоксидантні властивості каротиноїдів свідчать про їхню участь у багатьох внутрішньоклітинних процесах. В основі цих взаємодій лежить їхня висока здатність реагувати з вільними радикалами – нестабільними молекулами з неспареними електронами. Вільнорадикальні реакції можуть призвести до пошкодження біологічних мембран, зокрема через перекисне окислення ліпідів, що може спричинити різні патологічні стани. Антиоксидантна дія  $\beta$ -каротину та інших каротиноїдів допомагає пояснити їхню роль у запобіганні перекисному окисленню ліпідів, а також у захисті від онкологічних захворювань, вікових змін, радіаційного ураження та серцево-судинних захворювань.

Регуляторні ефекти каротиноїдів значною мірою пов'язані з їхньою здатністю вбудовуватися в мембранні структури клітин. Значна частина каротиноїдів, які ми отримуємо з їжею, накопичується в печінці, а менша кількість потрапляє в інші органи. Цікаво, що різні каротиноїди можуть конкурувати між собою: наприклад, якщо в раціоні є інші каротиноїди, накопичення  $\beta$ -каротину в клітинах може зменшитися. Водночас, у поєднанні з іншими жиророзчинними антиоксидантами, такими як  $\alpha$ -токоферол або коензим Q10, антирадикальний потенціал каротиноїдів може посилюватися. Однією з найважливіших функцій каротиноїдів є їхня радіозахисна дія. Вони здатні нейтралізувати ліпідні супероксидні радикали та зупиняти вільнорадикальні процеси, що виникають внаслідок радіаційного впливу на клітини. Дослідження показали, що лікопін, який міститься в помідорах, має вищі радіозахисні властивості, ніж  $\beta$ -каротин.

Каротиноїди, що виробляються мікроорганізмами, популярні на комерційному ринку завдяки їхньому природному походженню, яскравим відтінкам і простоті вирощування з коротшим часом виробництва. Здатність мікроорганізмів розщеплювати агропромислові відходи знижує загальну вартість синтезу каротиноїдів.

Каротиноїди відіграють важливу роль у запобіганні утворенню шкідливого холестерину, який є головним фактором ризику атеросклерозу –

серйозного захворювання сучасності. Розвиток атеросклерозу пов'язаний зі збільшенням рівня холестерину в крові та його накопиченням на стінках судин. Ці процеси напряду залежать від інтенсивності вільнорадикального окислення ліпідів, продукти якого в першу чергу вражають мембранні структури клітин судинних стінок.

Жиророзчинні антиоксиданти, такі як каротиноїди, здатні ефективно вбудовуватися в мембрани клітин, тим самим сповільнюючи розвиток перекисного окислення ліпідів і, відповідно, формування атеросклерозу. Дослідження показали, що такі каротиноїди, як кантаксантин і лікопін, швидко з'являються в сироватці крові після їх вживання.

Ефективність антиоксидантів залежить від їх близькості до місця утворення вільних радикалів. Оскільки жиророзчинні антиоксиданти вбудовуються безпосередньо в структуру мембран, вони здатні більш ефективно гальмувати процеси перекисного окислення ліпідів, ніж водорозчинні антиоксиданти.

Окрім цього, каротиноїди мають важливу антиканцерогенну активність. Статистичні дослідження свідчать про зниження ризику розвитку злоякісних новоутворень у людей, які регулярно вживають каротиноїди. Особливо важливо, що каротиноїди впливають на прогресуючі та пізні стадії канцерогенезу, знижуючи життєздатність ракових клітин. Вони також сприяють підвищенню імунного захисту організму та синтезу лімфоцитів, які відповідають за імунітет.

Каротиноїди - це група природних пігментів, що мають широкий спектр біологічної активності завдяки своїй унікальній хімічній структурі. Їх гідрофобність зумовлює здатність взаємодіяти з різними компонентами клітин, забезпечуючи антиоксидантний захист та інші важливі функції.

Завдяки своїм різноманітним біологічним властивостям, каротиноїди відіграють важливу роль у підтримці здоров'я та профілактиці багатьох захворювань. Регулярне споживання продуктів, багатих на каротиноїди, таких

як овочі та фрукти яскравого забарвлення, є важливим компонентом здорового харчування.

Активне вивчення біологічних функцій каротиноїдів триває, і нові дослідження постійно розширюють наші знання про їхню роль у метаболізмі та їхній потенціал для створення нових продуктів і терапевтичних стратегій. Поглиблене розуміння механізмів дії каротиноїдів відкриває перспективи для розробки ефективних методів профілактики та лікування різних захворювань, а також для створення продуктів з оптимальним вмістом цих цінних речовин для підтримки здоров'я людини [1].

Найбільш поширені каротиноїди мають дві кільцеві структури на кінцях, з'єднані між собою ланцюжком подвійних зв'язків, який називається хромофором. До них належать як прості вуглеводневі каротини, такі як  $\beta$ -каротин, так і ксантофіли, що містять гідроксильні групи на кінцевих кільцях, наприклад, зеаксантин та лютеїн. Окрім каротинів та ксантофілів, існує ще одна група каротиноїдів, яка містить кисень у своїй структурі. Ці сполуки називаються кето-каротиноїдами. Кисень в них присутній у формі кето-групи ( $=O$ ), яка може бути розташована в різних місцях молекули. Деякі кето-каротиноїди також містять додаткові гідроксильні групи ( $-OH$ ) - астаксантин.

Каротиноїди, як правило, не містять ароматичних кілець у своїй структурі. Проте, існують деякі винятки, коли ці циклічні структури зустрічаються в молекулах каротиноїдів у мікобактеріях і ціанобактеріях а також морських губках [2, 3]. Аналогічно, моноциклічні каротиноїди такі як торулін зустрічаються дуже рідко. Вони були виявлені в каротиноносних дріжджах видів *Rhodotorula* і *Phaffia* [4]. Деякі бактерії синтезують короткі каротиноїди C30 з попередника C15 фарнезил дифосфата або синтезують подовжені C45 і C50 каротиноїди. Прикладами таких екзотичних каротиноїдів є стафілоксантин (C30), який був визначений у *S. aureus* і у декількох інших видів [5], а також декапреноксантин (C50) із *S. glutanicum* [6]. Каротиноїди вперше з'явилися у примітивних організмах, ймовірно, як ліпідні молекули, щоб зміцнити мембрани за допомогою їх жорсткого кон'югованого подвійного

зв'язку. Каротиноїди – це не просто пігменти, що надають забарвлення рослинам та іншим організмам. Вони виконують багато важливих функцій, серед яких особливе місце займають участь у фотосинтезі та захист від шкідливого впливу світла. Молекули каротиноїдів здатні поглинати світло у діапазоні 450-570 нм, який частково збігається з діапазоном поглинання хлорофілу. Завдяки цьому каротиноїди можуть виступати як допоміжні пігменти, що розширюють спектр світла, доступного для фотосинтезу. Вони збільшують ефективність забору світла, що особливо важливо для рослин, які живуть в умовах недостатнього освітлення. Каротиноїди також відіграють важливу роль у захисті клітин від пошкодження світлом. Їхні молекули мають особливу будову, яка дозволяє їм ефективно поглинати надлишок енергії збудження та перетворювати її на тепло. Цей процес запобігає утворенню активних форм кисню, які можуть пошкодити клітинні структури. Кількість подвійних зв'язків у молекулі каротиноїду впливає на його колір та спектральні властивості. Змінюючи структуру каротиноїдів, організми можуть адаптувати їх для виконання різних функцій. Наприклад, вважається, що для ефективного збору світла оптимальна кількість подвійних зв'язків становить 9-11 [7]. Усі хлорофототрофи, в тому числі деякі еубактерії, водорості і вищі рослини, які використовують бактеріохлорофіл і/або хлорофіл для поглинання світла, синтезують високий рівень каротиноїдів. Фототрофність також може залежати від апокаротиноїду ретиналю (C20), який утворюється шляхом розщеплення молекули  $\beta$ -каротину або інших каротиноїдів у різних організмах, що синтезують каротиноїди, таких як деякі протеобактерії, археї і навіть гриби [3]. Однак, у всіх організмів, найбільш важливі загальні функції каротиноїдів можуть бути пов'язані з їх фотопротекторними та антиоксидантними властивостями. У тварин, наявність каротиноїдів пояснює велику кількість яскравих кольорів ссавців, птахів, риб, ракоподібних, мух і метеликів. Ці організми, включаючи людину, не можуть синтезувати каротиноїди, але повинні отримувати їх зі свого раціону. У деяких випадках вони також можуть бути отримані від симбіотичних або патогенних

мікроорганізмів. Цікаво, що перше виключення з цієї парадигми було виявлено нещодавно. Аналіз секвенованого геному горохової попелиці *Acyrtosiphon pisum* привів до 49 відкриття ендогенного кластеру генів біосинтезу каротиноїдів, який, мабуть, був введений в геном тлі за допомогою горизонтального переносу генів з патогенного гриба [8]. Ця зміна призводить до припинення формування торуліну, який відповідає за червоний колір тіла. В наш час гарно описані функції каротиноїдів, які вони виконують в організмі людини і їх користь для здоров'я [9]. Ці функції включають їх головну роль як антиоксидантів, властивість  $\beta$ -каротину як провітаміну А, також роль каротиноїдів в запобіганні дегенерації жовтої плями ока та інші.

## РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

*Rhodotorula glutinis* – це дріжджі, що є перспективними мікроорганізмами, що мають високу синтетичну активність корисних метаболітів, помірну вибагливість до складу поживного середовища та умов культивування. Вони є прототрофними мікроскопічними грибами що швидко ростуть. Цей вид дріжджів здатен продукувати досить широкий спектр біологічно активних речовин (БАР): ліпіди, екзополісахариди, ергостерол, багато цінних ферментів, а також каротиноїди, а саме  $\beta$ -каротин, торулін, торулародин і незначну кількість зеаксантину. [11]

Мікробіологічний синтез є більш ефективним методом у порівнянні з екстракцією з овочів або хімічним синтезом. Найважливіші переваги процесу включають можливість знизити витрати за рахунок використання вдосконалених штамів і недорогих (часто відходів) джерел вуглецю та азоту в культуральних середовищах а також можливість отримувати цільовий продукт круглий рік. [13].

