

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“01” березня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СИДОРЕНКО Миколи Руслановича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання кормової біомаси *Yarrowia lipolytica*

керівник роботи СТАБНИКОВ Віктор Петрович, д.т.н., проф.

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

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

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи *Yarrowia lipolytica*, цільовий продукт: кормова біомаса, об'єм ферментера 10 м³, коефіцієнт заповнення 0,5

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛОВОГО ПРОДУКТУ, РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА, РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ, РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛОВОГО ПРОДУКТУ, РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ, РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ, РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ЦІЛОВОГО ПРОДУКТУ, РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА, РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

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 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.03.24 - 04.03.24	Виконано
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	05.03.24 - 13.03.24	Виконано
3	Техніко-економічне обґрунтування	14.03.24 - 20.03.24	Виконано
4	Біосинтез цільового продукту	21.03.24 - 24.03.24	Виконано
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	25.03.24 - 30.03.24	Виконано
6	Специфікація обладнання	31.03.24 - 06.04.24	Виконано
7	Опис технологічної схеми біосинтезу цільового продукту	07.04.24 - 13.04.24	Виконано
8	Контроль виробництва	14.04.24 - 24.04.24	Виконано
9	Охорона довкілля	25.04.24 - 09.05.24	Виконано
10	Оформлення пояснювальної записки	10.05.24 - 19.05.24	Виконано
11	Виконання графічної частини роботи	20.05.24 - 28.05.24	Виконано

Здобувач

(підпис)

Микола СИДОРЕНКО

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Віктор СТАБНІКОВ

(ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	6
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	10
1.1. Історія застосування кормової біомаси	10
1.2. Загальна характеристика кормової біомаси дріжджів <i>Yarrowia lipolytica</i>	10
1.3. Біологічний вплив <i>Yarrowia lipolytica</i> на організм тварин	12
1.4. Форми випуску цільового продукту	13
1.5. Продукти на основі біомаси <i>Yarrowia lipolytica</i>	13
РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	16
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	16
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища	22
2.2.1. Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення	22
2.2.2. Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення	23
2.2.3. Розрахунок вмісту в середовищі джерела фосфору	24
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Yarrowia lipolytica</i>	25
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	28
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	29
3.1. Розрахунок потреби у цільовому продукті	29
3.2. Розрахунок потужності виробництва	30
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера	31
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	32
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	36
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	36
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	37
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	44
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	44
5.1.1. Вибір умов і способу культивування	44
5.1.2. Вибір типу ферментера	45
5.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря	46
5.3. Обґрунтування стадії санітарної підготовки виробництва	47
5.4. Підбір миючих та дезінфікувальних засобів	48
5.4.1. Розрахунок приблизного плану приміщення	48
5.4.2. Обґрунтування вибору миючих та дезінфікувальних засобів	52
5.5. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища	56
5.5.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках	57
5.5.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 12 л	58
5.5.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л	59

5.5.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м ³	61
5.5.5. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу	62
5.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника	63
5.7. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту	65
5.7.1. Сепарування	66
5.7.2. Сушіння.....	68
5.7.3. Фасування та пакування	69
5.8. Складання узагальненої принципової схеми із позначенням обраних післяферментаційних етапів.....	70
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	71
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	80
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	95
8.1. Карта постадійного контролю виробництва	95
8.2. Мікробіологічний контроль.....	101
8.2.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища.....	101
8.2.2. Мікробіологічний контроль чистоти виробничої культури	101
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	103
8.3.1. Концентрація біомаси	103
8.3.2. Визначення концентрації джерела вуглецевого живлення у поживному середовищі.....	105
8.3.3. Визначення концентрації джерела азотного живлення у поживному середовищі	105
8.4. Методи ідентифікації цільового продукту.....	106
8.5. Визначення показників якості цільового продукту.....	107
8.5.1. Метод визначання масової частки вологи	107
8.5.2. Метод визначання масової частки білку	108
8.5.3. Метод визначання масової частки золи	111
8.5.4. Метод визначання масової частки ліпідів.....	113
8.5.5. Перевірка інактивації біологічного агента	116
РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	117
9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця утворення твердих, рідких та газоподібних відходів	117
9.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва	120
9.2.1. Системи знешкодження рідких відходів.....	120
9.2.2. Системи знешкодження газоподібних відходів	125
9.2.3. Системи знешкодження твердих відходів	125
9.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів	125
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	127

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці виробництва кормової біомаси, шляхом 16-ти годинного культивування дріжджів *Yarrowia lipolytica* S6 на поживному середовищі з сирым гліцерином, що утворює 21,3 г/л біомаси.

Цей продукт застосовується в якості кормової добавки до раціону маточних свиней. На основі цих даних було розраховано виробничу потужність виробництва, яка становить 26828 кг/рік

Виготовлення кормових дріжджів вимагає виконання ряду допоміжних робіт, які включають в себе санітарну підготовку виробництва, підготовку та стерилізація аераційного повітря, приготування розчинів титрувальних агентів та приготування і стерилізація поживного середовища.

До технологічного процесу виробництва відносяться підготовка посівного матеріалу, 4 стадій вирощування посівного матеріалу та виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5 Технологія виробництва кормових дріжджів зазначена в технологічній та апаратурній схемах кваліфікаційної роботи.

Розроблено карту постадійного контролю доферментаційних процесів і виробничого біосинтезу та зазначено методики контролю концентрації біомаси, джерела карбону та азоту. Також наведено методи ідентифікації цільового продукту та методи визначення показників його якості.

Кваліфікаційна робота включає в себе 136 сторінок друкованого тексту, включаючи 23 таблиці та 20 рисунків, складається з вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури, який складається з 89 найменувань та графічної частини, яка представлена на 2 листа формату А1.

Ключові слова: *Yarrowia lipolytica* S6, біомаса, дріжджі, сирий гліцерин, підготовка поживного середовища, методи контролю, показники якості, техніко-економічне обґрунтування.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of the production of feed biomass by 16-hour cultivation of *Yarrowia lipolytica* S6 yeast on a nutrient medium with crude glycerol, which produces 21.3 g/l of biomass.

This product is used as a feed additive in the diet of sows. Based on these data, the production capacity of the plant was calculated to be 26828 kg/year.

The production of feed yeast requires a number of ancillary activities, including sanitation of the production facility, preparation and sterilisation of aeration air, preparation of titration agent solutions, and preparation and sterilisation of the culture medium.

The technological process of production includes the preparation of seed material, 4 stages of growing seed material and production biosynthesis in a 10 m³ fermenter with a filling factor of 0.5. The technology of feed yeast production is specified in the technological and hardware diagrams of the qualification work.

A map of the stage-by-stage control of pre-fermentation processes and production biosynthesis has been developed and methods for controlling the concentration of biomass, carbon and nitrogen sources have been specified. Methods for identifying the target product and methods for determining its quality indicators are also presented.

The qualification work includes 136 pages of printed text, including 23 tables and 20 figures, consists of an introduction, nine chapters, a list of references consisting of 89 titles and a graphic part, which is presented on 2 sheets of A1 format.

Key words: *Yarrowia lipolytica* S6, biomass, yeast, crude glycerol, preparation of the nutrient medium, control methods, quality indicators, feasibility study.

ВСТУП

Зростання чисельності населення призводить до збільшення виробництва продуктів харчування, особливо продуктів, які багаті на білок. За оцінками, населення світу зросте на 2 мільярди людей протягом наступних 30 років, з 7,7 мільярдів зараз і досягне 9,7 мільярдів до 2050 року і може досягти майже 11 мільярдів приблизно в 2100 році. Щороку 80 мільярдів тварин забивають на м'ясо. Середньостатистична людина в усьому світі споживає близько 43 кг м'яса на рік [1].

Люди з розвинених країн зацікавлені у виготовленні здорової їжі з оптимальним складом амінокислот і оптимальною кількістю жиру, виробленій екологічно чистим способом, а для цього необхідно забезпечити стале постачання господарства високоцінними кормами [2].

Для нормального росту та набору маси тваринам необхідна велика кількість білків та вітамінів. Звичайні зернові корми неспроможні задовольнити потреби тварин у раціональному харчуванні, через малий вміст білків, вітамінів та інших біогенних елементів. Для вирішення цієї проблеми у корм для тварин можна додати білки рослинного або тваринного походження. Деякі рослини є цінними джерелами білка, такі види рослин, як соя, містять більше 50% білків. Вона може використовуватись у кормах для тварин або напряду споживатись людиною, але для вирощування рослин необхідно багато гектарів орної землі та багато води [3].

Тому пошук нових альтернативних шляхів отримання збагачених білками кормів має велике значення для вирішення зростаючої проблеми дефіциту м'ясної їжі. У найближчому майбутньому ця проблема може бути вирішена шляхом виробництва величезних кількостей кормової мікробної біомаси. Це не тільки дає можливість зменшити вплив на навколишнє середовище, а також збільшує кількість та якість виготовленої с/г продукції.

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	Літ.	Арк.	Аркуші
Розроб.		Сидоренко М.Р.					8	136
Перевір.		Стабніков В.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						Кафедра БТМ		

Ще однією перевагою мікробіологічного білку над традиційними джерелами білку для кормів є те, що традиційні тваринні та рослинні білкові корми конкурують з харчовими ресурсами людини за використання сільськогосподарських угідь. Крім того, мікроорганізми, які синтезують мікробіологічний білок, можна залучати до біоремедіації навколишнього середовища. Тому на сьогоднішній день тематика виробництва кормової біомаси є **досить актуальною**, розробка нових технологій та використання нових штамів мікроорганізмів може зменшити одну з головних проблем людства – білковий голод [4].

Людство вже давно опанувало технології виробництва мікробіологічного білка з використанням: бактерій, водоростей, нитчастих грибів, дріжджів. Найбільш перспективною групою мікроорганізмів для отримання мікробної біомаси є дріжджі. Дріжджова біомаса багата на білок та жири. Також вона містить мікроелементи та вітаміни, включаючи групу В. [5].

Серед всіх представників дріжджів, особливу увагу привертають нетрадиційні дріжджі *Yarrowia lipolytica* через здатність рости на великій кількості субстратів, здатністю накопичувати і надмірно акумулювати жири в своїй клітині, через свою поживну цінність, та великим виходом біомаси [5].

Новизною цієї роботи є використання штаму дріжджів *Yarrowia lipolytica* S6, який характеризується синтезом високої концентрації кормової біомаси, яка містить багато білку з використанням дешевого сирого гліцерину, як субстрату для культивування

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

1.1. Історія застосування кормової біомаси

Використання кормової біомаси для годівлі худоби сягає початку 20 століття, в Німеччині під час Першої світової війни пивні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, які є другим за величиною побічним продуктом пивоваріння, замінили до 60% раніше імпортованого кормового білка [3].

Першою компанією, яка почала виготовляти кормову біомасу у промислових масштабах була компанія «British Petroleum». Вона розробила процес культивування *Yarrowia lipolytica* на воскових n-парафінах, недорогому побічному продукті нафтової промисловості, для годування тварин. Було побудовано дослідний завод потужністю 100 тис. тонн на рік; однак питання безпеки отриманого білка, враховуючи походження субстрату, і його висока ціна після нафтової кризи 1973 року призвели до зменшення зацікавленості «British Petroleum» до виробництва кормової біомаси [3].

«Imperial Chemical Industries» була наступним підприємством, яке комерціалізувала метод виробництва кормової біомаси, використовуючи метанол як субстрат і бактерії *Pseudomonas methylotrophus*, для виробництва Pruteen®, продукту з 72% вмістом білка для годування тварин. Однак виробництво не приносило великих прибутків через високу ціну на метанол, яка становить приблизно 50% від загальної вартості виготовленого товару [3].

1.2. Загальна характеристика кормової біомаси дріжджів *Yarrowia lipolytica*

Кормова біомаса – це високоцінний білково-вітамінний продукт, який широко використовується в різних галузях тваринництва як повноцінна харчова добавка, тому потреба в них щорічно зростає [6].

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	Літ.	Арк.	Аркушіє
Розроб.		Сидоренко М.Р.					10	136
Перевір.		Стабніков В.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						Кафедра БТМ		

Білки дріжджів засвоюються в організмі тварин на 73%, з біологічної точки зору вони є повноцінними. За складом незамінних амінокислот білки дріжджів близькі до тваринних білків. Крім того, дріжджові клітини містять велику кількість вітамінів, мікроелементів та жирів [7].

Кормові дріжджі через свій хороший біохімічний склад мають здатність перетворювати велику частину загальної енергії кормів на енергію обміну в організмі тварин. Ця особливість призводить до збільшення приросту тварин, а також до зменшення витрат на корми приблизно 10-15% [8].

Кормові дріжджі застосовуються в штучному розведенні риби, і навіть в бджільництві для підгодівлі бджіл ранньою весною. В якості обов'язкового компонента дріжджі рекомендуються використовувати для птиці та свиней будь-якого віку, а також молодій великій рогатій худобі [8].

Кормові дріжджі виготовлені з біомаси *Y. Lipolytica* містять багату харчову цінність: білки 56,4 г/ 100 г сухої ваги, мікроелементи 1,3 г/ 100г сухої ваги, вітаміни 0,4 г/ 100 г сухої ваги. До амінокислот, які присутні у складі кормових дріжджів, належать: аланін, арганін, аспарагін, цистеїн, гліцин, глутамін, гістидин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, пролін, серин, триптофан, тирозин, треонін. Серед мікроелементів зустрічаються Ca, Cu, Cr, I, Fe, Mg, Mn, Mb, P, K, Se, S, Zn, Na. Також кормові дріжджі мають великий вітамінний склад, до якого належать вітаміни групи B: B1, B2, B6, B7, B9, B12 та вітамін E. Головною особливістю цих дріжджів, яка відрізняє їх від інших біологічних агентів, є більший вміст екстракту ефіру та поліненасичених жирних кислот у складі біомаси. [4].

Суша біомаса являє собою аморфний гігроскопічний порошок бежевого кольору з легким дріжджовим запахом [4].



Рис. 1.1. Висушена біомаса *Yarrowia lipolytica* [4]

Для отримання кормових дріжджів готову біомасу *Y. lipolytica* центрифугують або фільтрують, а потім висушують при високій температурі. Сушіння при високій температурі є одним із найефективніших методів запобігання забрудненню та продовження терміну придатності кормових дріжджів. Рівень вологи нижче 10% вважається безпечним для тривалого терміну зберігання і допомагає досягти належної текстури. Крім того, сушіння вбиває клітини, руйнує їх клітинну стінку та сприяє вивільненню вмісту дріжджових клітин. Тому сушіння значно покращує якість дріжджової біомаси [4, 9].

Варто зазначити, що біомаса *Y. lipolytica*, яка збагачена якісним білком, отримується за короткий час, легко та дешево, з низьким впливом на навколишнє середовище та екологічно чистим процесом [3].

1.3. Біологічний вплив *Yarrowia lipolytica* на організм тварин

На сьогодні можна знайти багато досліджень у яких досліджується позитивний вплив *Y. lipolytica* на здоров'я тварин. Серед основних позитивних сторін виділяють підвищення темпу зростання, покращення окислювально-відновного балансу та стійкості до захворювань. Ці дріжджі також покращують жирнокислотний склад у м'язах, гематобіохімічні показники. Зазвичай *Y. lipolytica* вводять перорально у вигляді сухої порошкоподібної біомаси живих або мертвих клітин. Вплив кормової біомаси *Y. lipolytica* був протестований на ссавцях, птахах, рибах, ракоподібних і молюсках [10].

Безпечність використання біомаси *Y. lipolytica* підтверджена тестами на токсичність. Найбільше дослідження проводили на багатьох видах тварин: мишах, щурах, курчатах та перепілках. Їх раціон до 30% складався з біомаси дріжджів. Це дослідження показало, що кормові дріжджі не мають жодної токсичності, вони не мають негативного впливу на ріст, розвиток та репродуктивну функцію тварин [3].

1.4. Форми випуску цільового продукту

Кормові дріжджі можна випускати у 3 товарних формах: порошок, гранули та брикети. Форма порошку найбільш характерна для даного продукту і більшість виробників надає перевагу саме такій формі через декілька переваг, а саме: технологічну простоту виробництва, зручність дозування перед використанням, відсутність потреби в додатковій обробці перед використанням. До недоліків можна віднести тільки утворення грудок через гігроскопічність порошку, але цей недолік невілюється перемішуванням при приготуванні корму для тварин [11].

Форма гранул має багато схожих переваг з порошком, але потребує додаткової стадії гранулювання при виробництві, а також може потребувати додаткового подрібнення перед вживанням деякими тваринами [11].

Форма брикетів досить неперспективна через ряд суттєвих недоліків: додаткова стадія при виробництві, складність точності дозування, що є критичним для цього продукту, а також потреба в додатковому подрібненні перед вживанням корму тваринами [11].



Виходячи з наведеної інформації вище для нашого виробництва слід випускати цільовий продукт у формі порошку.

1.5. Продукти на основі біомаси *Yarrowia lipolytica*

Ринок кормових добавок на основі біомаси *Yarrowia lipolytica* доволі молодий і представлений малим переліком товарів. Провідне місце на ньому займає компанія Skotan S.A, яка здійснює науково-дослідні та дослідно-конструкторські проекти в кормовій, фармацевтичній та зеленій енергетиці. [12]

Ця компанія має декілька торгових марок продукції у складі якої присутня висушена біомаса дріжджів *Yarrowia lipolytica*. До них належать «Yarrowia Equinox» та «Yarrowia Canifelox». У табл. 1.1 наведено характеристику продуктів компанії Skotan S.A. [13]

Характеристика деяких продуктів компанії Skotan S.A

Назва продукту	Зовнішній вигляд продукту	Характеристика продукту	Фасування продукту	Джерело
«Equinox Classic»		<p>Основою продукту «Equinox Classic» є висушена біомаса <i>Yarrowia lipolytica</i>, яка завдяки високому засвоєнню поживних речовин компенсує дефіцит мінералів і збагачує організм екзогенними амінокислотами. Цей продукт має ніжний фруктовий запах, через наявність у складі фруктового ароматизатора. Призначений для будь-яких коней. Нормою використання є 40 г продукту на 100 кг маси коня на день.</p>	<p>Випускається у фасуванні 1,5 або 3 кг у вигляді гранул і порошку світло-коричневого кольору.</p>	[14]
«Equinox Calm»		<p>«Equinox Calm» був розроблений для знервованих, гіперактивних коней, а також коней, які одужують або повертаються до роботи. «Equinox Calm» ідеально підходить для використання на спортивних конях, на молодих конях, які тільки починають тренуватися, а також у незвичайних ситуаціях, таких як транспортування, зміна стайні чи табуни. Спеціально розроблена формула допомагає заспокоїти нерви і не викликає млявості. Норма використання: 10 г продукту на 100 кг маси тіла коня на добу.</p>	<p>Випускається у фасуванні 1,5 або 3 кг у вигляді гранул і порошку</p>	[15]

«Equinox Muscle»		<p>Equinox Muscle - продукт, розроблений для коней, які повертаються до тренувань, і для тих, які нарощують м'язову масу. Формула розроблена на основі унікального штаму дріжджів <i>Yarrowia lipolytica</i>, що характеризується багатством біологічно активних інгредієнтів, особливо вітамінів групи В і ненасичених жирних кислот, а також широким спектром мікро- і макроелементів, які забезпечують правильне нарощування м'язової маси. Норма використання: 8 г продукту на 100 кг живої маси коня на добу.</p>	<p>Випускається у фасуванні 1,5 або 3 кг у вигляді гранул і порошку</p>	[16]
«Canifelox puppy»		<p>Кормова добавка на основі унікальних дріжджів <i>Yarrowia lipolytica</i>, збагачених селеном і спіруліною. Препарат рекомендований цуценятам зі зниженим імунітетом, у стресових ситуаціях, під час відлучення або переходу на тверду їжу, у період вакцинації. Заповнює мінерально-вітамінну недостатність.</p>	<p>Випускається у фасуванні 120 або 240 г у вигляді порошку</p>	[17]
«Canifelox mobility»		<p>Додаткова формула на основі унікальних дріжджів <i>Yarrowia lipolytica</i> та плодів шипшини, збагачена хондроїтин сульфатом, глюкозамін сульфатом, МСМ, вітаміном С і марганцем. Активні речовини препарату беруть участь у синтезі колагену I і II типу. Дріжджі <i>Yarrowia lipolytica</i> є джерелом активних речовин, які підтримують процеси формування кісткової тканини, допомагають підтримувати правильну мінеральну щільність і міцність кісток.</p>	<p>Випускається у фасуванні 120 або 240 г у формі порошку та фасування 60 або 120 таблеток</p>	[18]

РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Людство вже давно опанувало технології виробництва мікробіологічного білка з використанням: бактерій – напр. *Alcaligenes* або *Lactobacillus*; водоростей – напр. *Spirulina* або *Chlorella*; нитчастих грибів – напр. *Aspergillus* або *Penicillium*; дріжджів – напр. *Saccharomyces*, *Candida* або *Pichia*. Їх висушені клітини можуть бути використані як джерело білка, мінеральних елементів, вітамінів у харчуванні тварин [5].

Серед перерахованих вище мікроорганізмів дріжджі є найбільш вивченими і найбільш прийнятними мікроорганізмами для такого промислового застосування. Вони мають сукупність переваг серед інших мікроорганізмів: високу швидкість росту, простоту генетичних маніпуляцій та наявності еукаріотичної організації. Крім того, вони не виробляють токсинів, як у випадку з бактеріями (ендотоксини) або нитчастими грибами (мікотоксини) [5, 19].

Серед різних представників дріжджів особливу увагу привертає нетрадиційні дріжджі *Yarrowia lipolytica* через свою здатність рости на широкому спектрі поживних середовищ та простоти культивування. Ці дріжджі є досконало вивченим видом, через те що високий потенціал *Y. lipolytica* для промислового застосування використовується вже понад 70 років [19].

Виробництво дріжджової біомаси в промислових масштабах головним чином базується на використанні вуглеводної сировини, такої як патока, барда, луги після сульфатації, а також крохмаль і лігноцелюлозні відходи[5].

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Сидоренко М.Р.					16	136
Перевір.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Останніми роками були проведені численні дослідження щодо доцільності використання ліпідовмісної сировини: рослинних олій, олій тваринного походження, відходів жирової та хімічної промисловості, що містять жирні кислоти, а також сумішей мила та жирів для виробництва біомаси нетрадиційних дріжджів *Yarrowia lipolytica* [5].

Ізоляти *Y. lipolytica* часто виявляються в забрудненому нафтою середовищі, бо вони мають здатність розкласти вуглеводні, особливо алкани. Ця особливість створює перспективу використання *Y. lipolytica* для утилізації гліцерину, який утворюється під час виробництва ефірів жирних кислот [3].

В усьому світі відбувається швидке розширення виробничих потужностей для виробництва цих ефірів через їх широке застосування. Їх застосовують при виробництві біопалива, у засобах для догляду за шкірою та волоссям, у якості харчових добавок у раціон людини, як емульгатори та ароматизатори, а також в фармацевтичній промисловості, як допоміжні речовини. Під час процесу трансестерифікації тригліцеридів етанолом в етилові ефіри жирних кислот, гліцерин утворюється як побічний продукт [20].

Отриманий сирий гліцерин зазвичай має чистоту 55–90%. Він містить інші компоненти, такі як залишки тригліцеридів, залишки етанолу, жирних кислот. Таким чином, цей сирий гліцерин містить забагато забруднюючих речовин для корисного застосування в хімії чи фармації, тому потребує дорогого очищення [20].

Отже, гліцерин з виробництва етилових ефірів жирних кислот був би гарною альтернативою як конкурентоспроможний субстрат для культивування мікроорганізмів, оскільки він є побічним продуктом і, тому, його ціна набагато нижча, ніж традиційні джерела вуглецю, такі як глюкоза, сахароза та крохмаль. [20].

Для вибору штаму *Y. lipolytica* для отримання кормової біомаси розглянемо наступні поживні середовища У табл.2.1 наведено штами *Y. lipolytica* та відповідні поживні середовища з умовами культивування для їх культивування з метою одержання кормової біомаси.

Таблиця 2.1

Особливості одержання біомаси на основі *Yarrowia lipolytica*

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація біомаси, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	Концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Yarrowia lipolytica</i> S6	Гліцерин-сирець Дріжджовий екстракт Бактеріологічний пептон MgSO ₄ •7 H ₂ O (NH ₄) ₂ SO ₄ KH ₂ PO ₄	40 1 0,75 0,5 10 0,125	16	21,3	Культивування за температури t= 30°C; pH = 3.5; при перемішуванні n = 200 об/хв та аерації 1 об'єм/об'єм/хв)	Juszczuk P., Rymowicz W., Kita A., Rywińska A. Biomass production by <i>Yarrowia lipolytica</i> yeast using waste derived from the production of ethyl esters of polyunsaturated fatty acids of flaxseed oil. <i>Industrial Crops and Products</i> 2019, 138: 111590 doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111590
<i>Yarrowia lipolytica</i> CICC 31596	Оцтова кислота KH ₂ PO ₄ NH ₄ Cl MgSO ₄ •7 H ₂ O FeCl ₃ •6 H ₂ O ZnSO ₄ •7 H ₂ O CuSO ₄ •5 H ₂ O	20 3 1 1 0,015 0,0075 0,0005	72	7,44	Періодичне культивування за умов t= 28°C; pH = 6; n = 180 об/хв	Gao R., Li Z., Zhou X. Zheng L. Oleaginous yeast <i>Yarrowia lipolytica</i> culture with synthetic and food waste-derived volatile fatty acids for lipid production. <i>Biotechnology for Biofuels</i> 2017, 10(247): 1253-1260 doi: 10.1186/s13068-017-0942-6
<i>Yarrowia lipolytica</i> CBS 6303	Глюкоза KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ MgSO ₄ •7•H ₂ O (NH ₄) ₂ SO ₄ Дріжджовий екстракт CaCl ₂ FeCl ₃ •6 H ₂ O ZnSO ₄ •7 H ₂ O MnSO ₄ •H ₂ O	60 7 2,5 1,5 0,5 0,5 0,15 0,15 0,02 0,06	72	5,23	Культивування з такими параметрами t= 28°C; pH = 5-6; n = 185 об/хв	Carsanba E., Papanikolaou S., Fickers P., Erten H. Lipids by <i>Yarrowia lipolytica</i> Strains Cultivated on Glucose in Batch Cultures. <i>Microorganisms</i> 2020, 8(7) doi:10.3390/microorganisms8071054

Проаналізувавши інформацію, яка наведена в табл. 2.1, можна зробити висновки, що при культивуванні *Yarrowia lipolytica* S6 на середовищі з гліцерином показники синтезу біомаси були найвищими і становить 21,3 г/л відповідно. Також цей штам має менший час культивування який складає 16 годин. Тому на наступному етапі вибору біологічного агенту розрахуємо вартість поживних середовищ для культивування штамів *Yarrowia lipolytica* (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування штамів *Yarrowia lipolytica*

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	4	5	6
<i>Yarrowia lipolytica</i> S6	Сирий гліцерин	40	7,31	0,2924	1
	Дріжджовий екстракт	1	128	0,128	2
	Бактеріологічний пептон	0,75	384	0,288	3
	MgSO ₄ •7 H ₂ O	0,5	3,3	0,00165	4
	(NH ₄) ₂ SO ₄	10	28	0,28	5
	KH ₂ PO ₄	0,125	33	0,0041	6
	Вартість 1 л середовища – 0,99 грн				
<i>Yarrowia lipolytica</i> CICC 31596	Оцтова кислота	20	98	1,96	7
	KH ₂ PO ₄	3	33	0,099	6
	NH ₄ Cl	1	5,4	0,0054	8
	MgSO ₄ •7 H ₂ O	1	3,3	0,0033	4
	FeCl ₃ •6 H ₂ O	0,015	191	0,00287	9
	ZnSO ₄ •7 H ₂ O	0,0075	64	0,00048	10
	CuSO ₄ •5 H ₂ O	0,0005	160	0,00008	11
Вартість 1 л середовища – 2,07 грн					
<i>Yarrowia lipolytica</i> CBS 6303	Глюкоза	60	55	3,3	12
	KH ₂ PO ₄	7	33	0,231	6
	Na ₂ HPO ₄	2,5	70	0,175	13
	MgSO ₄ •7•H ₂ O	1,5	3,3	0,005	4
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	28	0,014	5
	Дріжджовий екстракт	0,5	128	0,064	2
	CaCl ₂	0,15	65	0,00975	14
	FeCl ₃ •6 H ₂ O	0,15	191	0,0287	9
	ZnSO ₄ •7 H ₂ O	0,02	64	0,00128	10
	MnSO ₄ •H ₂ O	0,06	49	0,00294	15
	Вартість 1 л середовища – 3,83 грн				

Примітка. * - ціни наведено на березень 2023 р.–

- 1) https://www.alibaba.com/product-detail/Crude-glycerine-80-in-Africa-for-10000009925810.html?spm=a2700.details.you_may_like.1.a09a1dd9LGTJo5
- 2) https://www.alibaba.com/product-detail/levadura-saccharomyces-cerevisiae-high-nucleotide-yeast-1600075249318.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.5be518a6LuD0UG
- 3) https://www.alibaba.com/product-detail/QYherb-Factory-Wholesales-Bulk-Peptide-Bacteriological-1600655980328.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.1f40223bliYgfp
- 4) https://www.alibaba.com/product-detail/Epsom-Bitter-Salt-Mgso4-Solid-Fertilizer-1600902279158.html?spm=a2700.galleryofferlist.topad_classic.d_title.59ea48fckopaSA
- 5) https://www.alibaba.com/product-detail/Cas-7783-20-2-Nitrogen-Fertilizer-1601033275368.html?spm=a2700.galleryofferlist.p_offer.d_title.2779406bbBRe5&s=p
- 6) https://www.alibaba.com/product-detail/Water-Soluble-MKP-P2O5-Mono-potassium-1600223112790.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.70ef3c21fSxFY9
- 7) <https://prom.ua/ua/p1683418108-uksusnaya-kislota-pischevaya.html?&primelead=Ml4xNQ>
- 8) https://www.alibaba.com/product-detail/Nh4cl-Nh4cl-Ammonium-Chloride-Ammonium-Chloride-60763023912.html?spm=a2700.galleryofferlist.p_offer.d_title.5ecf4e07VvwYiW&s=p
- 9) <https://klebrig.com.ua/ua/p1453165808-zhelezo-hlornoe-vodnoe.html>
- 10) <https://prom.ua/ua/p1530030759-tsink-sernokislyj-tehnicheskij.html?&primelead=MS45>
- 11) https://all-him.com.ua/p/2164963-mednyy-kuporos-vysshiy-sort-kupit-optom-i-ot-5kg/?o=tG0FgrPrkLQIV3l-IMkrYg==&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwxqayBhDFARIsAANWRnQ3G8H0IGXk4k0RjIiKAmY0n-yCNT4GhTK93omEB7298FUmkuty8GkaAsIxEALw_wcB
- 12) <https://prom.ua/ua/p1559014336-glyukoza-pischevaya-meshok.html>

13) https://www.alibaba.com/product-detail/Sodium-hydrogen-phosphate-anhydrous-Na2HPO4-CAS_1601128167400.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.892072630A_xboX

14) https://prom.ua/ua/p1740409998-hlorid-kaltsiya-1kg.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=Cj0KCQjwt_qgBhDFARIsABcDjOeUw2XLOCcy_UjLidixZwi57GIJltgnGEib6SM9Es_xNpVV0i19caAoAZEALw_wcB

15) <https://flagma.ua/uk/sulfat-margancyu-marganec-sirchanokisliy-1-vodniy-o13623083.html>

Як видно з даних, наведених у табл. 2.2, середовище для культивування *Yarrowia lipolytica* S6 є майже у 2 та 3,87 рази дешевшим, ніж для *Yarrowia lipolytica* CICC 31596 та *Yarrowia lipolytica* CBS 6303. Тому для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3)

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 мг біомаси при культивуванні *Yarrowia lipolytica*

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної біомаси за годину, г/год	Вартість 1 л середо-вища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Yarrowia lipolytica</i> S6	21,3	16	1,331	0,99	0,046
<i>Yarrowia lipolytica</i> CICC 31596	7,44	72	0,103	2,07	0,278
<i>Yarrowia lipolytica</i> CBS 6303	5,23	72	0,0726	3,83	0,732

Проаналізувавши табл. 2.3, можна зробити висновки, що штам *Yarrowia lipolytica* CBS 6303 є малоефективним для отримання кормової біомаси, через низький вихід біомаси та найдорожчу вартість 1 г цільового продукту.