Узагальнені дані щодо біосинтезу каратиноїдів *Rhodotorula glutinis* наведено у табл. 2.1. Найбільшу кількість каратиноїдів синтезує *Rhodotorula glutinis* strain YM25079 (220,0 мг/л) [10], у той час як *Rhodotorula glutinis* – 117,78 мг/л [11]. Найнижча концентрація каратиноїдіду спостерігалася за культивування *R. glutinis* var. *rubescens* LOCKR13 (3,55 г/л) [12]. (табл.2.1):

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.20 КР ПЗ</b>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Туттик О.Г.				Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							4
Керівник	Резніченко Ю.М.				16		
Н. Контр.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Зав. каф.	Стабніков В.П.						
					<b>ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</b>		

Таблиця 2.1

БА	Склад поживного середовища	Умови культивування	Загальна кількість вироблених каротиноїдів, mg/l	Джерело
<i>Rhodotorula glutinis</i> strain YM25079	Глюкоза 20,0г/л Дріжджовий екстракт 10,0г/л Пептон 10,0г/л Бутират натрію 1,1 г/л	t =37 °C, τ=120 год, рН=6,0 відсутність сторонньої мікробіоти	220	Huang, X.; Fan, J.; Guo, C.; Chen, Y.; Qiu, J.; Zhang, Q. Integrated Transcriptomics and Metabolomics Analysis Reveal the Regulatory Mechanisms Underlying Sodium Butyrate-induced Carotenoid Biosynthesis in <i>Rhodotorula glutinis</i> . <i>J. Fungi</i> 2024, 10, 320. <a href="https://doi.org/10.3390/jof10050320">https://doi.org/10.3390/jof10050320</a>
<i>R. glutinis</i> var. <i>rubescens</i> LOCKR13	Відвар картоплі	t =28 °C, τ=72 год, n=150 об/хв, рН=4,0-7,0 відсутність сторонньої мікробіоти	3,55	Anna M. Kot a, *, Stanisław Błażej a, Agnieszka Kurcz a, Joanna Bryś b, Iwona Gientka a, Anna Bzducha-Wróbel a, Magdalena Maliszewska a, Lidia Reczek Effect of initial pH of medium with potato wastewater and glycerol on protein, lipid and carotenoid biosynthesis by <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Electronic Journal of Biotechnology</i> 01 February 2017
<i>Rhodotorula glutinis</i> X-20	Глюкоза 20,0г/л Дріжджовий екстракт 10,0г/л Пептон 20,0г/л Пальмова олія 2,0г/л	t =30 °C, τ=120 год, n=150 об/хв, рН=6,0 відсутність сторонньої мікробіоти	117,78	Carotenoid Biosynthesis: Genome-Wide Profiling, Pathway Identification in <i>Rhodotorula glutinis</i> X-20, and High-Level Production <i>Front. Nutr.</i> , 17 June 2022 <i>Sec. Food Chemistry</i> Volume 9 - 2022 <a href="https://doi.org/10.3389/fnut.2022.918240">https://doi.org/10.3389/fnut.2022.918240</a>

## Вартість поживних середовищ при культивування БА каратиноїдів

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
1	2	3	4	5	6
<i>Rhodotorula glutinis</i> strain YM25079	Глюкоза	20,00	60,00	1,20	
	Пептон	10,0	1200,0	12,0	
	Дріжджовий екстракт	10,00	1800,00	18,00	
	Бутират натрію	1,1	275	0,3	
Вартість 1 л середовища – 31,50 грн					
<i>R. glutinis</i> var. <i>rubescens</i> LOCKR13	Відвар картоплі		25	25	
	Вартість 1 л середовища – 25,00 грн				
<i>Rhodotorula glutinis</i> X-20	Глюкоза	20,00	60,00	1,20	
	Пептон	20,0	1200,0	24,0	
	Дріжджовий екстракт	10,00	1800,00	18,00	
	Пальмова олія	2,0	145,0	0,29	
Вартість 1 л середовища – 43,49 грн					

Примітка \* – Ціни зазначено станом на червень 2024 р.

1 – <https://www.atbmarket.com>,

2 – <https://prom.ua/ua>.

3 – <http://lab-mir.com/>.

4 – <https://fresh.co.ua/>,

5 – <https://www.systopt.com.ua/>,

6 – <https://express.auchan.ua/>.

**Умовна вартість 1 мг каратиноїдів, синтезованого різними продуцентами**

Біологічний агент	Концентрація каратиноїдів, мг/л	Тривалість культивування, год	Кількість утворених каратиноїдів за годину, мг/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 мг цільового продукту, грн/мг
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Rhodotorula glutinis</i> strain YM25079	220	120	1,83	31,50	0,14
<i>R. glutinis</i> var. <i>rubescens</i> LOCKR13	3,55	72	0,049	25,00	7,04
<i>Rhodotorula glutinis</i> X-20	117,78	120	0,98	43,49	0,37

Для фінішного вибору найкращого біологічного агента розраховуємо умовну вартість 1 мг цільового продукту (табл. 2.3). Дані, відображені у табл. 2.3, доводять, що кількість утворених каратиноїдів за 1 год є найвищою у *Rhodotorula glutinis* strain YM25079 (1,83 мг/год), одночасно умовна вартість каратиноїдів синтезованого штамом *Rhodotorula glutinis* strain YM25079, є найнижчою (0,14 грн/мг). Враховуючи це, а також зазначені вище концентрації синтезованих каратиноїдів і тривалості культивування штамів, найбільш оптимальним продуцентом є *Rhodotorula glutinis* strain YM25079.

## 2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

*Rhodotorula glutinis* вважається типовим видом цього роду, вперше було описано Георгом Фресенієм у 1850 році. Спочатку дані дріжджі віднесли до *Cryptococcus glutinis*.

Більшість дріжджів, що входять до виду, є мезофільні, хоча деякі з них процвітають за нижчих температур, і вони є аеробними мікроорганізми,

характеризуються рожевими, гладкими колоніями з вологим виглядом. Клітини мають сферичну, еліпсоїдальну або витягнуту форму. *R. glutinis* розмножуються безстатевим шляхом багатостороннім або полярним брунькуванням; певні штами утворюють залишковий псевдоміцелій .

### **Фізіолого-біохімічні ознаки.**

Зазвичай *R. glutinis* зростає при оптимальній температурі 37 °С і вимагає мінімальної активності води 0,92, рН 6,0. Ріст пригнічується 100 мг/кг або менше бензойної кислоти або сорбінової кислоти та рН 4 або вище. Гриб не може рости на солодово-оцтовому агарі або середовищі MY50G. У зрілому віці клітини досягають діаметру 3-5 мкм і мають круглу, овальну або витягнуту форму, розташовуючись у вигляді мукоїдних колоній. Вуглеводи в клітині включають глюкозу, галактозу та маннозу. *R. glutinis* є жаростійким, що є рідкістю у дріжджів, максимальна температура яку вони можуть витримувати 62,5 °С протягом 10 хвилин. *R. glutinis* тісно пов'язаний з *Rhodotorula mucilaginosa*, відрізняються лише здатністю використовувати нітрат як джерело азоту, який *R. glutinis* не може засвоїти [14].

### **2.3. Таксономічний статус біологічного агента**

Сучасна (філогенетична) класифікація для *R. glutinis* наведена згідно [www.mycobank.org](http://www.mycobank.org).

- Домен – *Fungi*
- Відділ – *Basidiomycota*
- Клас – *Microbotryomycetes*
- Родина – *Sporidiobolales*
- Рід – *Rhodotorula*
- Вид – *Rhodotorula glutinis*

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА КАРАТИНОЇДІВ

### 3.1. Потреба промисловості в каротиноїдах

Каротиноїди - це природні органічні пігменти синтезовані бактеріями, грибами, водоростями. Ці пігменти надають рослинам, овочам і фруктам яскраво-жовтий, червоний і оранжевий кольори.

На сьогоднішній день існує більше 600 різних типів каротиноїдів.

Деякі з найбільш поширених каротиноїдів включають:

- альфа-каротин
- бета-каротин
- бета-криптоксантин
- лютеїн
- зеаксантин
- лікопін

Альфа-каротин, бета-каротин і бета-криптоксантин можуть перетворюватися в організмі у вітамін А і називаються каротиноїдами провітаміну А. Решта перераховані каротиноїди не можуть бути перетворені в вітамін А. Замість цього вони називаються каротиноїдами, які не є провітаміном А. Для більшості людей бета каротин є основним джерелом вітаміну А.

В наш час гарно описані функції каротиноїдів, які вони виконують в організмі людини і їх користь для здоров'я. Ці функції включають їх головну роль як антиоксидантів, властивість  $\beta$ -каротину як провітаміну А, також роль каротиноїдів в запобіганні дегенерації жовтої плями ока та інші.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.20 КР ПЗ</b>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Туттик О.Г.			<b>ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>								4
<i>Керівник</i>		Резніченко Ю.М.				<b>Кафедра БТМ 21</b>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		Стабніков В.П.						

З віком, зазвичай після 40 років, багато людей стикаються з природною зміною зору, яка називається пресбіопія. Її також називають "віковою далекозорістю", хоча це не зовсім точне визначення. Пресбіопія – це не захворювання, а скоріше фізіологічний процес, пов'язаний зі змінами кришталика ока. Кришталик, який відповідає за фокусування зображення на сітківці, з віком втрачає свою еластичність. Це призводить до того, що він втрачає здатність змінювати свою форму і, відповідно, фокусуватися на близьких предметах. Люди з пресбіопією можуть відчувати труднощі з розгляданням предметів, розташованих на близькій відстані, приблизно 20-30 см. Це може проявлятися в тому, що: важко читати текст, особливо дрібний шрифт; предмети поблизу здаються розмитими; необхідно відсувати текст або предмет далі від очей, щоб побачити його чітко; виникає втома очей, головний біль під час роботи зблизька [15].

Згідно із даними Головного управління статистики у Івано-Франківській області [16], станом на 2022 рік проживає 670,840 тис. людей віком від 40 років і старше. Відповідно до даних компанії ЕКСІМЕР падіння зору після досягнення віку 40 років неодмінне [15].

Відповідно до інструкції на вітаміни для очей Окювайт Лютеїн Форте 1 таблетка препарату містить 6,5 мг каротиноїдів, термін вживання до 12 тижнів, в розрахунках приймемо 22 дні, спосіб застосування під час прийому їжі по одній таблетці на добу [17].

Потреба в каротиноїдах для населення Івано-Франківській області старше 40 років наведена в таблиці 3.1.

*Таблиця 3.1.*

**Розрахунок необхідної потреби у каротиноїдах необхідних при лікуванні на короткозорість**

Кількість населення в Івано-Франківській області старше 40 років, чол.	Тривалість лікування, днів	Кількість таблеток на добу	Вміст каротиноїді в 1 таблетці, мг	Кількість каротиноїдів, мг
670840	22	1	6,5	95930120

### 3.2. Обрахунок загальної потужності виробництва каратиноїдів

Оскільки на ринку України є постачальники каратиноїдів пропоную забезпечувати потребу у 5%

Враховуючи цей факт, пропонуємо виробляти каратиноїди для задоволення 5 % від загальної потреби, оскільки на ринку присутня конкуренція:

$$95930120 \text{ мг} \cdot 0,05 = 4\,796\,506 \text{ мг}$$

Знаючи цю інформацію, можна розрахувати необхідної кількості культуральної рідини, знаючи, що отримати під час культивування штаму *Rhodotorula glutinis* strain YM25079, синтезується 220,0 мг/л каратиноїдів протягом 120 год [6]:

$$4\,796\,506 / 220 = 21802,3 \text{ л}$$

Далі розраховуємо загальні втрати під час етапів виділення каратиноїдів із культуральної рідини які складають 20 %:

$$21802,3 \text{ л} / (1 - 0,2) = 27\,253 \text{ л}$$

### 3.3. Розрахунок загальної кількості циклів проектного виробництва каратиноїдів та об'єму виробничого ферментера

Далі розраховуємо, який об'єм культуральної рідини можна отримати за цикл біосинтезу. Згідно із цими даними розраховуємо кількість необхідних етапів підготовки посівного матеріалу. Прийmemo, що кількість робочих трудоднів ( $T_{рд}$ ) = 300, тоді кількість культуральної рідини на добу ( $V_{д}$ ) становитиме:

$$V_{д} = C / T_{рд} = 27\,253 / 300 = 90,84 \text{ л}$$

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

$$V_{цк} = \frac{K_1 \cdot V_{д} \cdot T_{цф}}{24} = \frac{1,15 \cdot 90,84 \cdot 128}{24} = 557,1 \text{ л/цикл}$$

який включає тривалість виробничого біосинтезу (120 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год).  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій  $K_1 = 1,1 - 1,5$ .