Хоч штами *Yarrowia lipolytica* CICC 31596 і *Yarrowia lipolytica* CBS 6303 мають однаковий час культивування, який становить 72 год, але штам *Yarrowia lipolytica* CICC 31596 має більший вихід біомаси і нижчу вартість 1 л середовища, яка складає 2,15 грн/л.

Серед цих трьох штамів найкращим біологічним агентом для виробництва кормової біомаси є штам *Yarrowia lipolytica* S6, через більшу концентрацію біомаси, меншу тривалість культивування, більшу кількість утвореної біомаси за годину, найменшу вартість поживного середовища та умовну вартість 1 г цільового продукту, які становлять 21,3 г/л, 16 год, 1,33 г/год, 0,99 грн/л та 0,046 грн/г відповідно.

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Для свого росту мікроорганізми потребують всіх елементів, з яких складається клітина, у такій формі в якій вони здатні їх споживати. До складу мікробної клітини входять наступні елементи: (в % до маси сухої речовини): Карбон – 50; Оксиген – 20; Нітроген – 10...14; Гідроген – 8; Фосфор – 3; Сульфур, Калій, Натрій - 1; Кальцій, Магній, Хлор – 0,5; Ферум – 0,2; решта елементів – близько 0,3 [21].

2.2.1. Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

При культивування *Yarrowia lipolytica* S6 в якості джерела вуглецевого живлення виступає гліцерин-сирець. За інформацією наведеною в джерелі [20] в гліцерині-сирці міститься 83% чистого гліцерину. Визначаємо скільки чистого гліцерину міститься в 1 л поживного середовища, якщо концентрація гліцерину-сирцю 40 г/л:

$$40 \text{ г} * 0,83 = 33,2 \text{ г}$$

Отже, в 1 л поживного середовища міститься 33,2 г чистого гліцерину.

Далі розраховуємо скільки вуглецю міститься 21,3 г біомаси *Yarrowia lipolytica*, якщо відомо, що в біомасі міститься 50% вуглецю. Кількість вуглецю в біомасі становить:

$$21,3 * 0,5 = 10,65 \text{ г}$$

Далі розраховуємо у скількох грамах чистого гліцерину міститься 10,65 г вуглецю. Молекулярна маса гліцерину 92, а вуглецю міститься 36. З цього виходить, що кількість чистого гліцерину становить:

$$92 \text{ г} - 36 \text{ г}$$

$$X \text{ г} - 10,65 \text{ г}$$

$$X = 92 \times 10,65 / 36 = 27,22 \text{ г}$$

Враховуючи, що 40% субстрату витрачається на «холосте окислення», для одержання 21,3 г біомаси у середовище необхідно внести $(27,22 \times 0,4) + 27,22 = 38,11$ г/л чистого гліцерину.

Розраховуємо у скількох г гліцерину-сирцю міститься 38,11 г чистого гліцерину:

$$38,11 \text{ г} - 83\%$$

$$X \text{ г} - 100\%$$

$$X = 38,11 \times 100 / 83 = 45,92 \text{ г}$$

Як видно з розрахунків, у середовищі присутня недостача джерела вуглецевого живлення для біосинтезу 21,3 г біомаси *Yarrowia lipolytica* S6. Щоб вирішити цю проблему, у поживне середовище необхідно додати $45,92 - 40 = 5,92$ г/л гліцерину-сирцю.

2.2.2. Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Виходить, що 21,3 г біомаси міститься 2,13 г азоту.

Біологічний агент асимілює як джерела азотного живлення мінеральний (амонійний) та органічний Нітроген. Для синтезу біомаси *Yarrowia lipolytica* S6

використовується середовище, в якому як джерело мінерального Нітрогену виступає сульфат амонію $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, а як джерело органічного нітрогену – бактеріологічний пептон та дріжджовий екстракт.

Розрахуємо кількість нітрогену, яка міститься в 10 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Молекулярна маса $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ складає 132, а кількість нітрогену становить 28. Виходить, що кількість нітрогену, яка міститься в 1 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ дорівнює:

$$132 \text{ г} - 28 \text{ г}$$

$$10 \text{ г} - X \text{ г}$$

$$X = 28 \times 10 / 132 = 2,12 \text{ г}$$

Далі переходимо до розрахунку кількості органічного нітрогену в середовищі. Припустимо, що загальна кількість нітрогену в дріжджовому екстракті складає 10,8% [22], з цього виходить, що кількість нітрогену в дріжджовому екстракті дорівнює:

$$1 \times 0,108 = 0,108 \text{ г}$$

Після цього розраховуємо кількість нітрогену в 0,75 г бактеріологічному пептоні враховуючи, що в пептоні міститься 15,4 % Нітрогену [23]:

$$0,75 \times 0,154 = 0,116 \text{ г}$$

Розраховуємо загальну кількість органічного нітрогену:

$$0,108 + 0,116 = 0,224 \text{ г}$$

Визначаємо загальну кількість нітрогену в поживному середовищі:

$$2,12 + 0,224 = 2,34 \text{ г}$$

Отже, кількості нітрогену в поживному середовищі міститься в надлишку для синтезу 21,3 г біомаси.

2.2.3. Розрахунок вмісту в середовищі джерела фосфору

У клітині міститься близько 3% фосфору. Звідси виходить, що у 21,3 г біомаси міститься 0,639 г фосфору. Далі розраховуємо, скільки фосфору міститься в 0,125 г KH_2PO_4 . Молекулярна маса KH_2PO_4 132, а кількість фосфору становить 31. Значить вміст фосфору в 0,125 г KH_2PO_4 дорівнює:

$$132 \text{ г} - 31 \text{ г}$$

$$0,125 \text{ г} - X \text{ г}$$

$$X = 31 \times 0,125 / 132 = 0,029 \text{ г}$$

Отже, фосфору в середовищі міститься в малій кількості, тому далі необхідно розрахувати скільки $\text{KН}_2\text{PО}_4$ необхідно додати до середовища, щоб отримати 21,3 г біомаси.

У 0,125 г $\text{KН}_2\text{PО}_4$ міститься 0,029 г фосфору, тоді 0,639 г фосфору міститься в X г $\text{KН}_2\text{PО}_4$:

$$0,125 \text{ г} - 0,029 \text{ г}$$

$$X \text{ г} - 0,639 \text{ г}$$

$$X = 0,639 \times 0,125 / 0,029 = 2,75 \text{ г}$$

Отже, до середовища необхідно додатково внести $2,75 - 0,125 = 2,625$ г $\text{KН}_2\text{PО}_4$, щоб воно містило достатню кількість фосфору для синтезу 21,3 г біомаси.

У табл. 2.4 наведено порівняння старого та оновленого складу поживного середовища.

Таблиця 2.4

Склад поживного середовища для культивування біологічного агента

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	
	Оновлене ПС	Початкове ПС
Гліцерин-сирець	45,92	40
Дріжджовий екстракт	1	1
Бактеріологічний пептон	0,75	0,75
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,5	0,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	10
$\text{KН}_2\text{PО}_4$	2,75	0,125

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica – це нетрадиційні вид дріжджі, який є аскоміцетом і має широкого діапазону застосувань у біотехнології. Управління продовольства та медикаментів США класифікувало ці дріжджі як загально безпечні. Вони

вважаються непатогенною дріжджовою формою через максимальну температуру росту нижче 34 °С , що нижче, ніж температура тіла людини [24].

Клітини *Yarrowia lipolytica* бувають сфероїдної, еліпсоїдної та витягнутою форми. Їхня довжина клітин в середньому сягає 5- 10 мкм , а діаметр 3-7,8 мкм. Клітинна стінка у дріжджевій формі не відрізняється від клітинної стінки міцелію. За хімічним складом клітинна стінка складається: з 70% нейтральних вуглеводів, 7% аміноцукрів, 15% білка, 5% ліпідів і 0,8% фосфору. До полісахаридів, які входять до складу клітинної стінки, належать глюкан, манан і хітин [25, 26].

Однією з унікальних особливостей дріжджів *Y. lipolytica* є зміна розміру та морфології клітин за різних умов росту на різних середовищах. *Y. lipolytica* є диморфними дріжджами, вони здатні здійснювати перехід між дріжджовою та міцеліальною формами. Коли ріст відбувається при низькій концентрації розчиненого кисню переважають псевдоміцеліальні та міцеліальні форми, а при високій концентрації розчиненого кисню – дріжджова форма [27].

Справжній міцелій складається з гіф з перегородками шириною 3-5 мкм і довжиною до кількох мм. Сегменти мають довжину 50-70 мкм, а апікальні клітини часто перевищують 100 мкм На один сегмент припадає одне ядро. У перегородках є дрібна центральна пора аскоміцетного типу з ендоплазматичним ретикуломом, що тягнеться через неї від одного сегмента до іншого [28].

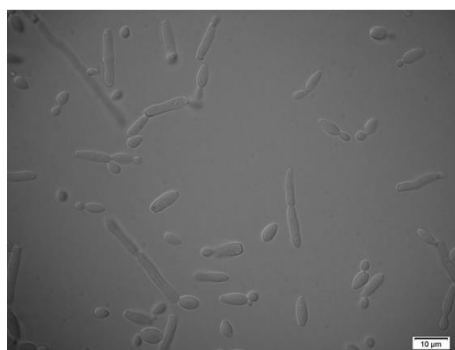


Рис. 2.1. Морфологія клітин *Y. lipolytica* [27]

Yarrowia lipolytica являється строгим аеробом, тому потребує молекулярного кисню для свого росту. Ці дріжджі здатні реалізувати хемогетеротрофний тип живлення. Можуть рости на середовищах з високою концентрацією NaCl до 15%,

тому являються галотолерантними. *Y. Lipolytica* росте в широкому діапазоні кислотності від рН 2,5 до рН 8. Оптимальна температура росту для неї становить 25-30°C. Для свого росту потребує вітаміни, тому є ауксотрофом за вітаміном В₁ та лейцином [29].

За типом живлення як і більшість дріжді – хемоорганогетеротроф, тобто як джерело енергії викростовує хімічні речовини, як донори електронів використовує органічні субстрати та отримує вуглець з органічних джерел [30].

Y. lipolytica здатна виробляти багато метаболітів: органічні кислоти, позаклітинні білки, каротиноїди, віск, складні ефіри, етилові ефіри жирних кислот. омега-3 жирні кислоти [31].

Y. lipolytica здатна розмножуватись статевим та безстатевим шляхом. Ці дріжджі мають життєвий цикл із гаплоїдною та диплоїдною фазами. При безстатевому розмноженні розмножується за допомогою багатостороннього брунькування та іноді утворює артроконідії [28].

При статевому розмноженні утворюють некон'юговані аски з 1–4 аскоспорами в диплоїдних гіфах. Аски зазвичай знаходяться на клітинах гіф і рідко на одному бластоконідіумі. Аски можуть бути стеблинчастими або сидячими і здаватись розпливчастими. Аскоспори мають сфероїдну, напівсфероїдну або дещо трикутну форму. *Y. lipolytica* – це гетероталічні дріжджі, у них злиття або кон'югація відбувається між потомками різних гаплоїдних клітин [27].

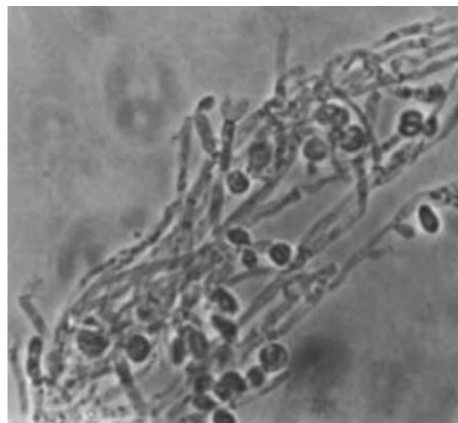


Рис. 3.2. Аски та аскоспори *Y. Lipolytica* [27]

Цитрат є найкращим джерелом вуглецю для індукції споруляції в *Y. lipolytica*, тоді як глюкоза та аналоги глюкози повинні вичерпатися для споруляції. На відміну від *S. cerevisiae* та інших дріжджів, для індукції спороутворення не потрібне обмеження азоту. Оптимальне значення рН для повного утворення спор становить приблизно 6. Найвищі частота утворення спор спостерігається при температурі 20–30°C [28].

Y. lipolytica добре росте на рідких і твердих поживних середовищах. При рості на дріжджовому екстракт-пептон-декстрозному агарі (YPDA) утворює пухнасті колонії з нерівним краєм білого кольору з світло-коричневими включеннями [27].



Рис. 2.3. Колонії *Y. Lipolytica* при рості на YPDA [27]

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Yarrowia lipolytica з часу свого відкриття змінила багато назв. На сьогоднішній день синонімічними назвами є *Mycotorula lipolytica*, *Torula lipolytica*, *Candida lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica*, *Candida lipolytica*. Назва «*lipolytica*» походить від чудової ліполітичної активності при гідролізі ліпідів. Сучасна таксономічна класифікація наведена згідно електронного ресурсу «Mycobank» [27, 31]

Царство – *Fungi*

Підцарство – *Dikarya*

Тип – *Ascomycota*

Клас – *Saccharomycetes*

Порядок – *Saccharomycetales*

Родина – *Dipodascaceae*

Рід – *Yarrowia*

Вид – *Lipolytica*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Розрахунок потреби у цільовому продукті

Для нормального росту та розвитку тваринам необхідне збалансоване харчування, ця потреба забезпечується за рахунок використання змішаного раціону – поєднання натуральних кормів з різними харчовими добавками. Кормові дріжджі – є популярною харчовою добавкою, яка використовується у багатьох галузях тваринництва [32]

Білок кормових дріжджів у тварин засвоюється більш повноцінно, ніж рослинний. Дріжджова зола у своєму складі містить багато мікро- і макроелементів, які необхідні організму тварин [8].

Потреба в кормових дріжджах постійно зростає, але покрити її всю не здатне жодне підприємство, тому для розрахунку візьмемо потребу, яка виникла у галузі свинарства. Згідно з статистикою Міністерства аграрної політики та продовольства станом на 2023 рік чисельність поголів'я свиней становила 4960,1 тис. голів, так як покрити загальну потребу ринку неможливо для розрахунків візьмемо невелике підприємство ТОВ "АГРОПЛЮС 2006", яке займається вирощуванням свиней без антибіотиків. За статистикою наведеною Асоціацією свинарів України, куди входить ТОВ "АГРОПЛЮС 2006", це підприємство станом на 01.01.2021 має маточне поголів'я свиней у розмірі 490 голів [33, 34].

Рекомендовані норми вводу кормових дріжджів в кормовий раціон маточних свиней складає 100-200 г на добу. Для розрахунку візьмемо 150 г на добу. Також кормові дріжджі необхідно додавати в корм кожного дня в незалежності від сезону [8].

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Сидоренко М.Р.</i>					29	136
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>				Кафедра БТМ		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Таблиця 3.1

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в кормових дріжджах

Вид тварин	Розмір поголів'я, гол	Добова потреба, г/день	Тривалість прийому, днів
1	2	3	4
Маточні свинні	490	150	365

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Індустрія виробництва кормових дріжджів має великий потенціал і популярність серед споживачів України. На цьому ринку представлено багато виробників кормових дріжджів: серед них як і великі заводи, так і невеликі підприємства. Серед виробників цього продукту зустрічаються українські та іноземні виробники, які постачають свою продукцію на наші території. Слід зауважити, що частка іноземних виробників значно нижча порівняно з українськими виробниками. У таблиці 1.2 наведений невеликий перелік виробників кормових дріжджів.