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

$$V_{\Gamma} = \frac{V_{\text{пц}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{557,1}{0,65} = 857,1 \text{ л}$$

Найближчим за об'ємом є стандартний ферментер на 1,0 м<sup>3</sup> (V<sub>ф</sub>).

Уточнюємо коефіцієнт заповнення для обраного ферментера:

$$K_{\text{зап}} = V_{\Gamma} / V_{\text{ф}} = 557,1 / 1\,000 = 0,56.$$

Розраховане число не перевищує заданого значення, а отже, об'єм ферментера підібраний правильно.

### **3.4. Розрахунок кількості необхідних етапів для підготовки посівного матеріалу**

Отже, за виробничий цикл можна одержати V<sub>пц</sub> = 557,1 л культуральної рідини. Також слід врахувати, що при одержанні культуральної рідини, можливими є її втрати у результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря (E<sub>ф</sub>), які складають 10%.

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

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{пц}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 557,1 / (1 - 0,1) = 619 \text{ л}$$

Встановлена доза для посівного матеріалу складає від 5 до 10 % від об'єму поживного середовища. Приймаємо такий показник X<sub>пм1</sub> = 10%. Тому, із врахуванням дози посівного матеріалу X<sub>пм1</sub> робочий об'єм ферментера V<sub>роб1</sub> складе:

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

Звідси, об'єм поживного середовища V<sub>пс1</sub> буде:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 619 / (1 + 0,1) = 562,7 \text{ л}$$

тоді об'єм посівного матеріалу V<sub>пм1</sub> складе

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 619 - 562,7 = 56,3 \text{ л}$$

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

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 56,3 / (1 - 0,10) = 62,6 \text{ л.}$$

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

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 62,6 / (1 + 0,1) = 56,9 \text{ л,}$$

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

Далі слід розрахувати об'єм посівного матеріалу для посівного апарату, який становить  $V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 62,6 - 56,9 = 5,7 \text{ л.}$

Інокулят об'ємом  $V_{\text{роб.2}} = 62,6 \text{ л}$  можна отримати протягом вирощування штаму у посівному апараті з геометричним об'ємом  $V_{\text{ін2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 62,6 / 0,65 = 96,3 \text{ л.}$  Для цього обираємо найближчий за розміром стандартний посівний апарат  $V_{\text{спа}} = 100 \text{ м}^3$ . Перерахований коефіцієнт заповнення складатиме:

$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сін}} = 62,6 / 100 = 0,63$ . Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів (0,55-0,65)

Посівний матеріал об'ємом 5,7 л можна отримати шляхом вирощування в інокуляторі із врахуванням подальших втрат у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10).

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

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 5,7 / (1 - 0,1) = 6,33 \text{ л.}$$

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

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 6,33 / (1 + 0,1) = 5,75 \text{ л,}$$

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

Об'єм посівного матеріалу для інокулятора становить  $V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 6,33 - 5,75 = 0,58 \text{ л.}$

Відповідну кількість посівного матеріалу  $V_{\text{роб.3}} = 6,33 \text{ л}$  можна отримати під час культивування бактеріального штаму в інокуляторі з геометричним

об'ємом  $V_{інз} = V_{роб.3} / K_{зап} = 6,33 / 0,65 = 9,74$  л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{сін} = 10$  л та уточнюємо попередньо встановлений коефіцієнт заповнення.

$K_{зап3} = V_{роб.3} / V_{сін} = 6,33 / 10 = 0,63$ . Одержане значення перебуває у межах, прийнятих для ферментерів межах для аеробних процесів (0,55-0,65).

Посівний матеріал об'ємом  $V_{пм4} = 0,58$  л можна одержати культивуванням штаму у колбах на качалці. Для цього застосовують качалочні колби об'ємом  $V_{колб} = 750$  мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ .

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} \cdot K_{зк}) = 580 / (750 \cdot 0,2) = 3,87, \text{ отже, } 4 \text{ колби.}$$

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 качалочні колби.

Можна зробити висновок, що процес одержання посівного матеріалу для проведення виробничого біосинтезу каратиноїдів у ферментері об'ємом  $1,0 \text{ м}^3$  за коефіцієнту заповнення 0,63 буде проходити у 3 етапи. Узагальнена інформація стосовно кількості стадій виробництва каратиноїдів наведена у табл. 3.2.

Таким чином за результатами розрахунків, можна зробити висновок, що для біосинтезу каратиноїдів потрібно встановити один ферментер об'ємом  $1,0 \text{ м}^3$ , один посівний апарат об'ємом 100 л та один інокулятор об'ємом 10 л.

*Таблиця 3.2*

**Кількість стадій та апаратів, необхідна підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу каратиноїдів**

№ стадії	Геометричний об'єм обраного апарату, $V_г$ , л	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$ , частка	Робочий об'єм апарата, $V_{роб}$ , л	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$ , л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$ , л
1	2	3	4	5	6
1	1000	0,62	619	562,7	56,3
2	100	0,63	62,6	56,9	5,7
3	10	0,63	6,33	5,75	0,58
4	0,75×4 колби	0,2	—	0,58	0,58

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

### 4.1. Катаболізм ростового субстрату у обраного біологічного агента

*R. glutinis* strain YM25079 як джерело вуглецю може використовувати прості вуглеводи. Схему метаболізму глюкози *R. glutinis* strain YM25079 у KEGG не наведено, тому припустимо що катаболізм буде відбуватися наступним шляхом.

Використовуючи як основу для створення катаболічного шляху глюкози катаболізм цукрів – гліколіз (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), що представлений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes для заданого мікроорганізму, можемо навести схему перетворення глюкози (рис. 4.1).  $\alpha$ -D-Глюкоза за участю ферменту гексокінази (КФ.2.7.1.1) перетворюється на  $\alpha$ -D-глюкозу-6-фосфат. Далі за дії глюкозо-6-фосфат ізомераз (КФ 5.3.1.9) перетворюється на  $\beta$ -D-фруктозу-6-фосфат. Після цього фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11) активує перетворення попередньої сполуки у  $\beta$ -D-фруктозу-1,6-фосфат. Фруктозодифосфатальдоза (КФ.4.1.2.13) діє на  $\beta$ -D-фруктозу-1,6-фосфат з подальшим утворенням гліцеральдегід-3-фосфату та діоксіацетонфосфату, який під дією тріозофосфатізомераз (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат. Гліцеральдегід-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12) в свою чергу зумовлює перетворення гліцеральдегід-3-фосфату на 1,3-дифосфогліцерат. Той під дією фосфогліцераткінази (КФ.2.7.2.3) переходить у 3-фосфогліцерат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на 3-фосфогліцерат індукує його перетворення на 2-фосфогліцерат. В подальшому під дією енолази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфогліцерат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40). Таким чином, схему катаболізму глюкози у заданого мікроорганізму *Saccharomyces cerevisiae* шляхом гліколізу наведено на рис. 4.1.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.20 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Туттик О.Г.			<b>БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.								3
Керівник		Резніченко Ю.М.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.						27		
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

Глюкоза Глюкозо-6-фосфат Фруктозо-6-фосфат Фруктозо-1,6-дифосфат  
 Гліцеральдегід-3-фосфат 1,3-Дифосфогліцерат 3-Фосфогліцерат 2-  
 Фосфогліцерат Фосфоенолпіруват Піруват

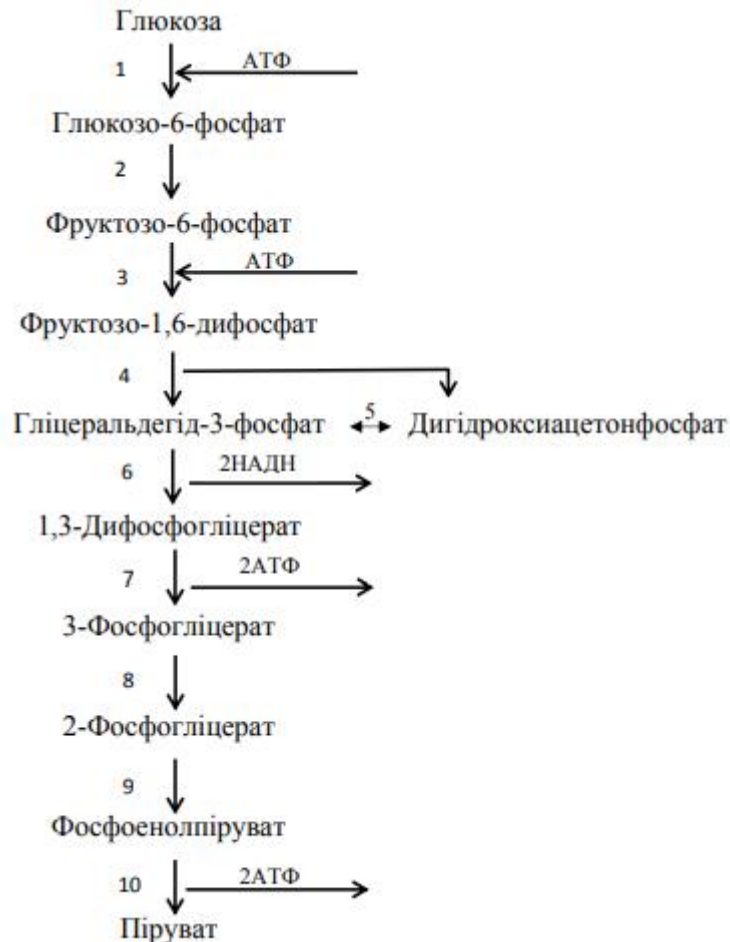


Рис. 4.1. Катаболізму глюкози у *R. glutinis*. Шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса

#### 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Утворення первинного C5-попередника. Стартовою сполукою в біосинтезі каротиноїдів є ацетат. Дві молекули ацетил-КоА конденсуються з утворенням ацетоаце-тил-КоА, який в свою чергу конденсується ще з однією молекулою ацетил-КоА, утворюючи 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА. При відновленні цієї сполуки утворюється мевалонова кислота (МВК), остання в присутності АТФ фосфорилується з утворенням пірофосфату МВК. У присутності АТФ шляхом декарбоксілювання і дегідрування пірофосфат МВК перетворюється в

5 вуглецеву ізопренову одиницю - ізопентенілпірофосфат . (рис.2.4). 2. Біосинтез безбарвних С40-полієнів з С5-попередника. Ізопентенілпірофосфат (ІПФ) ізомеризується до стадії диметилалілпірофосфата (ДМАПФ). Потім відбувається конденсація ІПФ і ДМАПФ з утворенням геранілпірофосфата (ГПФ-синтазою). Ці сполуки, що містять 10 атомів вуглецю, конденсуються з ІПФ і утворюють фарнезилпірофосфат (ФПФ-синтазою), з якого шляхом подальшої конденсації виникає 20-вуглецева одиниця – геранілгеранілпірофосфат (ГГПФ-синтазою). Останній димеризується (Фітоїн-синтазою), утворюючи фітоїн (7,8,11,12,7', 8', 11', 12' -октагідро-ш-ш-каротин) - перший С40- попередник каротиноїдів.

## РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Умови і спосіб культивування безпосередньо залежать від фізіолого-біохімічних особливостей біологічного агента.

1. Вирощування посівного матеріалу, а також промислове культивування проводиться за рН 6,0 і температурного режиму 37 °С [10]. Проте такий температурний режим збільшує ризики контамінації сторонніми мікроорганізмами, в основному нейтрофілами та мезофілами. Тому процес виробництва каратиноїдів має протікати у асептичних умовах, що забезпечується стерилізацією комунікацій, обладнання, повітря, поживного середовища.

2. Промисловий біосинтез каратиноїдів можна проводити як періодичним так і безперервним способами. Добре відомо, що максимальний рівень синтезу каратиноїдів досягається у стаціонарній фазі росту, незважаючи на те, що каратиноїди накопичуються протягом всього росту продуцента, тому продуктивність біосинтезу цільового продукту при виборі безперервного способу культивування буде знижуватися. Крім того, протягом безперервного культивування є ризик отримати продукт із зміненими реологічними властивостями. Тому доцільніше обрати періодичний тип культивування.

3. Для культивування продуцента глибинний спосіб культивування є більш доцільним, оскільки під час такого способу культивування компоненти поживного середовища споживаються раціональніше, що в свою чергу зменшує кількість відходів.

4. У процесі одержання посівного матеріалу, починаючи із культивування в колбах і закінчуючи культивуванням в 1,0 м<sup>3</sup> ферментері, Відповідно до інформації, наведеної у статті [10], тривалість

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.20 КР ПЗ</b>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	Гутик О.Г.				<b>ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>								7
<i>Керівник</i>	Резніченко Ю.М.					30		
<i>Н. Контр.</i>						<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Зав. каф.</i>	Стабніков В.П.							

культивування складає 120 год.

Підсумовуючи вище вказане, культивування продуцента каратиноїдів здійснюється періодично в аеробних умовах із дотриманням асептики проведення процесу.

Вибір та оснащення ферментера залежить від умов культивування та фізіолого-біохімічними особливостей продуцента біологічного агента. Оскільки вирощування продуцента буде здійснюватися глибинним способом, необхідно обрати обладнання ферментеру аби підтримати стабільне дотримання умов культивування.

1. Продуцент каратиноїдів є аеробом, тому ферментер повинен бути обладнаний барботером для підтримання необхідного рівню кисню та містити газоаналізатор з метою контролю концентрації CO<sub>2</sub>.

2. Ферментація протікає за значення рН (6,0), отже ферментер має бути обладнаний датчиком для контролю рівню рН.

3. Для підвищення ефективності масообміну необхідно застосувати перемішуючу турбінну мішалку відкритого типу з можливістю регулювати кількістю обертів.

4. Культивування має протікати при стабільній температурі (37 °C), отже ферментер має бути обладнаний сорочкою, а також датчиком температури.

5. Щоб уникнути утворення піни, необхідно застосувати механічний спосіб піногасіння, а саме встановити мішалку у верхній частині ферментеру, що буде обертатися і зменшувати рівень піноутворення.

Ферментер на 1,0 м<sup>3</sup>, можна придбати у компанії «ВХВІО» (Китай). Асептичний ферментер містить все необхідне для процесу культивування: датчики температури, тиску, рН, швидкості обертання мішалки, автоматичною системою мийки і стерилізації CIP/SIP.

## **5.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря**

Будь-яке біотехнологічне виробництво вимагає подачі стерильного повітря, оскільки це необхідно як для підтримання росту продуцента і здійснення біосинтезу у виробничому обладнанні, так і для забезпечення

відповідних класів чистоти у виробничих і лабораторних приміщеннях, а також створення комфортних умов мікроклімату для персоналу. Атмосферне повітря, насичене мікроорганізмами і частинками пилу, потребує попередньої підготовки та очищення перед подачею до чистих приміщень. З цією метою «сире» атмосферне повітря проходить через систему кондиціонування та різноманітні фільтри. Основні етапи цієї системи такі [7]:

- **Забір атмосферного повітря:** За допомогою турбокомпресора здійснюється забір повітря з висоти 20–30 м через спеціальні шахти.
- **Попереднє очищення:** Повітря проходить через фільтри грубої очистки для зниження концентрації пилу та захисту тендітних фільтрів і механізмів від пошкоджень.
- **Стиснення:** Повітря стискається до тиску 0,35–0,5 МПа за допомогою турбокомпресора.
- **Термічна обробка:** Стиснене повітря нагрівають до 120–250°C за допомогою калорифера, після чого його охолоджують і конденсують вологу, яка видаляється краплевловлювачем.
- **Основна фільтрація:** Підготоване повітря подається на фільтри з панелями із скловолокна або базальту з пористими перегородками (діаметр пор 15–50 мкм), де відбувається основне очищення до 98% мікроорганізмів.
- **Фільтрація тонкої очистки:** Очищене повітря подається по трубопроводах через фільтри тонкої очистки (ефективність 99,999%) у виробничі зони, обладнання та лабораторні приміщення, де проводяться роботи з мікроорганізмами.

### **5.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища**

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 1,0 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,62. Підготовка посівного матеріалу відбувається у три стадії (в колбах на качалці, у посівних апаратах об'ємом 10 і 100 л).

Згідно із інформацією із статті [10], склад поживного середовища має такий вигляд (г/л):

- Глюкоза 20,0г/л
- Дріжджовий екстракт 10,0г/л
- Пептон 20,0г/л
- рН середовища – 6,0.

Для виробничого біосинтезу необхідно додати 10ммоль  $\text{Na}(\text{C}_3\text{H}_7\text{COO})$ . Молярна маса 110,09г/моль.

Для максимальної ефективності процесу біосинтезу необхідно забезпечити стерильність поживного середовища, яке використовується для культивування дріжджів *Rhodotorula glutinis*. Тому компоненти поживного середовища потрібно розподілити на окремі композиції, щоб правильно визначити відповідні режими стерилізації.

Для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках використовується невелика кількість поживного середовища, яке стерилізують в автоклаві. На наступних етапах, таких як отримання інокуляту та промисловий біосинтез, підготовку компонентів середовища виконують в окремих реакторах-змішувачах або безпосередньо у ферментаційному обладнанні.

### **5.3.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках**

На цьому етапі, для отримання потрібного об'єму інокуляту, необхідно підготувати 580 мл стерильного поживного середовища. Готове середовище розподіляють у 4 стерильні колби для качалок, кожна з яких має об'єм 750 мл. Стерилізацію компонентів середовища проводять в автоклаві за таким порядком:

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

Глюкоза, дріжджовий екстракт, пептон є термолабільними речовинами. Стерилізацію композиції А здійснюють в автоклаві.

Таблиця 5.1

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 580 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	20,00	11,6	А	0,58
Пептон	20,00	11,6		
Дріжджовий екстракт	10,00	5,8		
Вода	580			
Усього			580 мл	

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

Підготовка посівного матеріалу передбачає приготування 5,75 і 56,9 л стерильного поживного середовища

*Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л*

Для цієї стадії необхідно 5,75 л поживного середовища, склад композиції та умови їх стерилізації аналогічні пункту 5.2.1. Композиція А розчиняємо у реакторі-змішувачі об'ємом 10 л за допомогою відцентрового насоса перекачуємо для стерилізації в інокулятор об'ємом 10 л.

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

Таблиця 5.2

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,75 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	20,00	126,6	А	5,75
Пептон	20,00	126,6		

Дріжджовий екстракт	10,00	63,3		
Вода	5,23л			
Конденсат	0,52			
Усього			5,75 л	

*Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л*

Для цієї стадії необхідно 56,9 л поживного середовища, склад композиції та умови їх стерилізації аналогічні пункту 5.2.1. Композиція А розчиняємо у реакторі-змішувачі об'ємом 100 л за допомогою відцентрового насосу перекачуємо для стерилізації в інокулятор об'ємом 100 л.

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

*Таблиця 5.3*

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 56,9 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	20,00	1252	А	56,9
Пептон	20,00	1252		
Дріжджовий екстракт	10,00	626		
Вода	48,87л			
Конденсат	4,9			
Усього			56,9 л	

**5.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу**

Для цієї стадії необхідно 562,7 л поживного середовища, склад композиції та умови їх стерилізації аналогічні пункту 5.2.1. Композиція А стерилізується у реакторі-змішувачі об'ємом 1000 л.

**Стерилізація композицій компонентів для культивування в ферментері  
об'ємом 1,0 м<sup>3</sup>**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 562,7 л середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	20,00	12,38	А	554,2
Пептон	20,00	12,38		
Дріжджовий екстракт	10,00	6,19		
Вода	475,7 л			
Конденсат	47,6			
Бутират натрію	1,1	0,681	Б	8,5
Вода	7,1			
Конденсат	0,71			
Усього				562,7 л

Крім того, необхідно передбачити реактори для розчинення композицій, об'ємами: 10 л, 100 л і 1000 л.

#### 5.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Важливим для забезпечення виробництва продукції відповідної якості і високої мікробіологічної чистоти є забезпечення високого стану санітарії на підприємстві. Підготовка виробничих приміщень на підприємстві включає в себе ряд заходів: вологе прибирання, дезінфекцію і ультрафіолетове опромінення настінними світильниками стін, підлог, стель, поверхні обладнання та комунікацій. Підготовка виробничих приміщень ділиться на щоденну і генеральну. Після кожної зміни у чистих приміщеннях проводиться щоденне вологе прибирання.

З метою попередження набуття мікроорганізмами резистентності до миючих засобів, слід змінювати засоби для дезінфекції один раз в 2 місяці. З метою охорони безпеки життєдіяльності людини і запобігання небажаних для людини наслідків до дезінфікуючих речовин, які використовуються у фармацевтичній промисловості висуваються наступні вимоги: широкий спектр антимікробної дії; безпека для людини; мінімальні

корозійна активність; легка розчинність у воді та висока активність; відсутність різкого запаху; стійкість при зберіганні; низька ціна [36].

**Каустична сода**, також відома як гідроксид натрію або їдкий натр, є хімічною сполукою з формулою NaOH. Щодо зовнішнього вигляду - біла кристалічна речовина, що має вигляд білих, непрозорих та дуже гігроскопічних кристалів; щодо розчинності - добре розчиняється у воді, при цьому виділяється значна кількість тепла. [36].

*Каустична сода*, є хімічною речовиною, яка потребує особливої обережності при поводженні. Її агресивні властивості можуть становити серйозну загрозу для здоров'я людини. Контакт каустичної соди зі шкірою та слизовими оболонками може викликати сильне подразнення, аж до хімічних опіків. Потрапляння каустичної соди в очі може призвести до серйозних пошкоджень, включаючи ураження сітківки та погіршення зору. Вдихання пилу каустичної соди може завдати шкоди верхнім дихальним шляхам та легеням. Ковтання каустичної соди може призвести до серйозних опіків слизових оболонок та інших ускладнень [36].