Таблиця 3.2

Виробники кормових дріжджів

Назва виробника	Країна походження	Фасування	Ціна
ТОВ Завод «Екорм»	Україна	1 кг	41,94 грн/кг
ТОВ «Сівер Агро»	Україна	1 кг	60 грн/кг
ТОВ «Караванський завод кормових дріжджів»	Україна	1 кг	65 грн/кг
O.L.KAR.	Україна	1 кг	63 грн/кг
ТОВ «ЗООсет»	Україна	1 кг	58 грн/кг
DOLFOS	Польща	2 кг	74 грн/кг
ПК «Коло»	Україна	1 кг	43 грн/кг

Важливо відзначити, що на даний момент в Україні немає жодного підприємства, яке виготовляло б кормові дріжджі з сирого гліцерину, отриманого як побічний продукт.

На основі даних наведених в табл. 1.1 проводимо розрахунок для визначення річної потреби культуральної рідини.

Для початку, визначаємо скільки кормових дріжджів необхідно для 490 голів свиней на добу:

$$490 \text{ голів} * 150 \text{ г/день} = 73500 \text{ г/день} = 73,5 \text{ кг/день}$$

Тоді кількість кормових дріжджів необхідних для 490 голів свиней на цілий рік становить:

$$73,5 \text{ кг/день} * 365 \text{ днів} = 26828 \text{ кг/рік}$$

Отже, для забезпечення річної потреби для маточного поголів'я свиней кормовими дріжджами необхідно 26828 кг кормових дріжджів у рік.

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Виробнича потужність виробництва кормових дріжджів становить $G_{гп} = 26828 \text{ кг/рік}$. Кормові дріжджі отримують сухими із залишковою вологою $W =$ до 10 %, отже сухої речовини в продукті буде $CP = 0,91$ (частка). Відповідно до наукової статті біологічний агент – *Yarrowia lipolytica* S6 синтезує 21,3 г біомаси на 1 л культуральної рідини [5].

Плануємо, що таку кількість продукту підприємство буде виготовляти за $T_{рд} = 330$ робочих трудовнів. Тоді кількість виробничих циклів буде дорівнювати:

$$N_{цк} = 24 \cdot T_{рд} / T_{цф} = 24 \cdot 330 / 24 = 330 \text{ циклів}$$

де, $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу та час підготовки ферментера до роботи

Тривалість підготовчих робіт та сам виробничий біосинтез складатимуть 24 год: миття та огляд апарату – 1,5 год; перевірка на герметичність - 1 год; підігрів апарату - 0,5 год; стерилізація апарату – 1 год; охолодження апарату – 1 год;

завантаження середовища - 1,5 год; засів - 0,5 год; вивантаження культуральної рідини – 1 год; виробничий біосинтез – 16 год.

Кількість продукту за цикл становить:

$$G_{цк} = G_{гп} / N_{цк} = 26827,5 / 330 = 81,3 \text{ кг/цикл.}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за один цикл, із врахуванням сумарних втрат цільового продукту при виділенні (10 %):

$$V_{кр} = K1 \cdot G_{цк} \cdot C_{гп} / X_{кр}(1 - E_{св}) = 1,1 \cdot 81,3 \cdot 0,91 / (21,3 \cdot (1 - 0,1)) = 4,25 \text{ м}^3$$

де $K1$ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K1 = 1,1 - 1,5$).

Отже, за виробничий цикл отримують $V_{кр} = 4,25 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини необхідно врахувати її втрати в через колектор відпрацьованого повітря результаті краплевиносу, які становлять 15%. Тоді робочий об'єм ферментера має становити:

$$V_{рф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 4,25 / (1 - 0,15) = 5 \text{ м}^3$$

Після цього розраховуємо приблизний геометричний об'єм ферментера, при коефіцієнті заповнення ферментера $K_{зф} = 0,5$:

$$V_{пф} = V_{рф} / K_{зф} = 5 / 0,5 = 10 \text{ м}^3$$

Згідно з таблицею, цей об'єм ферментера є типовим для ферментерів, тоді $V_{гф} = 10 \text{ м}^3$. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зф} = V_{рф} / V_{гф} = 5 / 10 = 0,5 - \text{відповідає заданому значенню}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 5 / (1 + 0,1) = 4,5 \text{ м}^3$$

Тоді, кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 5 - 4,5 = 0,5 \text{ м}^3$$

Для одержання $0,5 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від

10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{кр}) = 0,5 / (1 - 0,15) = 0,588 \text{ м}^3 \text{ або } 588 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у посівному апараті буде становити:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{пм}) = 588 / (1 + 0,1) = 534,5 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 588 - 534,5 = 53,5 \text{ л.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна отримати під час культивування дріжджів у посівному апараті з геометричним об'ємом

$$V_{пф2} = V_{роб.2} / K_{зап} = 0,588 / 0,5 = 1,18 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер , та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$V_{гф2} = 1 \text{ м}^3$$

$$K_{зап2} = V_{роб.2} / V_{гф2} = 0,588 / 1 = 0,588.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення знаходиться у вибраних межах для аеробних процесів 0,5-0,65, отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Враховуємо втрати у результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%, для одержання 53,5 л інокуляту в інокуляторі. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1 - E_{кр}) = 53,5 / (1 - 0,15) = 63 \text{ л.}$$

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

Тоді кількість поживного середовища у посівному апараті буде становити:

$$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{пм}) = 63 / (1 + 0,1) = 57,27 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 63 - 57,27 = 5,73 \text{ л}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна отримати під час культивування дріжджів в інокуляторі з геометричним об'ємом

$$V_{\text{пф3}} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап}} = 63 / 0,5 = 126 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$V_{\text{Гф3}} = 100 \text{ л}$$

$$K_{\text{зап3}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{Гф3}} = 63 / 100 = 0,63$$

Уточнений коефіцієнт заповнення знаходиться у вибраних межах для аеробних процесів 0,5-0,65, отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Для одержання 5,73 л посівного матеріалу враховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{кр}}) = 5,73 / (1 - 0,15) = 6,74 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу для малого інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде складати:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} / (1 + X_{\text{пм}}) = 6,74 / (1 + 0,1) = 6,13 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 6,74 - 6,13 = 0,61 \text{ л.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна отримати під час культивування дріжджів в інокуляторі з геометричним об'ємом

$$V_{\text{пф4}} = V_{\text{роб.4}} / K_{\text{зап}} = 6,74 / 0,5 = 13,8 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$V_{\text{Гф4}} = 12 \text{ л}$$

$$K_{\text{зап4}} = V_{\text{роб.4}} / V_{\text{сф}} = 6,74 / 12 = 0,56$$

Цю кількість посівного матеріалу можна отримати в колбах на качалках об'ємом 0,75 л і з коефіцієнтом заповнення 0,2. Тоді кількість колб для вирощування інокуляту буде становити:

$$N = 0,61/0,75*0,2 = 4,1 = 5 \text{ колб}$$

Тоді кількість поживного середовища для вирощування посівного матеріалу буде складати:

$$V_{пс5} = V_{роб.4} / (1 + X_{пм}) = 0,61 / (1 + 0,1) = 0,55 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм5} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 0,61 - 0,55 = 0,06 \text{ л.}$$

Таблиця 3.3

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{кр}, \text{ м}^3 (\text{л})$	Робочий об'єм ферментера, $V_p, \text{ м}^3 (\text{л})$	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}, \text{ м}^3 (\text{л})$	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}, \text{ м}^3 (\text{л})$	Приблизний об'єм апарата, $V_{пр} \text{ м}^3 (\text{л})$	Геометричний об'єм ферментера, $V_{ст}, \text{ м}^3 (\text{л})$
1	2	3	4	5	6	7
1.	4,25	5	4,5	0,5	-	10
2.	0,5	588 л	534,5 л	53,5 л	1,2	1
3.	53,5 л	63 л	57,27 л	5,73 л	126 л	100 л
4.	5,73 л	6,74 л	6,13 л	0,61 л	13,5 л	12 л
5.	0,61 л	0,61 л	0,55 л	0,06 л	4,1	5 колб

Отже, за результатами розрахунків для отримання кормової біомаси біологічним агентом *Yarrowia lipolytica* необхідно встановити ферментер для біосинтезу об'ємом 10 м³, посівний апарат об'ємом 1 м³, по одному інокулятору об'ємом 100 л та 12 л. Таким чином, процес одержання посівного матеріалу буде проходити в 4 етапи.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Ростовим субстратом для біосинтезу біомаси *Yarrowia lipolytica* є гліцерин. Користуючись Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [36] та інформацією з наукової статті про метаболізм у дріжджів *Yarrowia lipolytica* [37], наводимо схему катаболізму ростового субстрату.

Гліцерин за участю гліцеринкінази (КФ 2.7.1.30) перетворюється на гліцерин-3-фосфат, де останній за дії НАД⁺-залежної гліцерин-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) перетворюється на діоксиацетонфосфат. Ферментативна дія тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) на діоксиацетонфосфат активує його перетворення на гліцеральдегід-3-фосфат. Далі гліцеральдегід-3-фосфат перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат допомогою ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.11). Дія фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) на 1,3-дифосфогліцерат індукує його перетворення на 3-фосфогліцерат.

Під дією 2,3-дифосфогліцератзалежної фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.11) 3-фосфогліцерат перетворюється у 2-фосфогліцерат. На наступному етапі утворюється фосфоенолпіруват з 2-фосфогліцерату за допомогою енолази (КФ 4.2.1.11). На останньому етапі катаболізму ростового субстрату фосфоенолпіруват перетворюється на піруват під дією ферменту піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сидоренко М.Р.			РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					36	136
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

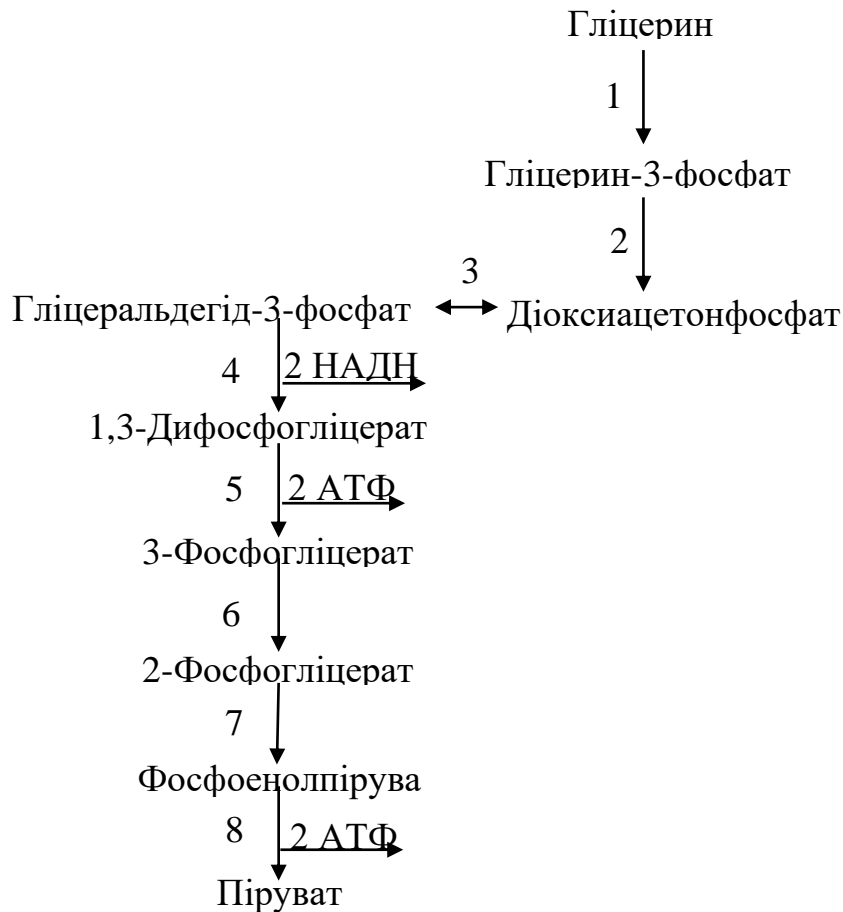


Рис.4.1 Схема катаболізму гліцерину

Ферменти: 1– гліцеринкіназа (КФ 2.7.1.30); 2– НАД⁺-залежної гліцерин-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 3– тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1); 4– гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.11); 5– фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 6 - 2,3-дифосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11), 7 – Енолаза (КФ 4.2.1.11), 8 - Піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *Y. lipolytica* на субстраті який містить гліцерин, який у свою чергу являється джерелом вуглецевого живлення, кінцевим продуктом катаболізму гліцерину є піруват. За допомогою фермента піруватдегідрогенази (КФ 1.2.4.1) піруват перетворюється на Ацетил-КоА, який далі залучається до Циклу трикарбонових кислот [36, 38].

У даного біологічного агента через ріст на неуглеводному субстраті присутні реакції глюконеогенезу, ключовим ферментом якого є фосфоенолпіруваткарбоксікіназа (КФ 4.1.1.49), під дією якого оксалоацетат перетворюється на фосфоенолпіруват. За рахунок цих реакцій утворюються 3-фосфогліцерат, фосфоенолпіруват, фруктозо-6-фосфат та глюкозо-6-фосфат, які необхідні для подальших реакцій конструктивного метаболізму [36].

У якості анаплеротичних реакцій для регенерації інтермедіатів ЦТК, необхідних для процесів біосинтезу, виступає гліоксалатний цикл. Ця послідовність реакцій здійснюється за участі двох ключових ферментів ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1), яка розщеплює ізоцитрат на сукцинат і гліоксалат, та малатсинтази (КФ 2.3.3.9), яка приєднує гліоксалат до ацетил-КоА з утворенням малату [39].

Для утворення біомаси клітині необхідно синтезувати основні органічні сполуки, що входять до складу клітини, а саме: нуклеїнових кислоти, білки, полісахариди, які входять до складу клітинної стінки і ліпіди.

Попередником синтезу білків є 20 амінокислот, які можна розділити на 4 родини. Попередником синтезу аспартатної родини (аспартат, аспарагін, метіонін, треонін та ізолейцин) є оксалоацетат, який є інтермедіатом ЦТК [40].

2-Оксоглутарат є попередником глутаматної родини, до якої належать такі амінокислоти, як глутамат, глутамін, пролін, аргінін, а також лізин, який у дріжджів синтезується через аміноадипінову кислоту [40].

Синтез піруватної родини (аланін, валін, лейцин) відбувається через піруват, який є попередником біосинтезу цієї родини. Деякі амінокислоти, які також належать до піруватної родини, а саме серин, гліцин та цистеїн, мають фосфогліцерат в якості попередника біосинтезу [40].

Для синтезу останньої родини амінокислот необхідні еритрозо-4-фосфат та фосфорибозил пірофосфат, які утворюються завдяки залученню утвореного під час глюконеогенезу глюкозо-6-фосфату в пентозофосфатний цикл. Попередником ароматичної амінокислоти гістидину є фосфорибозилпірофосфат, також ця сполука

використовується для синтезу триптофану. Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват є попередниками фенілаланіну, тирозину і триптофану [40, 41].

Нуклеотиди з яких складаються нуклеїнові кислоти синтезуються двома шляхами. Синтез піримідинових нуклеотидів починається з конденсації карбамоїлфосфату та аспартату за дією ферменту аспартаткарбамоїлтрансферази (КФ 2.1.3.2) з утворенням карбамоїласпартату. Далі карбамоїласпартат перетворюється на 4,5-дигідрооротат за допомогою ферменту дигідрооротази (КФ 3.5.2.3). На наступному етапі 4,5-дигідрооротат перетворюється на оротат під дією ферменту дигідрооротатдегідрогенази (КФ 1.3.5.2). За допомогою оротатфосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.10) з оротату та 5-фосфорибозил-1-пірофосфату утворюється оротидинмонофосфат. Ця сполука перетворюється на уридинмонофосфат під дією уридинмонофосфатсинтетази (КФ 4.1.1.23). Далі утворюється уридиндифосфат за допомогою УМФ-ЦМФ кінази (КФ 2.7.4.14). З уридиндифосфату утворюється уридинтрифосфат під дією ферменту нуклеозиддифосфаткінази (КФ 2.7.4.6). На заключному етапі з уридинтрифосфат утворюється цитидинтрифосфат за допомогою ЦТФ-синтази (КФ 6.3.4.2) [42]

Синтез пуринових нуклеотидів починається з 5-фосфорибозил-1-пірофосфату, який через декілька проміжних реакцій перетворюється на імідазольний нуклеотид. Цей нуклеотид перетворюється на інозинмонофосфат. Декілька додаткових реакцій перетворюють інозинмонофосфат на гуанозинмонофосфат або на аденозинмонофосфат. Далі аденозинмонофосфат перетворюється на аденозиндифосфат, а потім на аденозинтрифосфат за допомогою ферментів аденілаткінази (КФ 2.7.4.3) та нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6). Подальше перетворення гуанозинмонофосфату відбувається наступним шляхом: спершу перетворення на гуанозиндифосфат за допомогою ферменту гуанілаткіназа (КФ 2.7.4.8), а потім перетворення на гуанозинтрифосфат за допомогою ферменту нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6) [43].