Концентрація каустичної соди у миючому розчині не повинна перевищувати:

- 0,2 % - з використанням ручного миття обладнання;
- 2,0 % - з використанням механічного способу миття обладнання

[36].

**Біомой** - це багатокomпонентний та біоактивний миючий засіб з дезінфікуючим ефектом, розроблений в Україні (ТУ У 22902465.005-96). Він рекомендований Міністерством охорони здоров'я України та затверджений для використання Головним державним санітарним лікарем України [37].

**Біомой** має бактерицидну дію проти таких бактерій, як *E.coli*, *S.aureus*, *Ps. Aeruginosa*, *C. albicans* та *A.niger*, навіть у мінімальній концентрації 0,05%.

Засіб має високі змочувальні, мийні та емульгуючі властивості. Він

ефективно видаляє різноманітні забруднення, зокрема: білкові, механічні, жирові, технічні (мастильні матеріали), біологічні виділення (кров, сироватка, ліквор, мокротиння, фекалії), залишки лікарських та дезінфекційних засобів.

**Біомой** підходить для очищення зовнішніх поверхонь та внутрішніх каналів медичних виробів. Він також сприяє гомогенізації мокротиння та інших виділень.

Водні розчини Біомою зберігають свої мийні властивості навіть за низьких температур (до 5°C) та у жорсткій воді. Засіб також сприяє пом'якшенню жорсткої води.

**Біомой** класифікується як помірно небезпечна речовина при потраплянні до шлунку (3 клас безпеки) та мало небезпечна при нанесенні на шкіру (4 клас безпеки). Він не має шкірно-резорбтивних, шкірно-подразнювальних та сенсibiliзуючих властивостей.

У формі порошку Біомой може подразнювати слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів. Проте, у рекомендованих концентраціях він не викликає подразнення. Засіб не має мутагенних, канцерогенних та ембріотоксичних властивостей (згідно з діючою речовиною).

Використання робочих розчинів Біомою для очищення медичних виробів не становить загрози для повітря робочої зони, оскільки засіб не містить летких компонентів. За ступенем летючості Біомой належить до малонебезпечних речовин (4 клас безпеки).

Під час роботи з Біомою слід дотримуватися правил безпеки, використовувати засоби індивідуального захисту та уникати контакту засобу зі шкірою та слизовими оболонками. У разі потрапляння засобу на шкіру або в очі, необхідно негайно промити уражену ділянку великою кількістю води та звернутися до лікаря [37].

Дезінфікуючий засіб «ЕСТЕР ДЕЗ» (на основі над оцтової кислоти НОК) використовується:

для проведення низькотемпературної дезінфекції заздалегідь

вимитого технологічного устаткування (резервуарів, ємностей, теплообмінників, ліній розливу, пакування і фасування), інвентарю, тари методом циркуляції, зрошування, занурення; а також в закритих автоматизованих системах миття (CIP-миття) на підприємствах молочної, пивобезалкогольної та лікєро-горілочаної промисловості; для біоцидної обробки різних поверхонь і виробів; для боротьби з пліснявою та профілактикою її появи; для дезінфекції санітарно-побутових приміщень;

**ЕСТЕР ДЕЗ** - це високоефективний дезінфікуючий засіб, що має широкий спектр дії, знищує бактерії, грибки та спори, а також ефективний проти вірусів, діє навіть за низьких температур та короткого часу впливу (15-30 хвилин), засіб ефективний проти різних видів мікроорганізмів, включаючи спороутворюючі бактерії, кишкову паличку та дріжджі, є екологічно безпечним, оскільки після використання розкладається на кисень, воду та оцтову кислоту, у мікроорганізмів не розвивається стійкість до цього дезінфікуючого засобу.

**ЕСТЕР ДЕЗ** проявляє сильну бактерицидну активність проти спороутворюючих бактерій, кишкової палички та дріжджів навіть у низькій концентрації (0,015-0,1%).

Однією з важливих переваг **ЕСТЕР ДЕЗ** є його екологічна безпека. Після використання він розкладається на речовини, які не завдають шкоди навколишньому середовищу: кисень, воду та оцтову кислоту[38].

Склад: надоцтова кислота 8,0-16,0 %; перекис водню 16,0-26,0 %; оцтова кислота 12,5-20,5 %; стабілізуюча добавка і вода - до 100,0 % [38].

## РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА КАРАТИНОЇДІВ

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрозабірник	2	Пристрій забірний, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень. ФОП Юрескул. Виробник: Україна
Ф – 2	Фільтр грубої очистки повітря	2	Фільтруючий матеріал – поліестер, марка фільтру G4, 2*20, видалення пилу розміром більше 10 мкм, E = 80 %[18].
К – 3	Компресор	1	ГВИНТОВИЙ КОМПРЕСОР ATLASCORCO GA11 Компанія ТОВ "ПРОМТЕХСЕРВІС ГРУП", потужність 11 кВт, продуктивність 1,69 м <sup>3</sup> /хв, 1498 x 699 x 1240 [19].
ТО – 4	Теплообмінник-охолоджувач	2	Витрата: до 500 м <sup>3</sup> /год Робочий тиск: 120 атм. Температура: -20 ° С +220 °С Нержавіюча сталь AISI 316 Фреоновий охолоджувач Канал-ФКО-40-20, 730 x 300 x 283 [20].
Р – 5	Ресивер	1	Ресивер повітряний Лідер 16 бар 900 л. РВ900.818.01 (Україна), об'єм 900 л, 902x1002x2237 [21].
ТН – 6	Теплообмінник-нагрівач	2	Кількість повітря, м <sup>3</sup> /год: 7500 Необхідна теплова потужність, кВт (від -100С до +200С): 80 кВт, 1000x500x200 [22].
Ф – 7	Фільтр тонкої очистки	1	Модель фільтра FMW. Ступінь очищення повітря 99%. Продуктивність фільтра складає 1000 м <sup>3</sup> /год, 610x610x78 [23].

**НУХТ БТЕК 05.01.20 КР ПЗ**

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Гуттик О.Г.			СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА КАРАТИНОЇДІВ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.								3 40
Керівник		Резніченко Ю.М.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

Продовження таблиці 6.1.

РЗ-9 РЗ-11 РЗ-12 РЗ-14		Реактор – змішувач	7	Реактор-змішувач об'ємом 10л,100л, 1000л, 15л оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі AISI 316L. Виробник: Україна, 480 x 480 x 1560, 700 x 700 x 1500, 1400 x 1400 x 2400 [24].
НВ-10 НВ-23 НВ-24 НВ-33		Насос відцентровий	4	Виробник: <i>Pedrollo</i> Насос відцентровий Максимальна температура робочої рідини: 90 град. Максимальний напір: 38 м Мінімальна температура робочої рідини: -10 град. Напруга мережі: 220 В Пропускна здатність: від 5 до 40 л/хв [25].
НП-16		Насос перистальтичний	1	Перистальтичний насос 253D Виробник: Україна Технолог Плюс Напруга мережі: 220 В, 70W/ Швидкість потоку мл/хв 20-3500 180 мм. x 210 мм. x 360мм [36]
ОВД-13		Об'ємно- ваговий дозатор	5	Дозатор марки ВДВ-8 Дозатор напіваавтоматичний. 2-30кг, 1100 x 1000 x 1800 Виробник: Україна [26].
ІН-25 ІН-27		Інокулятор	3	Біореактор геометричний об'єм 10 л- Biostat® Cplus,, 100л - BIOSTAT® D DCU швидкість перемішування 20–1500об/хв, потужність 800Вт Виробник SARTORIUS, Німеччина [27].
Ф-26 Ф-28 Ф-30		Індивідуальний фільтр очистки повітря	4	Фільтр НЕРА : Н14 класу Н14 компанії «NEW FILTER». Вогнетривкий. Фільтруючий матеріал – мікроскловолокно або боросилікат з анодовими

				<p>алюмінієвими розділювачами.          Номінальна пропускна здатність – 2000 м3.          Ефективність: <math>E = 99,995\%</math>.          Виробник: Італія [28].</p>
ФР-31		Ферментер	1	<p>Ферментер геометричний об'єм 1000 л, максимальна робоча температура + 150 0С, потужність двигуна до 10 кВт [29].</p>

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА КАРАТИНОЇДІВ

Технологічна схема виробництва каратиноїдів дріжджами *Rhodotorula glutinis* включає в себе допоміжні роботи (підготовка і стерилізація поживних середовищ, приготування та стерилізація підживлюючих розчинів) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, біосинтез цільового продукту). Технологічна схема виробництва каратиноїдів (складається з доферментаційних процесів і виробничого біосинтезу) наведено у графічній частині проекту.

### ***ДР 1. Підготовка аераційного повітря***

#### ***ДР 1.1. Забір атмосферного повітря***

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником (ПЗ-1) у найвищій точці Н = 11 м.

#### ***ДР 1.2. Очистка від грубих домішок***

Попередню очистку повітря здійснюють на тканинному фільтрі грубого очищення (Ф-2). Очистка від грубих домішок проводиться з ефективністю  $E = 80\%$ , затримуються частинки  $\delta > 10$  мкм.

#### ***ДР 1.3. Компресіювання повітря***

Для забезпечення умов аерації та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері, інших опорів, а також для інших потреб виробництва, повітря стискають у компресорі (К-3), відбувається нагрівання до 120-200 °С, тиск становить 1,0 МПа.

#### ***ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи***

Стиснене повітря (від ДР 1.3) необхідно охолодити в теплообмінникуосушувачі (ТО-4) до температури 25-30 °С для видалення надлишкової вологи. Зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де усуваються пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.20 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Лист</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Туттик О.Г.			ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА КАРАТИНОЇДІВ	<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Акрушів</b>
Консульт.								43
Керівник		Резніченко Ю.М.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

роботу подальших фільтрів очищення повітря. Вологість повітря має становити 60-70%.

#### ***ДР 1.5. Нагрівання повітря***

Повітря (від ДР 1.4) нагрівають до температури 45-50 °С у теплообміннику нагрівачі (ТН-6). Вологість повітря має становити 50%.

#### ***ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі***

Нагріте повітря (від ДР 1.5) надходить на головний фільтр (Ф-7), установлений біля ферментаційних відділень. Ступінь очищення повітря має становити 95%.

#### ***ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі***

Повітря (від ДР 1.6) подається безпосередньо в індивідуальні фільтри (ІФ26, ІФ-28, ІФ-30) кожного біореактора (до ТП 2.4, ТП 2.5, ТП 3.1). Ступінь кінцевої очистки повітря становить  $E = 99,995\%$

### ***ДР 2. Приготування та стерилізація поживного середовища.***

***ДР 2.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці.***

Для вирощування інокуляту потрібно 580 мл поживного середовища (ПС).

#### ***ДР 2.1.1 Приготування і стерилізація композиції А***

На технічних вагах зважують 11,6 г глюкози, 11,6 г пептону та 5,8 г дріжджового екстракту і поміщають в колбу об'ємом 1000 мл. Додають 580 мл питної води і перемішують до розчинення компонентів після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Після цього стерилізують в автоклаві при 112°C 30 хв.