Ліпіди еукаріотів синтезуються з двох попередників: 3-фосфогліцерину та жирних кислот. 3-фосфогліцерин утворюється під час катаболізму гліцерину за

допомогою ферменту гліцеринкінази (КФ 2.7.1.30). Жирні кислоти синтезуються у наступний спосіб: з ацетил-КоА утворюється малоніл-КоА під дією ферменту ацетил-КоА-карбоксилази (КФ 6.4.1.2), а також ацетил-АПБ. Синтез жирних кислот відбувається шляхом приєднання до ацетил-АПБ C₂-фрагментів у формі малоніл-КоА.

До складу клітинної стінки *Yarrowia lipolytica* входять хітин, глюкан та манан. Біосинтез хітину починається з перетворення фруктозо-6-фосфату, який утворився під час глюконеогенезу, на глюкозамін-6-фосфат під дією ферменту глутамін-фруктозо-6-фосфат трансамінази (КФ 2.6.1.16). На наступному етапі глюкозамін-6-фосфат перетворюється на N-Ацетил-D-глюкозамін-6-фосфат за допомогою глюкозамін-фосфат-N-ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.4). Далі N-Ацетил-D-глюкозамін-6-фосфат перетворюється на N-Ацетил-альфа-D-глюкозамін-1-фосфат під ферментативною дією фосфоацетилглюкозамінмутази (КФ 5.4.2.3). УДФ-N-ацетилглюкозаміндифосфорилаза (КФ 2.7.7.23) перетворює N-Ацетил-альфа-D-глюкозамін-1-фосфат на УДФ-N-ацетилглюкозамін. На останньому етапі біосинтезу хітину УДФ-N-ацетилглюкозамін перетворюється на хітин під дією хітинсинтетази (КФ 2.4.1.6) [44].

Попередником біосинтезу манану також є фруктозо-6-фосфат. Ця сполука перетворюється на манозо-6-фосфат під дією ферменту манозо-6-фосфат-ізомерази (КФ 5.3.1.8). Далі фосфоманомутаза (КФ 5.4.2.8) перетворює манозо-6-фосфат на манозо-1-фосфат. Ферментативна дія манозо-1-фосфат-гуанілілтрансферази (КФ 2.7.7.13) перетворює манозо-1-фосфат на ГДФ-манозу. На останньому етапі з ГДФ-манози утворюється манан [44, 45].

Біосинтез глюкану починається з перетворення глюкозо-6-фосфату на глюкозо-1-фосфат за допомогою фосфоглюкомутази (КФ 5.4.2.2), далі ця сполука перетворюється на УДФ-глюкозу під дією УДФ-глюкозо-гексозо-1-фосфат уридилілтрансферази (КФ 2.7.7.12). На останньому етапі УДФ-глюкоза за допомогою 1,3-бета-глюкансинтетази (КФ 2.4.1.34) перетворюється на 1,3-бета-глюкан [44, 46].

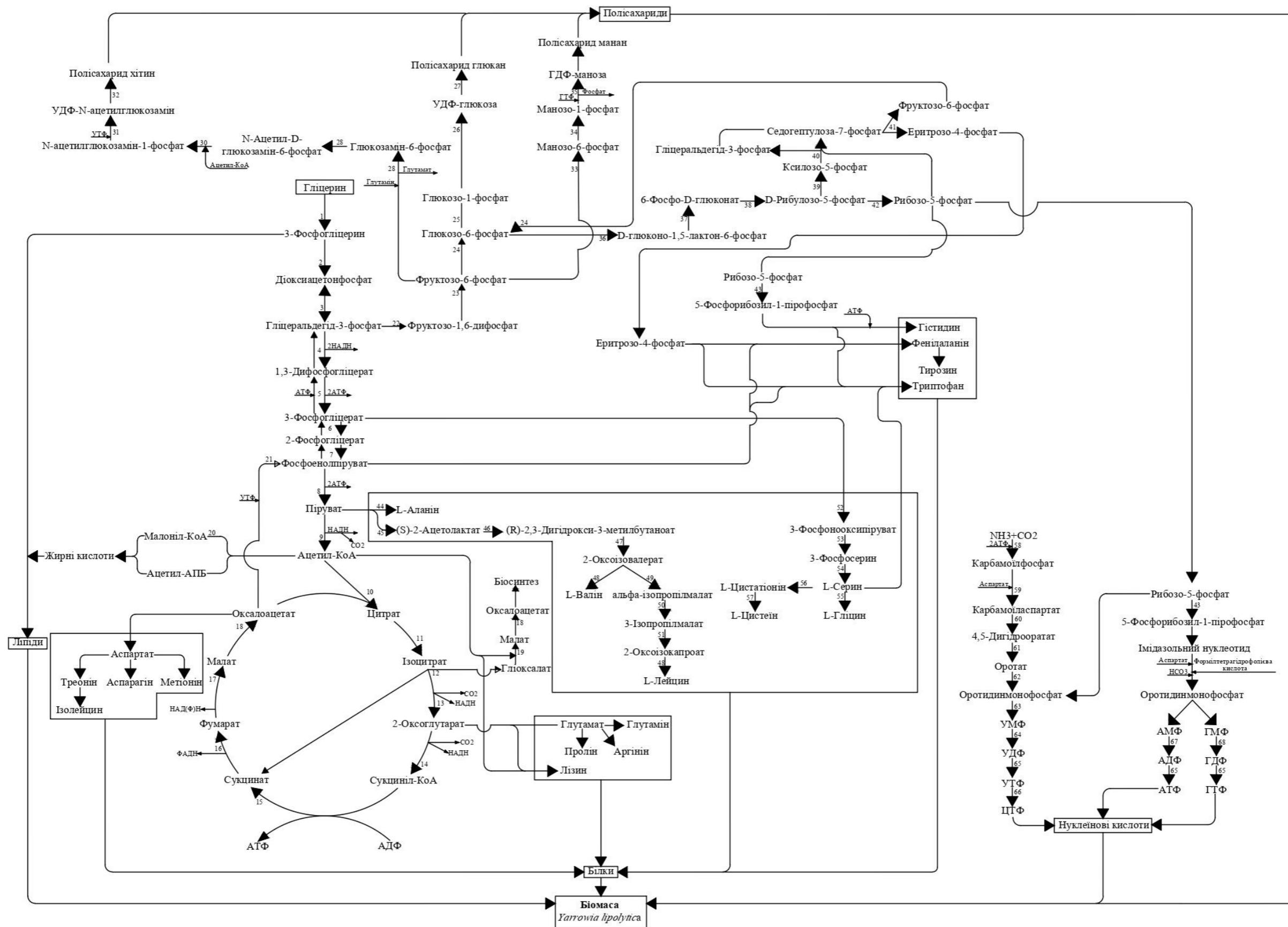


Рис.4.2. Схема біотрансформації ростового субстрату у кінцевий продукт

Ферменти: 1– гліцеринкіназа (КФ 2.7.1.30); 2– НАД⁺-залежної гліцерин-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 3– тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1); 4– гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.11); 5– фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 6 - 2,3-дифосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11), 7 – Енолаза (КФ 4.2.1.11), 8 - Піруваткіназа (КФ 2.7.1.40), 9 - Піруватдегідрогеназа (КФ 1.2.4.1), 10 - Цитратсинтетаза (КФ 2.3.3.1), 11 - Аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3), 12 - Ізоцитратліаза (КФ 4.1.3.1), 13 - Ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42), 14 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа (КФ 1.2.4.2), 15 - Сукцинаттіокіназа (КФ 6.2.1.5), 16 – Сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1), 17 – Фумаратгідратаза (КФ 4.2.1.2), 18 - Малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37), 19 - Малатсинтаза (КФ 2.3.3.9), 20 - Ацетил-КоА карбоксилаза (КФ 6.4.1.2), 21 – Фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (КФ 4.1.1.49), 22- Фруктозодифосфатальдолаза, клас II (КФ 4.1.2.13), 23 - Фруктозо-1,6-бісфосфатаза I (КФ 3.1.3.11), 24 – Глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9), 25 - Фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2), 26 - УТФ- глюкозо-1-фосфат-уридилілтрансфераза (КФ 2.7.7.12), 27 - 1,3-бета-глюкансинтетаза (КФ 2.4.1.34), 28 - Глутамін-фруктозо-6-фосфат трансаміназа (КФ 2.6.1.16), 29 - Глюкозамін-фосфат-N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.4), 30 - Фосфоацетилглюкозамінмутаза (КФ 5.4.2.3), 31 - УДФ-N-ацетилглюкозаміндифосфорилаза (КФ 2.7.7.23), 32 - Хітинсинтетаза (КФ 2.4.1.6), 33 - Манозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.8), 34 - Фосфоманомутаза (КФ 5.4.2.8), 35 - Манозо-1-фосфат-гуанілілтрансфераза (КФ 2.7.7.13), 36 - Глюкозо-6-фосфат-1-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.49), 37 - 6-Фосфоглюконолактоназа (КФ 3.1.1.31), 38 - 6-Фосфоглюконатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.44), 39 - рибулозо-фосфат 3-епімераза (КФ 5.1.3.1), 40 – Транскетолаза (КФ 2.2.1.1), 41 – Трансальдолаза (КФ 2.2.1.2), 42 - Рибозо-5-фосфат-ізомераза А (КФ 5.3.1.6), 43 - Рибозо-фосфат-пірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1), 44 – Аланінтрансаміназа (КФ 2.6.1.2), 45 – Ацетолактатсинтаза (КФ 2.2.1.6), 46 - Кетокислотнаредуктоізомераза (КФ 1.1.1.86), 47 - Дигідроксикислотнадегідратаза (КФ 4.2.1.9), 48 - Трансаміназа В (КФ 2.6.1.42), 49 - 2-Ізопропілмалатсинтаза (КФ 2.3.3.13), 50 - 3-Ізопропілмалатдегідратаза (КФ 4.2.1.33), 51 - 3-Ізопропілмалатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.85), 52 – D-3-

фосфогліцератдегідрогеназа (КФ 1.1.1.95), 53 - Фосфосеринаміотрансфераза (КФ 2.6.1.52), 54 - Фосфосеринфосфатаза (КФ 3.1.3.3), 55 - Гліцингідроксиметилтрансфераза (КФ 2.1.2.1), 56 - Цистатіонін-бета-синтаза (КФ 4.2.1.22), 57 - Цистатіонін-гамма-ліаза (КФ 4.4.1.1), 58 - Карбамоїлфосфатсинтетаза (КФ 6.3.4.16), 59 - Аспартаткарбамоїлтрансфераза (КФ 2.1.3.2), 60 - Дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3), 61 - Дигідрооротатдегідрогенази (КФ 1.3.5.2), 62 - Оротатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.10), 63 - Уридинмонофосфатсинтетаза (КФ 4.1.1.23), 64 - УМФ-ЦМФ кіназа (КФ 2.7.4.14), 65 - Нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6), 66 - ЦТФ-синтаза (КФ 6.3.4.2), 67 - Аденілаткіназа (КФ 2.7.4.3), 68 - Гуанілаткіназа (КФ 2.7.4.8)

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

5.1.1. Вибір умов і способу культивування

При виборі умов та способу культивування потрібно звернути особливу увагу на фізіолого-біохімічних особливості біологічного агента *Yarrowia lipolytica*. Він здатен рости в широкому діапазоні кислотності від рН 2,5 до рН 8 з оптимумом в районі 4,5-5 рН. Температурний діапазон для росту сягає від 0-30°C, але оптимальною температурою для неї є 14-25°C [47].

Дані умови культивування підходять для широкого спектру мікроорганізмів, тому під час процесу культивування існує великий ризик контамінації сторонньою мікрофлорою. Щоб унеможливити ризик забруднення сторонніми мікроорганізмами, весь ферментаційний процес повинен відбуватись у строго асептичних умовах. Ці умови забезпечуються стерилізацією поживного середовища та всього обладнання, яке використовується під час культивування [21, 48].

Існують два види культивування мікроорганізмів, а саме: глибинне та твердо-фазове. Твердо-фазове культивування – це культивування під час якого мікроорганізми вирощують на поверхні тонкого шару рідкого середовища чи твердого субстрату. Воно має суттєвий недолік: нездатність забезпечити асептичні умови, тому не підходить для культивування *Y. lipolytica* S6 [48].

Виходячи з цього, для процесу ферментації обрано глибинне культивування, яке не має такого недоліку. Глибинне культивування є більш економічним, потребує менше виробничої площі та легко піддається механізації та автоматизації [48].

По відношенню до кисню біологічний агент є облігатним аеробним організмом, який здатен отримувати енергію тільки диханням і через те потребує кисень, тому для культивування *Y. lipolytica* S6 необхідно забезпечити аеробні умови [47, 48].

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркуші
Розроб.		Сидоренко М.Р.					44	136
Перевір.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Для культивування *Y. lipolytica* S6 обрано періодичний спосіб культивування через декілька переваг: більш повноцінне споживання субстрату біологічним агентом і через те, що під час культивування не буде відбуватись вимивання поживного середовища, як під час безперервного культивування [48].

Зважаючи на морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки

Y. lipolytica S6 культивування біологічного агента буде здійснюватись з дотриманням асептичних умов, глибинним способом, періодично в аеробних умовах.

5.1.2. Вибір типу ферментера

Умови культивування біологічного агента напряму впливають на устаткування та будову ферментера. Після вибору умов і способу культивування необхідно обрати оснащення для ферментера, яке здатне забезпечити потрібні умови культивування.

Щоб забезпечити аеробні умови культивування ферментер повинен мати систему аерації та перемішуючий пристрій, який також покращить гомогенізацію культуральної рідини. *Y. lipolytica* S6 є диморфними дріжджами, вони здатні здійснювати перехід між дріжджевою та міцеліальною формами, коли ріст відбувається при низькій концентрації розчиненого кисню переважають псевдоміцеальні та міцеліальні форми, а при високій концентрації розчиненого кисню – дріжджова форма, тому в якості перемішуючого пристрою обрано турбінну мішалку, яка забезпечує ефективне диспергування повітря в апараті, а для аерації використовують барботер, який подає стерильне повітря під тиском для забезпечення додаткової стерильності.[27, 48].

У складі поживного середовища містяться бактеріальний пептон та дріжджовий екстракт, які складаються з білків, які в свою чергу мають здатність посилювати піноутворення, також на підвищення піноутворення впливає подавання повітря під високим тиском. Щоб пригнічити процес піноутворення буде використане механічне піногасіння, через те що постійна закупівля хімічних піногасників та їх стерилізація призведе до додаткових економічних витрат при

виробництві. Для цього у верхній частині ферментера установлюють додаткову мішалку, яка за сигналом датчика буде розбивати піну [5].

Ферментер, який призначений для аеробного культивування *Y. lipolytica* S6, має досить великий об'єм 10 м³, тому він повинен бути оснащений системою відводу тепла з апарату, через те що процес аеробного культивування спряжений з виділенням великої кількості тепла. З метою підтримання сталої температури під час культивування, ферментер повинен бути обладнаний сорочкою [48].