***ДР 2.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л***

#### ***ДР 2.2.1 Приготування і стерилізація композиції А***

На технічних вагах зважують 126,6 г глюкози, 126,6 г пептону та 63,3 г дріжджового екстракту і поміщають в реактор об'ємом 10 л (РЗ-9). Додають за допомогою об'ємно-вагового дозатора 5,23 л питної води і перемішують до

розчинення компонентів. Для кращого розчинення компонентів у сорочку збірника подають глуху пару. Після розчинення композицію А подають за допомогою насоса (НВ-10) до інокулятора (ІН-25), де проводять стерилізацію за 112°C 30 хв.

***ДР 2.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л***

***ДР 2.3.1 Приготування і стерилізація композиції А***

На технічних вагах зважують 1252 г глюкози, 1252 г пептону та 626 г дріжджового екстракту і поміщають в реактор об'ємом 100 л (РЗ-11). Додають за допомогою об'ємно-вагового дозатора 48,87 л питної води і перемішують до розчинення компонентів. Для кращого розчинення компонентів у сорочку збірника подають глуху пару. Після розчинення композицію А подають за допомогою насоса (НВ-23) до інокулятора (ІН-27), де проводять стерилізацію за 112°C 30 хв.

***ДР 2.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>***

***ДР 2.4.1 Приготування і стерилізація композиції А***

На ваговому дозаторі зважують 12,38 кг глюкози, 12,38 кг пептону та 6,19 кг дріжджового екстракту і поміщають в реактор об'ємом 1000 л (РЗ-12). Додають за допомогою об'ємно-вагового дозатора 475,7 л питної води і перемішують до розчинення компонентів. Для кращого розчинення компонентів у сорочку збірника подають глуху пару. Після розчинення композицію А подають за допомогою насоса (НВ-24) до виробничого ферментера (ФР-31), де проводять стерилізацію за 112°C 30 хв.

***ДР 2.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б***

На технічних терезах зважують 681 г бутирату натрію, поміщають в реактор об'ємом 15 л (РЗ-14). Додають за допомогою об'ємно-вагового дозатора 7,1 л питної води і перемішують до розчинення компонентів. Для кращого розчинення компонентів у сорочку збірника подають глуху пару. Після розчинення композицію Б стерилізують за 131°C 40 хв.

### ***ТП 3. Підготовка посівного матеріалу***

#### ***ТП 3.1. Підтримання колекційної культури***

Колекційну культуру *Rhodotorula glutinis* RCMB 028001 зберігають у пробірках зі скошеним сусли - агаром. Це найпоширеніший метод зберігання штамів. Переваги цього способу – це простота і доступність. Пересіви здійснюють через 2-3 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

#### ***ТП 3.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі***

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках зі скошеним СА, розсівають петлею із ізольованих колоній на чашки Петрі, які також містять СА і вирощують при температурі 30 °С упродовж 24 год.

#### ***ТП 3.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі***

Отримані ізольовані колонії (від ТП3.2) пересівають в пробірки зі скошеним СА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). У пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 24 год.

#### ***ТП 3.4. Вирощування культури в колбах на качалках***

Для вирощування рідкого посівного матеріалу, у 4 стерильних качалочних колбах об'ємом 750мл, в асептичних умовах наливають по 140 мл посівного середовища від ДР 2.1.

У пробірку з робочою культурою *R. glutinis*, вирощеною на СА, вносять 5 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують дріжджову суспензію, одержану з однієї пробірки.

Вирощування *R. glutinis* ведуть у колбах на круговій качалці (150 об/хв) при температурі 30±2°С впродовж 24 год.

Після завершення вирощування здійснюють мікробіологічний контроль в кожній з колб. В асептичних умовах інокулянт з 4 колб переносять в стерильну засівну колбу об'ємом 1 л

### ***ТП 3.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі***

#### ***об'ємом 10 л***

В інокулятор (ІН-25) об'ємом 10 л з простерилізованою композицією А об'ємом 5,75 л через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 3.4).

Культивування здійснюють при температурі 30°C упродовж 24 год, з аерацією. Кожні 3-4 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль.

### ***ТП 3.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі***

#### ***об'ємом 100 л***

В інокулятор (ІН-27) об'ємом 100 л з простерилізованою композицією А об'ємом 56,9 л подають інокулянт (через трубу перетискування від ТП 3.5).

Культивування здійснюють при температурі 30°C упродовж 24 год, з аерацією. Кожні 3-4 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль.

## ***ТП 4. Виробничий біосинтез***

### ***ТП 4.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1,0 м<sup>3</sup>***

В ферментер (Ф-31) об'ємом 1 м<sup>3</sup> з простерилізованою композицією А об'ємом 562,7 л подають інокулянт (через трубу перетискування від ТП 3.6).

Культивують до концентрації біомаси та концентрації каратиноїдів 220 мг/л, при температурі 30°C упродовж 120 год.

## РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Під час біосинтезу регулярно контролюються такі параметри: концентрація біомаси, джерело вуглецю та джерело азоту, концентрація каратиноїдів. Також виконується ступінчастий контроль.

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кт 1.2 Очищення від пилу і механічних часточок	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Стиснення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	P=0,35–0,5 МПа t=200 °C
Кт 1.4 Охолодження та видалення вологи	Охоложене повітря	Термометр технічний	Під час проведення операції	t = 25-40°C W=50-70°
Кт 1.5 Стабілізація та нагрівання	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 60 °C
Кт 1.6 Очищення в головному фільтрі	Очищене повітря	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на тиждень	E = 99,92 %
Кт 1.7 Очищення повітря в індивідуальному у фільтрі	Очищення повітря в індивідуальному у фільтрі	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на місяць	E = 99,995 %

**НУХТ БТЕК 05.01.20 КР ПЗ**

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		ТґТИК О.Г.			Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							7
Керівник		Резніченко Ю.М.			48		
Н. Контр.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Зав. каф.		Стабніков В.П.					

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Кт, Км 2.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічни й контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа t = 112 °С τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічни й контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа t = 112 °С τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічни й контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа t = 112 °С τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.4.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічни й контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічни й контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа t = 112 °С τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1 Підтримання колекційної культури	Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічни й контроль	Температура визначається безперервно під час збереження, мікробіологічни й контроль після збереження	t = 4 °С 2-3 місяці відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічни й контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічни й контроль після культивування	t = 30°С, τ = 120 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.3 Вирощування культури на агаризованому середовищі	Тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічни й контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічни й контроль після культивування	t = 30°С, τ = 120 год, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 3.4 Вирощування в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безпосередньо під час виробничого процесу.	$t = 30^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 120$ год, 150 об/хв, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 3.5 Вирощування в інокуляторі 10л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН - метр мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	$t = 30^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 120$ год, 150 об/хв, рН6.6, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 3.6 Вирощування в інокуляторі 100л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН - метр мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	$t = 30^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 120$ год, 150 об/хв, рН6.6, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 4.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, каратиноїдів	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, непрямий метод визначення біомаси за оптичною густиною	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4 год	$t = 30^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 120$ год, 300 об/хв., рН6.6, Конц. кар. =220,00мг/л Відсутність сторонньої мікробіоти

### 8.1. Мікробіологічний контроль

Оскільки вирощування *Rhodotorula glutinis* strain YM25079 для отримання каратиноїдів проводиться в стерильних умовах, потрібен мікробний контроль на різних етапах, щоб гарантувати відсутність забруднення.

Кожні 4 години з ферментера відбирали для аналізу 20 мл зразків культуральної рідини для аналізу.

Мікробний контроль здійснювали двома способами: мікроскопією та висів на агаризовані поживні середовища.

Мікроскопія проводиться під світловим мікроскопом. Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, у стерильних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину досліджувано зразка. Використовують бактеріальне кільце (діаметр мазка близько 1 см) для розподілу крапель, що містять мікроорганізми, на склі. Мазок сушать при кімнатній температурі без нагрівання до повного випаровування вологи. У полі зору слід спостерігати лише клітини біологічного агента *Rhodotorula glutinis*: клітини округлої, овальної або витягнутої форми, розміром 3-5 мкм. Статеве розмноження здійснюється базидіоспорами. Відмінною рисою цього виду та його близьких родичів є інтенсивний жовтий і червоний пігмент, який утворюється під час росту на більшості субстратів. [31].

Після використання вати, змоченої в етанолі, протріть лінзу світлового мікроскопа.

Для визначення мікробної чистоти культуральну рідину диспергували на чашці Петрі з м'ясопептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій (інкубують 24–48 год за температури  $28 \pm 2$  °C), і на чашки з сусло–агаром (СА) або глюкозо–картопляним агаром (ГКА) для виявлення дріжджів і грибів (інкубують 7 діб за температури  $28 \pm 2$  °C). Для цього в стерильних умовах відбирають 0,1 мл суспензії піпеткою і вносять у чашку Петрі. Шпатель Дригальського пропалюють, охолоджують і проводять ним по кришці чашки Петрі. Далі обачно розподіляють суспензію шпателем по всій площі поживного середовища. Чашку перевертають, обгортають у папір і розміщують у термостат. Після інкубації чашки дістають із термостата і оцінюють посіви візуально на наявність побічної мікрофлори [32].

## 8.2. Концентрація біомаси та каротиноїдів.

Концентрацію біомаси дріжджів *Rhodotorula glutinis* strain YM25079 визначають через оптичну густину клітинної суспензії.

*Методика визначення:* У пробірки з 9 мл стерильної води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтують. Для визначення кількості біомаси використовують непрямий метод, а саме вимірювання оптичної густини клітинної суспензії. Вимірювання проводять на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм у спеціальних кюветах товщиною 0,5 см. Отримані дані оптичної густини потім переводять у значення сухої біомаси за допомогою заздалегідь побудованого калібрувального графіка [10].

*Визначення концентрації каротиноїдів.*

Для визначення кількісного вмісту каротиноїдів застосовували методи УФ-спектроскопічного визначення оптичної густини культуральної рідини.

Таким чином, зразки порошку дріжджів додатково розтирали в кварцовій ступці та розчиняли в ацетоні. Згодом верхню органічну фазу збирали, а нижню фазу екстрагували двічі. Загальну концентрацію каротиноїдів визначали шляхом вимірювання значення поглинання при 450 нм (OD450) ацетонових екстрактів за допомогою спектрофотометра UV-Vis (UV-1800PC, MAPADA, Шанхай, Китай), виражене як мг/г маси сухої клітини (DCW). Вміст каротиноїду розраховували за формулою

$$\langle X = 1000 EV/AW \rangle,$$

де X - загальна кількість каротиноїду (мг/г DCW),

E - OD450,

V - загальний об'єм ацетонових екстрактів (мл), W — вага висушеного зразка порошку (г),

A — середнє значення коефіцієнт екстинкції (2500) для каротиноїду.

## 8.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

*Визначення концентрації глюкози*

Вимірювання глюкози використовує передові технології, а саме біосенсор. Ключовим елементом цього біосенсора є складна триферментна мембрана, яка

ідентифікує глюкозу. Ця мембрана закріплена на спеціальному кондуктометричному перетворювачі, який перетворює хімічний сигнал на електричний, що дозволяє виміряти концентрацію глюкози. Процес вимірювання відбувається дуже швидко – всього за 1-2 хвилини. Це досягається завдяки високій чутливості та специфічності ферментів, що входять до складу мембрани. Важливо зазначити, що діапазон концентрацій глюкози, який можна виміряти цим методом, може змінюватися. Це залежить від буферної ємності розчину, в якому проводиться вимірювання. Буферна ємність характеризує здатність розчину підтримувати сталі значення рН при додаванні кислоти або лугу [33].

**Методика вимірювання.** Вимірювання проводять у 5мМ фосфатному буфері та універсальному буфері з різним рН при кімнатній температурі у відкритій комірці за інтенсивного перемішування. Концентрацію субстратів у комірці задають, додаючи до робочого буфера порціями стандартні концентровані вихідні розчини глюкози. Потім в комірку вноситься розчинений в 10 разів фугат культуральної рідини.

Біосенсор для вимірювання глюкози функціонує завдяки іммобілізації глюкозооксидази у мембрані з дрібними порами на поверхні робочого електроду. Глюкозооксидаза, взаємодіючи з глюкозою, запускає процес окиснення, в результаті якого утворюється пероксид водню та D-глюконолактон. Останній спонтанно перетворюється на глюконову кислоту, яка дисоціює на іон кислоти та протон. Ці зміни призводять до модифікації провідності, що фіксується кондуктометричним перетворювачем. Одночасно, утворені протони можуть бути ідентифіковані потенціометричним перетворювачем. При амперометричному методі, пероксид водню, що утворився в ході реакції, відновлюється на аноді, що спричиняє збільшення сили струму. Величина цього струму прямо пропорційна концентрації глюкози у зразку.

#### **Визначення амінного азоту**

У складі поживного середовища для виробничого біосинтезу каратиноїдів продуцентом, якого є *Rhodotorula glutinis* strain YM25079, джерелом амінного

азоту виступає кукурузний екстракт та пептон. Для визначення його кількості використовують метод формольного титрування [34].

Принцип методу полягає у блокуванні формальдегідом за рН 7,0 вільних аміногруп з наступним титруванням лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп. Початок і кінець титрування визначають потенціометрично.

**Хід роботи.** У склянку об'ємом 50 мл наливають 10 мл аналізованого розчину культуральної рідини і доводять об'єм водою до 20 мл. Електроди потенціометра занурюють у досліджуваний розчин, рН якого доводять до 7,0 за допомогою розчину NaOH 0,1 моль/л або HCl 0,1 моль/л. Під час проведення дослідження електроди весь час мають залишатися зануреними у розчин. До нейтралізованого розчину додають 2 мл нейтрального формаліну (рН якого доводять до 7,0 з використанням 10 % розчину NaOH), перемішують і, не виймаючи електродів, титрують вміст розчином NaOH 0,01 моль/л до рН 9,1. При титруванні використовують бюретки. Паралельно проводять три вимірювання. Вміст амінного азоту в досліджуваному зразку (X) в мг % визначають за формулою:

$$X = V \cdot K \cdot 1,4 \cdot (100 / N) ,$$

де V – об'єм розчину NaOH 0,01 моль/л в мл, що був використаний для титрування досліджуваної проби від рН 7,0 до 9,1;

K – поправка до титру розчину NaOH 0,01 моль/л;

0,14 – кількість амінного азоту в міліграмах, еквівалентна 1 мл розчину NaOH 0,01 моль/л;

100 – коефіцієнт перерахунку міліграмів у %;

N – об'єм культуральної рідини, взятої для аналізу.

## РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

### 9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва каратиноїдів дріжджами *Rhodotorula glutinis*

Біосинтез каратиноїдів з використанням штаму *Rhodotorula glutinis* strain УМ25079 включає наступні допоміжні роботи:

- приготування мийних та дезінфікуючих розчинів;
- приготування та стерилізація поживного середовища для одержання посівного матеріалу;
- приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу каратиноїдів; підготовка посівного матеріалу;
- виробничий біосинтез біомаси.

#### *Приготування мийних та дезінфікуючих розчинів*

Для щоденного та генерального прибирань необхідно застосовувати Біомой або «ЕСТЕР ДЕЗ» - рідкі миючі засоби, які добре видаляють неорганічні і органічні відкладення (жири, масла, денатурований білок, дріжджі, цукор, рослинні пігменти і інше).

Для миття обладнання, а саме: насосів, комунікацій та біореакторів різного типу і ємностей застосовують розчин каустичної соди. Промивна вода разом з відпрацьованими миючими та дезінфікуючими засобами зливається у каналізацію.

Приготування та стерилізація поживного середовища для одержання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу каратиноїдів

На даному етапі в якості відходів виступає сировина, яка не є відповідною до нормативних показників та пакувальні матеріали, що залишились від її упакування.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.20 КР ПЗ</b>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Туттик О.Г.				Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							5
Керівник	Резніченко Ю.М.				<b>ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ</b> <b>Кафедра БТМ</b> 55		
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В.П.						

### Підготовка посівного матеріалу

Оскільки культивування відбувається в аеробних умовах, де використовується стерильне повітря, то маємо великий об'єм відпрацьованого повітря, тобто емісію газоповітряних відходів [39].

Виробничий біосинтез каротиноїдів *Rhodotorula glutinis* strain YM25079

Так як під час виробничого біосинтезу відбувається безперервна подача стерильного повітря, то утворюється об'єм відпрацьованого повітря – емісія газоповітряних відходів.

Рідкі відходи на даному етапі не враховуємо, адже культуральна рідина від ферментераподається до збірника.

#### 9.2. Характеристика рідких відходів біосинтезу

Виробництво каротиноїдів здійснюється протягом 300 діб, миття підлоги – щоденно, кожні два тижні – генеральне прибирання. Обладнання обробляють розчинами каустичної соди та Біомой або «ЕСТЕР ДЕЗ». Об'єми робочих розчинів за весь період виробництва складають 300 л.

Таблиця 9.1

#### Характеристика рідких відходів виробництва

Назва рідких відходів	Речовини, що входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, л	Клас небезпеки
2% розчин каустичної соди	Каустична сода – NaOH	50	II
0,5% розчин Біомой	Багатокомпонентний	150	IV
«ЕСТЕР ДЕЗ»	Надоцтова кислота, Оцтова кислота	100	II
	Усього:	300	

Заходи для зменшення об'ємів рідких відходів

Актуальним є застосувати СІР 6x2500А-2 – двоконтурну автоматичну мийку для зменшення об'ємів мийних на дезінфікуючих розчинів, що зливаються після проведення санітарної підготовки виробництва у каналізацію.

Для очищення стічних вод актуальним буде застосовувати дисковий фільтр. Основним елементом фільтру є фільтруючий сегмент, обтягнутий фільтрувальною тканиною. Вода, що надходить у внутрішній простір фільтруючого сегменту, проходить назовні крізь тканину, на якій затримуються дрібні забруднення. Сегменти закріплені на дисковому валу. Дванадцять сегментів утворюють один диск. Кількість дисків визначає грязеемність, а отже і розміри фільтру. Бувають дискові фільтри з 4, 6, 10, 16 і 24 дисками з діапазоном фільтрації 5-200 мкм.

Переваги:

висока якість очищення; висока стійкість до зношування і пошкоджень;  
висока якість очищеної води; невелика площа встановлення фільтру (по співвідношенню з ємністю); відмінна альтернатива барабанним мікросітчатим фільтрам; низькі інвестиційні та експлуатаційні витрати.

### 9.3 Утилізація твердих відходів

Характеристика твердих відходів біосинтезу Розрахунок об'ємів відходів  
Відходами на даному етапі можуть служити пакувальні тари для компонентів поживного середовища, миючих та дезінфікуючих розчинів.

Таблиця 9.2

#### Характеристика твердих відходів виробництва каратиноїдів

Назва твердих відходів	Речовини, що входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, кг	Клас небезпеки
Тара для мийних та дезінфікуючих засобів	Поліпропілен	0,6	IV

Упаковка для компонентів поживного середовища	Поліетилен, полівінілхлорид	0,6	IV
	Усього:	1,2	

Відходи сортуються, а далі надаються до пунктів вторинної переробки сировини.

Напрямки утилізації відходів пластмас: - захоронення на полігонах та звалищах: найпоширеніший метод і є тимчасовою утилізацією, з таких місць можна вилучити тисячі тон вторинної сировини; - переробка пластмасових відходів по заводській технології передбачає: сортування відходів за зовнішнім виглядом (виокремлення непластмасових відходів; одно- чи двостадійне подрібнення матеріалу до розмірів, які достатні для того, щоб здійснити подальшу переробку, потім матеріал піддається відмиванню від забруднень органічного чи неорганічного характеру; далі залежно від способу розділення відходів за видами пластмас їх сушать; потім висушені подрібнені відходи змішують із фарбами, наповнювачами і гранулюють, утворюється гранулят, що використовується для виготовлення плівки для мішків для сміття.

### **Утилізація газоповітряних відходів**

Характеристика газоповітряних відходів виробництва каратиноїдів

Розрахунок об'ємів відходів

До газоповітряних відходів виробництва належать вуглекислий газ, що виділяється при біосинтезі та аерозоль дріжджів. Час виробничого біосинтезу становить 120 год, а тривалість підготовки посівного матеріалу в інокуляторах становить – 180 год. Швидкість аерації стерильного стисненого повітря, що подається для забезпечення аеробних умов культивування – 0,07 л/лКР/хв. У виробничому приміщенні встановлюються інокулятор об'ємом 10 л, 100л та 1 ферментер із робочим об'ємом 1000 л. Тому, приблизний об'єм відпрацьованого повітря становить:  $0,07 \cdot (110 \cdot 60) + 0,07 \cdot (1000 \cdot 120) = 8862$  л

(8,862 м<sup>3</sup>).

### Характеристика газоповітряних відходів виробництва каратиноїдів

Назва газоподібних відходів	Речовини, що входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, м <sup>3</sup>	Клас небезпеки
Відпрацьоване повітря після ферментації	Вуглекислий газ, аерозоль дріжджів	8,862	IV

Очистка газоподібних відходів є обов'язковим етапом для промислових виробництв, що виділяють токсичні й біологічно активні сполуки в атмосферу.

Принцип роботи біоскрубера рис.9.1 реалізується у дві стадії у двох різних установках. На першому етапі в адсорбері токсичні речовини і кисень розчиняються у воді. У результаті повітря очищується, а забруднена вода відводиться для подальшого очищення. Типи адсорберів: барботажні, насадочні, розпилювальні, форсункові. Метою конструктивних удосконалень адсорберів є збільшення площі поверхні розподілу фаз, що обумовлює ефективність адсорбції.