В обов'язковому порядку ферментер повинен бути оснащений датчиком рН, датчиком температури та датчиком піноутворення для контролю культуральної рідини. Крім того, у нього мають бути порти для стерильного відбору проб, для подальшого мікробіологічного контролю [48].

5.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Оскільки по відношенню до кисню біологічний агент *Yarrowia lipolytica* S6 є облигатним аеробом, то процес культивування у ферментері має проходити з безперервною подачею стерильного аераційного повітря через барботер [5].

Роботу з підготовки посівного матеріалу та інокуляту здійснюють в мікробіологічному боксі, який розміщується в лабораторії, тому для забезпечення асептичних умов проводять знезараження повітря. Для цього використовують опромінення ультрафіолетовими променями за допомогою УФ-ламп. [48].

Підготовка стерильного аераційного повітря здійснюється у декілька стадій [48]:

1) **Забір атмосферного повітря:** спершу турбокомпресор забирає повітря через забірну шахту, яка розміщується від найвищої точки будівлі на висоті 2-3 метри.

2) **Очищення від грубих домішок:** далі повітря пропускається через пласкі волокнисті фільтри грубого очищення, де воно очищується від грубого аерозолу та зменшується кількості контамінантів.

3) **Стиснення повітря:** після очищення від грубих домішок повітря направляється до турбокомпресора, де воно стискається до 0,35 – 0,5 МПа при цьому відбувається його нагрівання до температури 120 - 200 °С і збільшення на одиницю об'єму повітря вмісту вологи.

4) **Охолодження повітря та видалення вологи:** за допомогою теплообмінного апарату отримане стиснене повітря охолоджується до конденсації вологи і направляється у ресивер для її видалення.

5) **Стабілізація термодинамічних показників повітря:** далі проводять нагрівання повітря під дією пари до температури 45 - 50 °С у теплообміннику для надійної роботи фільтрів.

6) **Очищення повітря в головну фільтрі:** стабілізоване повітря направляють на головний фільтра очищення, де воно очищується до ступеня очищення $E=95\%$ для подальшого використання в усіх ферментерах цеху.

7) **Очищення повітря в індивідуальному фільтрі:** очищене повітря від головного фільтру подають до індивідуальних фільтрів, які встановлені безпосередньо на кожному ферментері, де повітря очищується до ступеня очищення $E=99,99\%$.

5.3. Обґрунтування стадії санітарної підготовки виробництва

Санітарна підготовка виробництва – це невід'ємна частина будь-якого виробничого процесу. Вона є одним з головних критеріїв забезпечення гарантії якості та безпечності виготовленої продукції [50].

Вона складається з наступних частин:

1) *Підготовка персоналу.* Ввесь персонал, який працює на підприємстві зобов'язаний пройти медогляд, прослухати інструктажі, а також пройти навчання згідно з своїми посадовими обов'язків та скласти екзамен, щоб отримати доступ до самостійної роботи.

2) *Підготовка одягу.* На цьому етапі персонал проводить прання та прасування технологічного одягу, у випадку використання багаторазового одягу, або бере та розкладає у відповідні місця одноразовий одяг зі складу.

3) *Підготовка миючих та дезінфікувальних засобів.* Ця стадія передбачає приготування розчинів миючих та дезінфікувальних засобів відповідно до інструкції з використання, а також спеціальної тари для зберігання, перенесення та використання приготованих розчинів.

4) *Підготовка приміщень.* На цій стадії персонал проводить щозмінні та генеральні прибирання, яке включає в себе очищення та дезобробку приміщень.

5) *Підготовка обладнання та комунікацій.* Ця стадія передбачає очищення, миття, дезобробку, ополіскування, перевірку герметичності, а в деяких випадках стерилізацію, заміну фільтрів та підігрів або охолодження обладнання.

Всі ці заходи спрямовані спрямованні на зменшення контамінації під час виробничого процесу, забезпечення безпечних умов праці, а також – якості виготовленої продукції [50].

5.4. Підбір миючих та дезінфікувальних засобів

Необхідно відповідально ставитись до підбору миючих та дезінфікувальних засобів через їх прямий вплив на забезпечення якості та безпечності майбутнього продукту. На ринку України широкий асортимент засобів, але вибору підлягають тільки дієві засоби, які мають сертифікацію та зареєстровані в державному реєстрі дезінфікувальних засобів. Також вони повинні ефективно справлятися з механічним та мікробіологічним забрудненням, бути безпечними для людини, бути екологічними, тобто легко утилізуватись, та дешевими [51].

5.4.1. Розрахунок приблизного плану приміщення

Для вибору мийних та дезінфікуючих засобів спершу необхідно визначити площі всіх ділянок приміщення, які піддаються миттю та дезінфекції. Для цього необхідно провести розрахунки розмірів приміщення, яке буде застосовуватись для

виробництва і на основі них навести план приміщення для виробництва кормової біомаси з зазначенням розміщення основного обладнання.

Виробництво кормової біомаси *Yarrowia lipolytica* передбачає застосування наступного обладнання: інокулятор об'ємом 12 л, реактори-змішувачі для приготування композицій об'ємом 30 л, інокулятор об'ємом 100 л, реактори-змішувачі для приготування композицій поживного середовища об'ємом 300 л, збірник для сирого гліцерину, посівний апарат об'ємом 1 м³, реактор-змішувач для приготування компонентів поживного середовища об'ємом 5 м³, установка безперервної стерилізації, збірник для сирого гліцерину об'ємом 200 л, реактори-змішувачі для приготування стерильного розчину HCl та NaOH, ферментер об'ємом 10 м³.

Таку велику кількість обладнання недоцільно розміщувати в одному залі, тому пропонується розбити виробниче приміщення на цех виробничого біосинтезу, цех підготовки посівного матеріалу, а також на лабораторію. У таблиці 5.1 наведений перелік основного обладнання із зазначенням їх габаритних розмірів.

Перелік основного обладнання, яке розміщується у виробничому приміщенні

Назва обладнання	Кількість обладнання, шт	Габаритні розміри, м
<i>Цех підготовки посівного матеріалу</i>		
Інокулятор об'ємом 12 л	1	0,48x0,48x1,5
Реактори-змішувачі об'ємом 30 л	2	0,53x0,53x1,9
Інокулятор об'ємом 100 л	1	1,3x0,7x1,6
Реактори-змішувачі об'ємом 300 л	2	0,965x1,2x 2,1
Збірник для сирого гліцерину об'ємом 20 л	1	0,5x0,5x1,9
Посівний апарат об'ємом 1 м ³	1	0,89×0,89×1,6
<i>Цех виробничого біосинтезу</i>		
Реактор-змішувач об'ємом 5 м ³	1	1,6x1,6x2,5
Установка безперервної стерилізації	1	2,5x1,5x2
Збірник для сирого гліцерину об'ємом 200 л	1	0,86x0,81x2,1
Реактори-змішувачі для приготування стерильного розчину HCl та NaOH	2	0,48x0,48x1,5
Ферментер об'ємом 10 м ³	1	1,8×1,8×5,3
<i>Лабораторія</i>		
Мікробіологічний бокс	1	2x2
Лабораторне обладнання	-	-

При розташуванні обладнання слід керуватись наступними умовами: відстань між апаратами не менше 1 м і відстань від стін та стелі не менше 1,5 м. Це необхідно для зручної експлуатації обладнання, а також для миття стін.

На рис 5.1 наведений приблизний план приміщення виробництва кормових дріжджів.

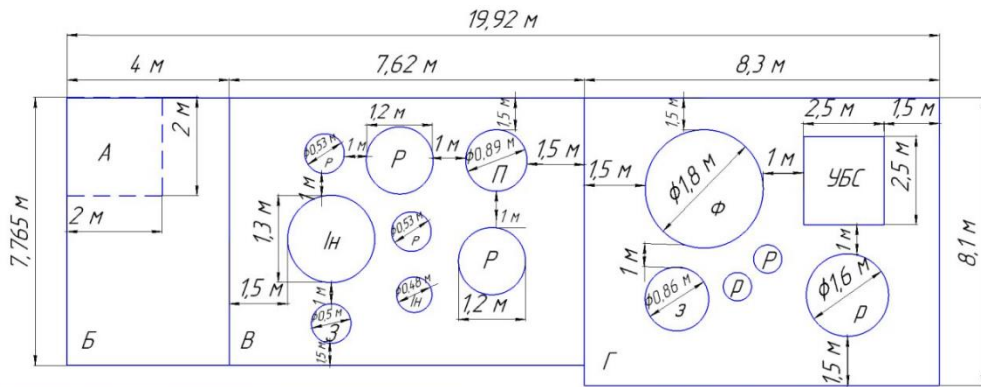


Рис 5.1. Приблизний план приміщень необхідних для виробництва кормових дріжджів.

У таблиці 5.2 наведений перелік площ, які підлягають миттю, згідно з рис 2.1.

Таблиця 5.2

Перелік площ, які підлягають миттю

Назва ділянки	Площа, м ²
<i>Цех підготовки посівного матеріалу</i>	
Стіни	77,1
Підлога	59,44
<i>Цех виробничого біосинтезу</i>	
Стіни	82
Підлога	67,23
<i>Лабораторія</i>	
Стіни	59
Підлога	27,2
Мікробіологічний бокс	24

Взагалі підлогу необхідно мити кожного дня, а обладнання — перед кожним виробничим циклом, але так як тривалість підготовчих робіт та сам виробничий

біосинтез складає 24 години, то ці два процеси можна об'єднати і віднести до щоденного прибирання. Тобто за рік необхідно провести 330 щоденних прибирань.

Під час цих прибирань в загальному буде помито 52107 м² підлоги та використано 1402,7 м³ розчинів для миття обладнання з використанням СІР-мийки.

Крім щоденного прибирання раз на місяць необхідно проводити генеральне прибирання під час якого митимуться стіни. Тоді виходить, що за рік буде 11 генеральних прибирань.

Під час цих прибирань в загальному буде помито 2619,1 м² стін.

5.4.2 Обґрунтування вибору миючих та дезінфікувальних засобів

Далі з Державний реєстру дезінфекційних засобів необхідно обрати миючі та дезінфікувальні засоби. Для ефективного використання необхідно обирати засоби з різними видами діючих речовин, щоб унеможливити вироблення стійкості мікроорганізмів до них. Крім того, запропоновано обирати миючі засоби з дезінфікувальним ефектом або дезінфікувальні засоби з миючим ефектом для економії витрат на миття і зменшення часу на прибирання [51].

Для проведення санітарної підготовки виробництва пропонується застосовувати наступні засоби:

Засіб дезінфікуючий «Гуасепт (Guasept)» – дозволено використовувати на підприємствах біотехнологічної та мікробіологічної промисловості. Не пошкоджує об'єкти, що виготовлені із корозійностійких і нестійких до корозії металів, термостабільних і термолабільних матеріалів, скла, гуми, каучуку, штучної шкіри тощо. Використовують для проведення одночасного миття та дезінфекції поверхонь в приміщені (стіни, підлога, підвіконня), поверхонь меблів та обладнання. Також відмінно видаляє плісняву та попереджає її повторне утворення. Засіб має миючі, дезодоруючі, змочувальні, емульгуючі властивості. Унікальність даного продукту полягає в тому, що на поверхнях, оброблених цим засобом, може зберігатись антимікробна активність на тривалий термін від декількох днів до 8 місяців [52, 53].

Засіб дезінфікуючий з мийною дією «Cif SafeGuard Professional» – дозволено використовувати на підприємствах фармацевтичної та біотехнологічної промисловості. Це висококонцентрований миючий дезінфікуючий засіб для одноетапного очищення та дезінфекції всіх твердих поверхонь та обладнання. Цей засіб виявляє бактерицидні, вірулицидні, фунгіцидні і спороцидні властивості. Засіб не пошкоджує поверхні із нержавіючої сталі, сталі, заліза, алюмінію, латуні, міді, склоемалі, штучних матеріалів, гуми при дотриманні умов застосування [52, 54].

Засіб дезінфікуючий з мийною властивістю «Неомоскан РД-Н» – дозволено використовувати на підприємствах фармацевтичної та біотехнологічної промисловості. Цей засіб при своїй дешевизні має високу активність до всіх патогенних мікроорганізмів. Засіб не пошкоджує поверхні із нержавіючої сталі, сталі, заліза, алюмінію, латуні, міді, склоемалі, штучних матеріалів, гуми при дотриманні умов застосування через наявність антикорозійних компонентів у складі [52, 55].

Засіб мийний з дезінфікуючим ефектом «КлінДез 401 (Clean&Dez 401)» – дозволено використовувати на підприємствах фармацевтичної та мікробіологічної промисловості. Має широкий сект антимікробної дії. Цей засіб має антикорозійні, стабілізуючі, змочувальні, емульгуючі та мийні властивості. Не ушкоджує об'єкти, виготовлені з корозійностійких металів, склоемалі, матеріалів, покритих нікелем і латунню, скла, силікону, пластмас, гуми на основі силіконового та натурального каучуку, полімерних матеріалів. Засіб не горить і є вибухобезпечним [52, 56].

Засіб дезінфікуючий з мийними властивостями «Біонол» – дозволено використовувати на підприємствах мікробіологічної промисловості. Цей засіб виявляє бактерицидні, вірулицидні, фунгіцидні і спороцидні властивості. Робочі розчини засобу не пошкоджують об'єкти, які виготовлені із металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу, не фіксують білкові забруднення на поверхні виробів медичного призначення. Допускається зберігати

невикористаний робочий розчин протягом 14 діб при дотриманні умов зберігання в тарі з щільно закритою кришкою. [52, 57].

Для миття обладнання варто використовувати дуже популярний засіб у біотехнології 1% розчин каустичної соди. Це безбарвна кристалічна речовина, яка чудово розчиняється у воді. Водний розчин проявляє лужні властивості. Гарячий розчин каустичної соди добре обмилює жири, гідролізує білки та розщеплює вуглеводи [58].

Окрім засобів для миття та дезінфекції поверхонь та обладнання для нормального функціонування підприємства необхідно мати засоби для обробки рук персоналу. Тому було запропоновано наступні дуже відомі засоби на ринку, які зареєстровані в державному реєстрі дезінфекційних засобів:

Засіб дезінфекційний «Скінман Софт Протект ФФ (Skinman Soft Protect FF)» – призначенням для дезінфекції шкіри рук на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної промисловості. Інноваційний та високоактивний антисептик створений для частої та дуже частої обробки рук з ефективним комплексом для догляду за шкірою рук. Формула засобу не спричиняє налипання на руках після аплікації. Цей засіб має бактерицидну, фунгіцидну, протівірусну та туберкулоцидну, мікобактерицидну дії [52, 59].

Засіб дезінфекційний «АХД 2000 ультра» – дозволено використовувати на підприємствах біотехнологічної та мікробіологічної промисловості. Дезінфікуючий засіб для гігієнічної обробки рук і шкіри, а також для швидкої дезінфекції невеликих поверхонь. Спирт має віруліцидну, бактерицидну, туберкулоцидну, фунгіцидну активність. Засіб має пролонговану дію протягом 3-х годин. Також перевагою цього засобу є те, що він має у своєму складі комплекс догляду за шкірою: захищає шкіру рук від сухості і подразнень та зберігає еластичність і природний водно-жировий баланс шкіри [52, 60].

Таблиця 5.3

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва кормових дріжджів

Назва мийного/ дезінфікуючого засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л мийного або дез. засобу, Грн/л	Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, Грн/л	Норма витрати мийного або дез.засобу, л/м ²	Загальна вартість обробки поверхонь Е _{дз} , Грн
Засіб дезінфікуючий з мийними властивостями "Гуасепт (Guasept)" (ПГМГ)	Поверхні приміщень та обладнання	0,3 (при експозиції 60 хв) 0,6 (при експозиції 30 хв) 1,2 (при експозиції 5 хв)	483	2,90	0,05	7935,3
Засіб дезінфікуючий з мийною дією Cif SafeGuard Professional (ЧАС)	Поверхні приміщень	1 (при експозиції 5 хв) 4 (при експозиції 1 хв)	147	1,47	0,05	4022,4
Засіб дезінфікуючий з мийною властивістю – «Неомоскан РД-Н» (Галогени)	Поверхні приміщень та обладнання	0,5 (при експозиції 15 хв)	45,83	0,27	0,1	1477,6
Засіб мийний з дезінфікуючим ефектом «КлінДез 401» (Галогени)	Поверхні приміщень та обладнання	0,015 (при експозиції 30 хв) 0,1 (при експозиції 15 хв)	100	0,15	0,15	1231,33
Засіб дезінфікуючий з мийними властивостями «Біонол» (ПАР)	Поверхні приміщень та обладнання	0,15 (при експозиції 60 хв)	183	0,27	0,1	1477,6

Спираючись на дані з табл. 5.3 для проведення миття та дезінфекції виробничих приміщень обираємо засіб дезінфікуючий з мийною дією

«Cif SafeGuard Professional», засіб мийний з дезінфікуючим ефектом «КлінДез 401», засіб дезінфікуючий з мийними властивостями «Біонол» через їх склад та мінімальну вартість обробки. Хоча засіб дезінфікуючий з мийною властивістю – «Неомоскан РД-Н» має меншу вартість, але має схожий склад з засобом «КлінДез 401», тому для попередження розвитку стійкості у мікроорганізмів обираємо 3 засоби з різним складом.

Для миття обладнання використовуємо каустичну соду через її низьку ціну та ефективність. Так як все ємнісне обладнання, яке використовується для виробництва, проходить термічну стерилізацію, то воно не потребує проведення дезінфекції не потребує.

5.5. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Відповідно до раніше проведених розрахунків в розділі 1 виробничий біосинтез біомаси здійснюється у ферментері об'ємом 10 м³, що містить 4,5 м³ поживного середовища. Отримання інокуляту включаю чотири послідовних етапи: 1 – у колбах на качалках, 2 – в інокуляторі об'ємом 12 л, 3 – в інокуляторі 100 л, 4 – у посівному апараті об'ємом 1 м³.

Максимальна концентрація біомаси 21,3 г/л за 16 год культивування досягається за умов росту штаму *Yarrowia lipolytica* S6 на середовищі такого складу (г/л):

- Сирий гліцерин – 45,92
- Дріжджовий екстракт – 1
- Бактеріологічний пептон – 0,75
- KH_2PO_4 – 2,75
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 10
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,5

Всі компоненти поживного середовища, окрім сирого гліцерину підлягають стерилізації. Сирий гліцерин є специфічним субстратом для росту мікроорганізмів, невелика кількість мікроорганізмів має розвинений ферментний комплекс для його розкладання. Крім того, до складу сирого гліцерину входять етанол, метанол, жирні кислоти, хлорид натрію, які здатні пригнічувати ріст мікроорганізмів [61].

У табл. 5.4 наведено кількість та спосіб внесення сирого гліцерину та титрувальних агентів необхідну для приготування поживного середовища на кожному зі стадій виробництва.

Таблиця 5.4

Розрахунок вмісту та особливості внесення деяких речовин

Об'єм середовища, л	Сирий гліцерин			НСІ (6%)		NaOH (6%)	
	Вміст, кг	Об'єм, л	Спосіб внесення	Об'єм, мл	Спосіб внесення	Об'єм, мл	Спосіб внесення
4500	206,64	165,8	Реактор на 200 л	4500	Реактор на 5 л	4500	Реактор на 5 л
534,5	24,54	19,7	Реактор на 20 л	534,5 1069	Колба на 750 мл Колба на 1,5 л	534,5	Колба на 1,5 л
57,27	2,63	2,1	Колба на 3 л	57,3 114,6	Колба на 100 мл Колба на 150 мл	57	Колба на 150 мл
6,13	0,281	0,23	Колба на 500 мл	6	Колба на 100 мл	6	Колба на 100 мл
0,55	0,0253	0,02	–	–	–	–	–

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

Для отримання 0,61 л посівного матеріалу необхідно у 5 колбах об'ємом 0,75 л приготувати 0,55 л стерилізованого поживного середовища. Стерилізація поживного середовища на даній стадії відбувається в автоклаві. Зробивши аналіз поживного середовища для вирощування *Yarrowia lipolytica* S6 умовно розділяємо його на такі композиції в залежності від умов стерилізації компонентів:

Композиція А: Дріжджовий екстракт, бактеріологічний пептон (режим стерилізації: 112°C, 40 хв).

Композиція Б: K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Компоненти композиції Б і В стерилізуються при стандартній температурі для стерилізації солей. Компоненти композиції А є термолабільними, тому стерилізуються при нижчій температурі, ніж солі. Композицію Б стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію. Сирий гліцерин не стерилізують, тому вносять безпосередньо у колбу.

Таблиця 5.5

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,55 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Сирий гліцерин	45,92	20 мл	–	20
Дріжджовий екстракт	1	0,55 г	А	130
Бактеріологічний пептон	0,75	0,41 г		
Вода	130 мл			
K_2HPO_4	2,75	1,51 г	Б	150
Вода	150 мл			
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	5,5 г	В	250
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5	0,3 г		
Вода	250 мл			

5.5.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 12 л

Для отримання 5,73 л посівного матеріалу необхідно приготувати 6,13 л стерилізованого поживного середовища. Стерилізація поживного середовища на даній стадії відбувається в автоклаві. Зробивши аналіз поживного середовища для вирощування *Yarrowia lipolytica* S6 умовно розділяємо його на такі композиції в залежності від умов стерилізації компонентів:

Композиція А: Дріжджовий екстракт, бактеріологічний пептон (режим стерилізації: 112°C, 40 хв).

Композиція Б: K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Компоненти композиції Б і В стерилізуються при стандартній температурі для стерилізації солей. Компоненти композиції А є термолабільними, тому стерилізуються при нижчій температурі, ніж солі. Композицію Б стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію. Сирий гліцерин не стерилізують, тому вносять безпосередньо у інокулятор.

Таблиця 5.6

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 12 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6,13 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Сирий гліцерин	45,92	230 мл	–	230
Дріжджовий екстракт	1	6,13 г	А	1964
Бактеріологічний пептон	0,75	4,6 г		
Вода	1953 мл			
K_2HPO_4	2,75	16,86 г	Б	1968
Вода	1951 мл			
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	61,3 г	В	1968
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5	3,1 г		
Вода	1904 мл			

5.5.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

Для отримання 53,5 л посівного матеріалу необхідно приготувати та 57,27 л стерилізованого поживного середовища. Стерилізація поживного середовища на даній стадії буде відбуватись безпосередньо в інокуляторах, тому склад композицій поживного середовища потребує перескладання. Зробивши аналіз поживного середовища для вирощування *Yarrowia lipolytica* S6 умовно розділяємо його на такі композиції в залежності від умов стерилізації компонентів:

Композиція А: Дріжджовий екстракт, бактеріологічний пептон (режим стерилізації: 112°C, 40 хв).

Композиція Б: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131 °C, рН 3.5, 40 хв).

Стерилізація композиції А буде здійснюватись у реакторі-змішувачі, звідки стерилізована композиція буде подаватись до інокулятора.

З метою спрощення технологічного процесу і зменшення витрат на даному етапі основні та фосфорні солі об'єднують одну композицію. Стерилізація композиції Б буде відбуватися в інокуляторі, оскільки умови її стерилізації є жорсткішими, ніж композиції А.

Спершу всі солі з композиції Б розчиняють в окремому реакторі, з якого потім вони будуть направлені в інокулятор, де проводиться стерилізація. Перед стерилізацією рН композиції Б доводять нестерилізованим 6%-вим розчином НСІ до значенні 3.5. Перед додаванням посівного матеріалу з реактора додають сирий гліцерин, .

Таблиця 5.7

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

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 57,27 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сирий гліцерин	45,92	2,1 л	–	2,1 л
Дріжджовий екстракт	1	57,3 г	А	27,58 л
Бактеріологічний пептон	0,75	43 г		
Вода	24,7 л			
Конденсат	2,76 л			
KH_2PO_4	2,75	157,5 г	Б	27,59 л
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	572,7 г		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5	28,6 г		
Вода	24,1 л			
Конденсат	2,76 л			

5.5.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м³

Для отримання 0,5 м³ посівного матеріалу необхідно приготувати 534,5 л стерилізованого поживного середовища. Стерилізація поживного середовища на даній стадії буде відбуватись безпосередньо в посівному апараті. Зробивши аналіз поживного середовища для вирощування *Yarrowia lipolytica* S6 умовно розділяємо його на такі композиції в залежності від умов стерилізації компонентів:

Композиція А: Дріжджовий екстракт, бактеріологічний пептон (режим стерилізації: 112°C, 40 хв).

Композиція Б: (NH₄)₂SO₄, MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄ (режим стерилізації: 131 °C, рН 3.5, 40 хв).

Стерилізація композиції А буде здійснюватись у реакторі-змішувачі, звідки стерилізована композиція буде подаватись до інокулятора.

З метою спрощення технологічного процесу і зменшення витрат на даному етапі основні та фосфорні солі об'єднують в одну композицію. Стерилізація композиції Б буде відбуватися в посівному апараті, оскільки умови її стерилізації є жорсткішими, ніж композиції А.

Спершу всі солі з композиції Б розчиняють в окремому реакторі, з якого потім вони будуть направлені в посівний апарат, де проводиться стерилізація. Перед стерилізацією рН композиції Б доводять нестерилізованим 6%-вим розчином HCl до значенні 3.5. Перед додаванням посівного матеріалу з реактора додають сирий гліцери.

Таблиця 5.8

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 1 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 534,5 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сирий гліцерин	45,92	19,7	–	19,7 л
Дріжджовий екстракт	1	534,5 г	А	257,4 л
Бактеріологічний пептон	0,75	400,9 г		
Вода	230,7 л			
Конденсат	25,74 л			
КН ₂ РО ₄	2,75	1469,9 г	Б	257,4 л
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	5345 г		
MgSO ₄ •7 H ₂ O	0,5	267,3 г		
Вода	221,6 л			
Конденсат	25,74 л			

5.5.5. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Для стадії виробничого біосинтезу необхідно приготувати 4,5 м³ стерилізованого поживного середовища. Таку кількість поживного середовища доцільно стерилізувати в установці безперервної стерилізації, щоб зменшити витрати води, пари та скоротити час обробки даного об'єму поживного середовища. Зважаючи на об'єм поживного середовища, який необхідно приготувати обираємо УБС-5 із продуктивністю 5 м³/год. Температура стерилізації – 131 °С.

Розчин усіх компонентів поживного середовища, які піддаються стерилізації, готується в одному реакторі-змішувачі. Сирий гліцерин додається до інших компонентів поживного середовища з реактора після стерилізації всіх інших компонентів.

Склад композицій для стерилізації поживного середовища в УБС

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 4,5 м ³ середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сирий гліцерин	45,92	165,8 л	–	165,8 л
Дріжджовий екстракт	1	4,5 кг	А	4 334,2 л
Бактеріологічний пептон	0,75	3,38 кг		
КН ₂ РО ₄	2,75	12,38 кг		
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	45 кг		
MgSO ₄ •7 H ₂ O	0,5	2,25 кг		
Вода	3833,3 л			
Конденсат	433,42 л			

5.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Регуляція рівня рН середовища є важливим аспектом культивування. Для цього на технологічній схемі необхідно передбачити приготування розчинів титрувальних агентів. Вони будуть застосовуватись у 2 випадках:

1) Перед стерилізацією компонентів поживного середовища

З метою спрощення технологічного процесу і зменшення витрат при приготуванні та стерилізації поживного середовища основні та фосфорні солі об'єднують в одну композицію, щоб запобігти випаданню в осад фосфорних солей. Перед стерилізацією рН композиції доводять нестерилізованим 6%-вим розчином НСІ до значенні 3.5 [48].

2) Регуляція рівня рН під час культивування

Під час процесу культивування мікроорганізмів можливі зміни рН середовища за рахунок їх процесів життєдіяльності [48].

В якості титрувальних агентів буде використано 6 % розчин НСІ для підкислення середовища та 6 % розчин NaOH для підлуження середовища. У табл. 5.10 наведено особливості приготування титрувальних агентів.

Особливості приготування титрувальних агентів

Стадія виробництва	Необхідна кількість 6 % HCl, мл	Кількість 36% HCl для приготування, мл	Кількість води для приготування агента, мл	Необхідна кількість 6% NaOH, мл	Кількість (г) NaOH для приготування 6% р-ну NaOH, мл	Кількість води для приготування агента, мл
Інокулятор 12 л	6	1	5	6	0,36	5,64
Інокулятор 100 л	114,6	19,1	95,5	57	3,42	53,58
	57,3	9,6	47,8			
Посівний апарат 1 м ³	1069	178,2	890,8	535	32,1	502,9
	535	89,2	445,8			
Ферментер 10 м ³	4500	750	3750	4500	270	4230
Всього	6281,9	1047,1	5234,9	5098	305,9	4792,1

Для пригнічення процесу піноутворення використовуватиметься додаткова мішалка, яка розміщуватиметься у верхній частині ферментера. Це рішення економічно доцільніше, ніж закупівля дороговартісних піногасників [48].

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає такі стадії допоміжних робіт:

- підготовка стерильного аераційного повітря;
- приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при його стерилізації в посівних апаратах об'ємом 100 л і 1 м³, а також для підтримки рівня рН під час культивування в усіх апаратах;
- приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для підтримання рівня рН під час культивування в інокуляторах об'ємом 12 л та 100 л, посівному апараті об'ємом 1 м³, ферментері об'ємом 10 м³;

Окрім основних реакторів для розчинення композицій солей, також необхідно передбачити такі реактори:

- У цеху підготовки посівного матеріалу:
 - для приготування 6% HCl (5 л) для стадії культивування в ферментері об'ємом 10 м³;
 - для приготування та стерилізації 6% NaOH (5 л) для стадії культивування в ферментері об'ємом 10 м³;
 - для приготування і стерилізації композиції А: 30 л; 300 л.
 - для змішування компонентів композиції Б: 30 л; 300 л.
 - для сирого гліцерину (20 л).
- У цеху виробничого біосинтезу:
 - реактор-змішувач об'ємом 5 м³ для змішування всіх компонентів перед стерилізацією в УБС;
 - реактор-змішувач для сирого гліцерину (200 л).

5.7. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Після стадії виробничого культивування отримуємо культуральну рідину, яка в своєму складі містить воду, залишки поживного середовища, біомасу дріжджів та позаклітинні продукти метаболізму [11].

Спершу необхідно провести інактивацію біологічного агента, для цього культуральну рідину у ферментері нагрівають до 80 °С та витримують протягом 10 хв. Далі охолоджують до кімнатної температури і направляють на наступні стадії виділення [11].

Як було обговорено раніше цільовий продукт має форму порошку і складається з висушеної біомаси *Yarrowia lipolitica*, тому при аналізі наукової літератури та бази патентів України було зроблено нахил саме на ці аспекти.

Для отримання цільового продукту запропоновано використати наступні методи [11, 61]:

Метод №1

- Флотація
- Сепарування
- Випарювання
- Сушіння
- Фасування та пакування

Метод № 2

- Відстоювання
- Сепарування
- Сушіння
- Фасування та пакування

Метод №3

- Сепарування
- Сушіння
- Фасування та пакування

При виборі одного з цих методів необхідно звертати увагу на час, за який відбувається виділення продукту, вартість обладнання, а також на кількість стадій. Чим більше цільовий продукт звільняється від вологи, тим більше втрат цільового продукту відбувається на пізніх етапах виділення [11].

Крім того, для конкурування на ринку кормових дріжджів необхідно зменшити економічні витрати на стадію виділення цільового продукту. Тому доцільно обирати метод, де застосовується найменша кількість стадій та задіяно менше дороговартісного обладнання і час протікання всіх процесів вписується в рамки 12 годин [11].

З огляду на вищезазначені критерії обираємо метод №3

5.7.1. Сепарування

Спершу необхідно з культуральної рідини отримати високозгущену дріжджову суспензію для цього отриману культуральну рідину двічі сепарують на сепараторі.

Сепарування — це процес який протікає у полі дії відцентрових сил, під час якого відбувається розділення рідких неоднорідних систем на окремі фази. Це досить швидкий та ефективний метод отримання дріжджової суспензії з культуральної рідини [11].