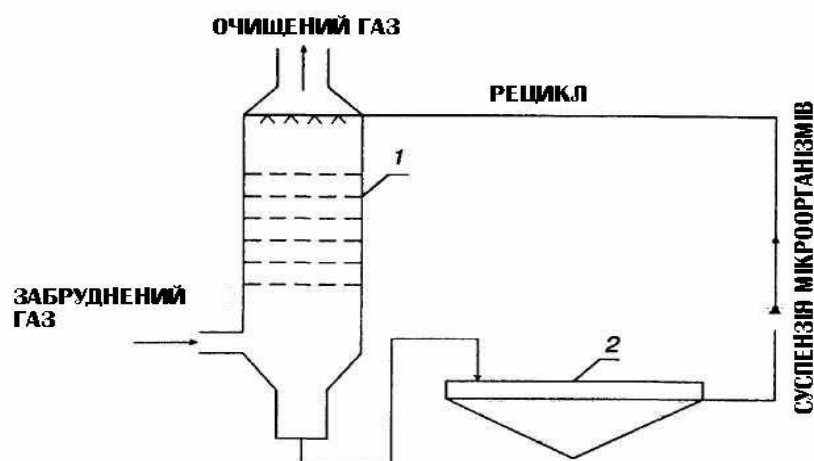


Рис. 9.1. Схема роботи біологічного скрубера

На другій стадії забруднена вода надходить до аеротенку, де вона піддається регенерації. У ході очистки складні органічні сполуки окислюються мікроорганізмами активного мулу до кінцевих продуктів з утворенням біомаси за допомогою рідкої фази є спосіб з активним мулом. Інтенсифікація процесу біоочищення відбувається за допомогою чистих культур та їх асоціацій, що адаптовані до певних джерел забруднень.

Цей спосіб за пристроями, що використовуються поділяється на установки для роботи з диспергованим газом і рідиною. За способом із дисперговою формою газу в рідині, в котрій живуть мікроорганізми, вводиться досить розпорошений газ. Забруднений газ безпосередньо вдувають до ємності з активним мулом.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Сімахіна, Г. О. Функціональна роль каротиноїдів та особливості їх використання у харчових технологіях / Г. О. Сімахіна // Наукові праці НУХТ. - 2010. - № 33. - С. 45-48.
2. Graham, J. E., Bryant, D. A. The biosynthetic pathway for synechoxanthin, an aromatic carotenoid synthesized by the euryhaline, unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 // *Journal of bacteriology*. 2008. Vol. 190(24), P. 7966-7974.
3. Maresca J. A., Graham J. E., Bryant D. A. The biochemical basis for structural diversity in the carotenoids of chlorophototrophic bacteria // *Photosynthesis research*. 2008. Vol. 97(2). P. 121–140
4. Frengova G. I., Beshkova D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance // *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2009. Vol. 36(2). P. 163.
5. Pelz A., Wielan, K. P., Putzbach K., Hentschel P., Albert K., Götz F. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus* // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. Vol. 280(37). P. 32493–32498.
6. Krubasik P., Kobayashi M., Sandmann G. Expression and functional analysis of a gene cluster involved in the synthesis of decaprenoxanthin reveals the mechanisms for C50 carotenoid formation // *The FEBS Journal*. 2001. Vol. 268(13). P. 3702–3708.
7. Ritz T., Damjanović A., Schulten K., Zhang J. P., Koyama Y. Efficient light harvesting through carotenoids // *Photosynthesis Research*. 2000. Vol. 66(1–2). P. 125–144.
8. Moran N. A., Jarvik T. Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids // *Science*. 2010. Vol. 328(5978). P. 624– 627.
9. Krinsky N. I., Johnson E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease // *Molecular aspects of medicine*. 2005. Vol. 26(6). P. 459–516.
10. Huang, X.; Fan, J.; Guo, C.; Chen, Y.; Qiu, J.; Zhang, Q. Integrated Transcriptomics and Metabolomics Analysis Reveal the Regulatory Mechanisms

Underlying Sodium Butyrate-induced Carotenoid Biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. J. Fungi 2024, 10, 320. <https://doi.org/10.3390/jof10050320>

11. Carotenoid Biosynthesis: Genome-Wide Profiling, Pathway Identification in *Rhodotorula glutinis* X-20, and High-Level Production Front. Nutr., 17 June 2022 Sec. Food Chemistry Volume 9 - 2022 <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.918240>

12. Anna M. Kot a, \*, Stanisław Błażej a, Agnieszka Kurcz a, Joanna Bryś b, Iwona Gientka a, Anna Bzducha-Wróbel a, Magdalena Maliszewska a, Lidia Reczek Effect of initial pH of medium with potato wastewater and glycerol on protein, lipid and carotenoid biosynthesis by *Rhodotorula glutinis* Electronic Journal of Biotechnology 01 February 2017

13. Marova I., Certik M., Breierova E. Production of enriched biomass by carotenogenic yeasts-application of whole-cell yeast biomass to production of pigments and other lipid compounds // Biomass – detection, production and usage / Edited by Matovic D. – Rijeka, Croatia: InTech, 2011. – P.345–384.

14. Pitt JI, Hocking AD. Fungi and food spoilage (2nd ed.). Gaithersburg, Md.: Aspen Publications. 1999.

15. <https://eximer.ua/padaye-zir-pislya-soroka-rokiv/>

16. <http://kyivobl.ukrstat.gov.ua/p.php3?c=115&lang=1>

17. [https://tabletki.ua/uk/%d0%9e%d0%ba%d1%8e%d0%b2%d0%b0%d0%b9%d1%82-%d0%bb%d1%8e%d1%82%d0%b5%d0%b8%d0%bd-%d1%84%d0%be%d1%80%d1%82%d0%b5/1011863/#%D0%A2%D0%B5%D1%80%D0%BC%D1%96%D0%BD\\_%D0%B2%D0%B6%D0%B8%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F](https://tabletki.ua/uk/%d0%9e%d0%ba%d1%8e%d0%b2%d0%b0%d0%b9%d1%82-%d0%bb%d1%8e%d1%82%d0%b5%d0%b8%d0%bd-%d1%84%d0%be%d1%80%d1%82%d0%b5/1011863/#%D0%A2%D0%B5%D1%80%D0%BC%D1%96%D0%BD_%D0%B2%D0%B6%D0%B8%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F)

18. Фільтруючий матеріал G4 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtruyuchiy-material-g4.html>

19. Інтернет-магазин – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pts-group.com.ua/uk/katalog-obladnannja/gvintovi-kompresora/vintovoj-kompresor-atlascopco-ga5-ga11-0-9-1-84m3-min/>

20. Інтернет-магазин – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://teko-ua.com/ua/freonovyij-oxladitel-kanal-fko.html?srsId=AfmBOooWuYSFHVDt6g8apyjN1q7afiy04cLYEOqTCcXVDYiQsXqNKlwK>

21. Ресивер [Електронний ресурс] // Режим доступу:

[https://tusk.ua/ua/product/resiver-vozdushnyij-lider-16-bar-900-l-rv90081801-dlya-kompressora/?keyword=&utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=21688629505&creative=&placement=&target=&campaignid=21688629505&adgroup=&feeditemid=&targetid=&loc\\_interest\\_ms=&loc\\_physical\\_ms=1030244&matchtype=&network=x&device=c&devicemodel=&ifmobile=&ifnotmobile=notmobile&ifsearch=&ifcontent:\[value\]=&keyword=&marketing.link=google-cpc-21688629505\\_x&gad\\_source=1&gclid=Cj0KCQiAyoI8BhDvARIsAO\\_CDsA3xV6pnGYR34BNVI96mQ85IIAuSuDcOgMSZ53IcBiO8k7\\_ONya61YaAgW2EALw\\_wcB](https://tusk.ua/ua/product/resiver-vozdushnyij-lider-16-bar-900-l-rv90081801-dlya-kompressora/?keyword=&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=21688629505&creative=&placement=&target=&campaignid=21688629505&adgroup=&feeditemid=&targetid=&loc_interest_ms=&loc_physical_ms=1030244&matchtype=&network=x&device=c&devicemodel=&ifmobile=&ifnotmobile=notmobile&ifsearch=&ifcontent:[value]=&keyword=&marketing.link=google-cpc-21688629505_x&gad_source=1&gclid=Cj0KCQiAyoI8BhDvARIsAO_CDsA3xV6pnGYR34BNVI96mQ85IIAuSuDcOgMSZ53IcBiO8k7_ONya61YaAgW2EALw_wcB)

22. Система підігріву повітря [Електронний ресурс] // Режим доступу: [https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting\\_cameras\\_equipment/air\\_heating\\_system.php](https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php)

23. HEPA – фільтр [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-tonkoy-ochistki-vozduha-hepa-promyshlennyj/>

24. Реактори-змішувачі [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://stprom.com.ua/ua/g112385401-himicheskie-reaktory>

25. Відцентровий насос Pedrollo РКм 60 до 2.2 кВт. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://pedrollo-shop.com.ua/ua/p1594096237-pedrollo-pkm-poverhnostnyj.html>

26. Ваговий дозатор [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://pack-tech.com.ua/p948192236-vesovoj-dozator-sypuchih.html>

27. Обладнання для ферментування [Електронний ресурс] // Режим доступу:

<http://www.sartorius-sd.com.ua/index.php/%D1%81%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D1%83%D0%B5%D0%BC%D1%8B%D0%B5-%D0%BD%D0%B0-%D0%BC%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%B5-%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%8B/biostat%C2%AE-cplus.html>

28. NEW FILTER <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/hepa-filtri-dlya-sistem-ventilyatsiyi.html>

29. Інтернет-магазин – [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://china-fermenter.com/product/1000lfermentor\\_bioreactor\\_system](https://china-fermenter.com/product/1000lfermentor_bioreactor_system)

30. Hernández-Almanza, A., Montanez, J. C., Aguilar-Gonzalez, M. A., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. "Rhodotorula glutinis as source of pigments and metabolites for food industry." *Food Bioscience* 5. 2014: 64-72. doi:10.1016/j.fbio.2013.11.007

31. Красінко В.О. Основи екобіотехнології: Конспект лекцій для студ. Напрямку 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2011. – 143 с.
32. Грегірчак Н.М. Мікробіологія харчових виробництв: Лаборатор. Практикум. – К.: НУХТ, 2009. – 302 с.
33. Інтернет-ресурс – [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://www.researchgate.net/publication/273760250\\_TRADITIONAL\\_AND\\_BIO\\_SENSOR\\_METHODS\\_OF\\_MONO-AND\\_DISACCHARIDES\\_DETERMINATION\\_In\\_Ukrainian](https://www.researchgate.net/publication/273760250_TRADITIONAL_AND_BIO_SENSOR_METHODS_OF_MONO-AND_DISACCHARIDES_DETERMINATION_In_Ukrainian)
34. Інтернет-ресурс – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://repository.kpi.kharkov.ua/server/api/core/bitstreams/668d35b8-cdd6-42f1-8a38-66994a7b3afd/content>
35. [https://tplus.com.ua/peristaltichny-nasos253d?gad\\_source=1&gclid=EAIaIQobChMIhJbC8O2WiwMV0IWRBR11Mx2GEAAAYAiAAEgLcgfD\\_BwE](https://tplus.com.ua/peristaltichny-nasos253d?gad_source=1&gclid=EAIaIQobChMIhJbC8O2WiwMV0IWRBR11Mx2GEAAAYAiAAEgLcgfD_BwE)
36. Гидроксид натрия (каустическая сода, едкий натр, каустик). [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://rekte.com.ua/soda-kaustychna>
37. БіОМОЙ® - передстерилізаційний засіб. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.farmakos.ua/bimoj.html>.
38. Дезінфектант «ЕСТЕР ДЕЗ» – новинка ТОВ НВП «Електрогазохім». [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://harch.tech/2021/03/03/ester/>.
39. Мильчук М.Д. Біотехнологія рослин / М.Д. Мильчук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. – К.: Поліграфконсалтінг, 2003. – 250 с.