Хоч обладнання для цього процесу дороге, але воно компактне. Його застосовують коли проходження процесу повинно відбуватись безперервно. Сепарування має і свої недоліки, а саме перегрівання через негативну дію відцентрових сил на клітину, але вони не матимуть впливу на якість цільового продукту [11].

Для цієї стадії можна використати сепаратор моделі HFC 15-10-177 від виробника «GEA Westfalia» [62].



Рис 5.2 Сепаратор GEA Westfalia HFC 15-10-177 [62]

Таблиця 5.11

Технічні характеристики сепаратора GEA Westfalia HFC 15-10-177

Назва характеристики	Значення
Максимальна швидкість обертання барабану	11 800 об/хв
Продуктивність	2000 л/год
Потужність двигуна	15 кВт
Об'єм барабану	2,5 л
Мінімальна температура продукту	5°C
Максимальна температура продукту	100°C

5.7.2. Сушіння

Сушіння — це процес звільнення вологого продукту від вологи. В залежності від способу підведення температури до напівпродукту сушіння поділяється на: контактне, конвективне, радіаційне. З попередньої стадії отримуємо згущену дріжджеву суспензію, тому не кожен вид сушіння буде підходити для нашого цільового продукту [11].

Під час контактного сушіння теплота підводиться до напівпродукту через зіткнення з гарячими поверхнями. Даний метод має ряд критичних недоліків. Через довгий контакт з напівпродуктом відбувається часткового розкладання білка і амінокислот в біомасі. Також верхні шари продукту можуть підгоріти і будуть непридатними до використання [11].

Під час радіаційного сушіння теплота підводиться до напівпродукту за рахунок інфрачервоного випромінювання. Цей метод має декілька недоліків: підгорання сировини, дифундування вологи у внутрішні шари напівпродукту та дороговартісне обладнання. [11]

Тому для процесу обираємо конвективне сушіння, яке ідеально підходить під задані умови і має багато переваг над іншими видами: воно забезпечує найшвидше сушіння, короткий контакт з сушильним агентом під час якого не відбувається перегрівання зовнішніх шарів напівпродукту [11].

Отриманий дріжджовий концентрат направляють до відцентрової розпилювальної сушарки, де з неї отримують сухі кормові дріжджі.

Для цієї стадії можна використати відцентрову розпилювальну сушарку LPG-2000 від виробника «GRIFFIN MACHINERY» [63].



Рис 5.3 Відцентрова розпилювальна сушарка LPG-2000 [63]

Технічні характеристики відцентрової розпилювальної сушарки LPG-2000

Назва характеристики	Значення
Температура на вході	140-350 °С
Макс. Потужність випаровування	2000 кг/год
Метод розпилення	механічна трансмісія
Діаметр розпилювального диска	240 мм
Джерело тепла	пара+електрика
Габаритні розміри	5.5×4×7 м

5.7.3. Фасування та пакування

Отриману висушену біомасу вручну фасують в поліпропіленові мішки по 5 кг з використанням фасувальних вагів. Використання саме цього пакувального матеріалу збереже продукт від контакту з навколишнім середовищем, не дасть гігроскопічному порошку набрати вологи та не буде пропускати прямі сонячні промені та містить достатньо місця для нанесення детальної інформації про продукт. Також цей пакувальний матеріал має дуже низьку вартість, яка не сильно вплине на кінцеву ціну продукту, на відміну від ненадійного паперового мішка чи пакета [64].

Використання скляної тари для зберігання кормових дріжджів недоцільно через його велику вартість, труднощі при транспортуванні, а також через відсутність захисту від прямих сонячних променів.



Рис 5.4 Приклад пакування для кормових дріжджів [34]

5.8. Складання узагальненої принципової схеми із позначенням обраних післяферментаційних етапів

На рис. 3.4 наведена принципова схема із позначення обраних післяферментаційних етапів та зазначенням втрат цільовго продукту.

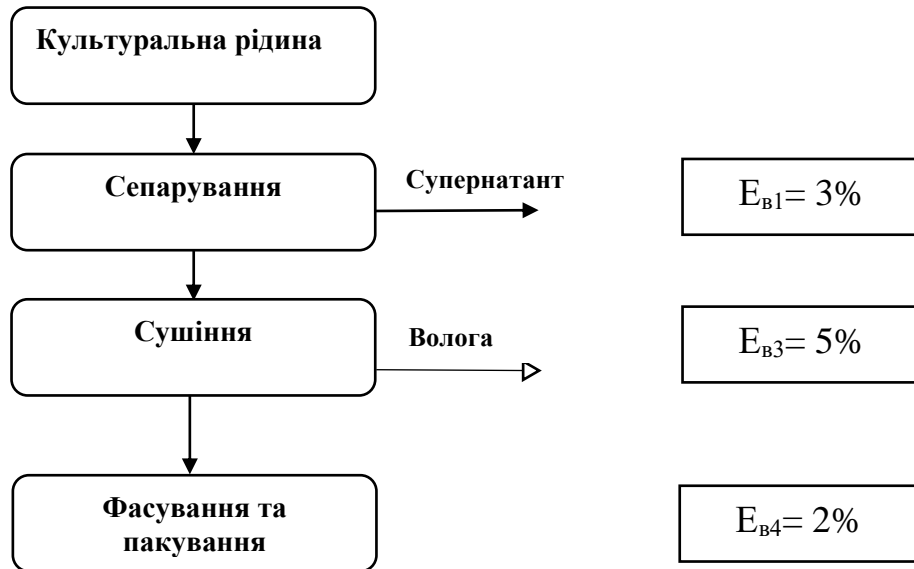


Рис. 5.5. Принципова схема обраних післяферментаційних етапів отримання кормової біомаси

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведена в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу кормової біомаси

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник ZL-400 ZS, виробник — «ССК ТМ» (Україна), виготовлений із оцинкованої сталі, максимальна швидкість повітря 2600 м ³ /год [1]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр грубої очистки повітря, виробник «NEW FILTER» (Україна), фільтруючий матеріал акрилове волокно, продуктивність фільтрування 432 м ³ /год, Мінімальна робоча температура – 1,5 °С Максимальна робоча температура – 65 °С Е = 90 %, габаритні розміри 187x88 мм [2]
К-3	Компресор	1	Турбокомпресор ID TURBOCOMPRESSOR серії TRA-ТМ, виробник «Dalgakiran» продуктивність 2470 – 6000 м ³ /год, робочий тиск: 2 – 11 бар, габаритні розміри 3700x2000x2000 мм [3]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач стисненого повітря рефрижераторного типу МТА 5MP2400, виробник «Компресормаш-Сервіс» (Україна), продуктивність 1440 м ³ /год, габаритні розміри 865x1317x1100, потужність 2,72 кВт [4]

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ					
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання					
Розроб.	Сидоренко М.Р.							Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Стабніков В.П.								71	136
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.	Стабніков В.П.									

Р-5	Ресивер	1	Ресивер «Повітряний лідер», виробник ЗЕО Лідер (Україна), об'єм 495 л, робочий тиск 10 бар, габаритні розміри 1819 x 616 мм [5]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Нагрівач повітря НКВ 1000x500-2 виробник «Vents» (Україна), робочий тиск 16 бар, габаритні розміри 1165x540x200 мм [6]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Алюмінієві фільтри F 0072, виробник «Омі» (Італія), фільтруючий матеріал поліетилен, продуктивність фільтрування 432 м ³ /год, E = 95 %, габаритні розміри 385x120x37 мм [7]
ІФ-8	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр стисненого повітря, виробник «NEW FILTER» (Україна), фільтруючий матеріал борсилікатне волокно, продуктивність фільтрування 6 л/хв, Мінімальна робоча температура – 1,5 °С Максимальна робоча температура – 65 °С E = 99,999 %, габаритні розміри 60x61 мм [8]
І-9	Інокулятор об'ємом 12 л	1	Біореактор об'ємом 12 л «S-I SERIES» виробник «Solarisbiotech» (Італія), матеріал корпусу: сталь AISI 316L; обладнаний турбінною мішалкою з швидкістю перемішування 200-400 об/хв, з рубашкою та пробовідбірником, датчиками температури, тиску, швидкості перемішування, рН, рО ₂ , піноутворення, DO, контролером, барботером з подачею повітря габаритні розміри 1160x730x2725 мм[9]

ІФ-10	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр REMEZA PF240 3050 PS, виробник «REMEZA» (Україна), фільтруючий матеріал борсилікатне волокно, продуктивність фільтрування 60 л/хв, Мінімальна робоча температура – 1,5 °С Максимальна робоча температура – 120 °С Е = 99,999 % , габаритні розміри 252 x 252 x 1029 мм [10]
Д-11 Д-14 Д-19 Д-22	Дозатор об'ємний для приготування композиції А Дозатор об'ємний для приготування композиції Б	4	Автоматичний дозатор води «SERV_W21» виробник «НВП SERVотехніка» (Україна), Відносна похибка дозування, % \pm 1,5% , мінімальна межа дозування – 0,1 л; максимальна межа дозування – 999,9 л; витрата води, 12 л/хв габаритні розміри 180x180x100 мм [11]
РЗ-12 РЗ-15	Реактор-змішувач для приготування композиції А Реактор-змішувач для приготування композиції Б	2	Реактор з нержавіючої сталі BSF-30L об'ємом 30 л, виробник «Nanbei» (Китай), матеріал: нержавіюча сталь SUS316L; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-460 об/хв; потужність двигуна мішалки: 0,2 кВт; габаритні розміри: 530x 530x1900 мм [12]
Н-13	Насос перестальтичний для перекачування композиції А в інокулятор об'ємом 100 л	1	Перистальтичний шланговий насос ASP25/15IX виробник «SEKO S.P.A.»(Україна), потужність: 0,75 кВт; продуктивність 6 л/хв, максимальний тиск 10 бар [13]
Н-16	Насос для перекачування композиції Б в інокулятор об'ємом 100 л	1	Насос відцентровий OEM Mini pump «Auroga Pro Scientific» (Китай), продуктивність 4-10 л/хв, максимальна робоча температура: температура рідини – 70 °С габаритні розміри: 90x 50x72 мм [14]

I-17	Інокулятор об'ємом 100 л	1	Ферментер РФ-100 об'ємом 100 л, виробник «Промвіт», матеріал корпусу: сталь AISI 316L; обладнаний турбінною мішалкою: 200-400 об/хв, з рубашкою, манометром, барботером, контролером рівня рідини датчиками вимірювання рН, рО ₂ , DO, температури, пробовідбірником, потужністю 0,56 кВт; габаритні розміри 1300x700x1600 мм [15]
ІФ-18	Індивідуальний фільтр	1	Алюмінієві фільтри F 0005, виробник «Опі» (Італія), фільтруючий матеріал поліетилен, продуктивність фільтрування 33 м ³ /год, E = 99,999 % Мінімальна робоча температура – 1,5 °С Максимальна робоча температура – 120 °С габаритні розміри 220x90x25 мм [7]
РЗ-20	Реактор-змішувач для приготування композиції А	2	Реактор з нержавіючої сталі SR300f об'ємом 300 л, виробник «Across International» (США), матеріал: нержавіюча сталь 316L SST; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-450 об/хв; потужність двигуна мішалки: 0,2 кВт; габаритні розміри: 965x 1194x 2057 мм [16]
РЗ-23	Реактор-змішувач для приготування композиції Б		
Н-21	Насос для перекачування композиції А до посівного апарата об'ємом 1 м ³	1	Перестальтичний насос JXHIN-32-C1 виробник «BTS Engineering» (Велика Британія) продуктивність 27,5 л/хв, робочий тиск 16 бар, потужність 1,5 кВт [17]
Н-24	Насос для перекачування композиції Б до посівного апарата об'ємом 1 м ³	1	Насос відцентровий AJm30C «Leo» (Китай), потужність: 0,3 кВт; продуктивність 40 л/хв, робочий тиск 6 бар габаритні розміри: 365x 185x208 мм [18]

З-25	Збірник для сирого гліцерину	1	Реактор з нержавіючої сталі BSF-20L об'ємом 20 л, виробник «Nanbei» (Китай), матеріал: нержавіюча сталь SUS316L; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-460 об/хв; потужність двигуна мішалки: 0,2 кВт; габаритні розміри: 500x 500x1850 мм [19]
Н-26	Насос для перекачування сирого гліцерину в посівний апарат об'ємом 1 м ³	1	Пневматичний насос SEKO серії DUOTEK «SEKO S.P.A.»(Україна), максимальне споживання повітря 60 л/хв; максимальна продуктивність 8 л/хв, максимальний робочий тиск 6 бар [20]
ПА-27	Посівний апарат об'ємом 1 м ³	1	Промисловий біореактор об'ємом 1 м ³ виробник «Sysbiotech», матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 316L, обладнаний датчиками температури, тиску, швидкості перемішування, рН, рО ₂ , піноутворення, DO, лопатевою мішалкою зі швидкістю перемішування 10 – 600 об/хв, з рубашкою, з пробовідбірником, з контролером, з барботером з автоматичною подачею повітря до 2 об/об/хв габаритні розміри 890x890x1600 мм [21]
ІФ-28	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр-регулятор з манометром, фільтруючий матеріал політетрафторетилен, продуктивність фільтрування до 13,2 м ³ /хв, E = 99,999 %, постачається в комплекті з ферментером об'ємом 10 м ³ виробник «Bioreactors» (Латвія)

Д-29	Дозатор ваговий для приготування поживного середовища	1	Ваговий дозатор ФС-75+ «ТехноМашСтрой» (Україна). Припустима похибка 1 % Мінімальна межа дозування – 0,15 кг, максимальна – 50 кг; напруга: 220 В; потужність: 1 кВт габаритні розміри 1160x730x2725 мм [22]
Д-30	Дозатор об'ємний для приготування поживного середовища	1	Дозатор води та рідин, виробник «АгроТех» (Україна), Відносна похибка дозування, % \pm 0,5% , мінімальна межа дозування – 10 мл; максимальна межа дозування – 9999 л; робочий тиск – від 0,5 атм до 10 атм. [23]
РЗ-31	Реактор-змішувач для змішування компонентів поживного середовища перед стерилізацією в УБС-28	1	Хімічний реактор з нержавіючої сталі FYG5000 об'ємом 5 м ³ , виробник «Nanbei» (Китай), матеріал: нержавіюча сталь SUS316L; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-85 об/хв; потужність двигуна мішалки: 7.5 кВт; габаритні розміри: 1600x 1600x2500 мм [24]
Н-32	Насос для перекачування композиції А до УБС-28	1	Насос відцентровий «Нmax 19,5м Qmax» «Лео»(Китай), потужність: 1,1 кВт; продуктивність 500 л/хв, максимальний робочий тиск до 6 бар [25]

УБС-33	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації LXM-5, виробник «Jiangsu SAIDELI Pharmaceutical Machine» (Китай) Матеріал: нержавіюча сталь; потужність– 5 м ³ /год; максимальна температура стерилізації – 135 °С; Вихідна температура матеріалу – 15 °С габаритні розміри: 2500x 1500x 2000 мм [26]
Н-34	Насос для перекачування композиції А від УБС-28 до ферментера	1	Перестальтичний насос AS300 «InVIA»(Іспанія), продуктивність 6000 - 30000 л/год, максимальний робочий тиск до 5 бар, швидкість обертання – 7-60 об/хв [27]
З-35	Збірник для сирого гліцерину	1	Реактор з нержавіючої сталі SR200 об'ємом 200 л, виробник «Across International» (США), матеріал: нержавіюча сталь 316L SST; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-450 об/хв; потужність двигуна мішалки: 0,2 кВт; габаритні розміри: 864x 813x 2032 мм [28]
Н-36	Насос для перекачування сирого гліцерину з З-30 до ферментера	1	Пневматичний мембранний насос виробник, «SEKO S.P.A.»(Україна), продуктивність 20 л/хв, максимальний робочий тиск 7 бар [29]
РЗ-37	Реактор-змішувач для приготування стерильного розчину HCl	1	Реактор з нержавіючої сталі BSF-5L об'ємом 5л, виробник «Nanbei» (Китай), матеріал: нержавіюча сталь SUS316L; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-460 об/хв; потужність двигуна мішалки: 0,12 кВт; габаритні розміри: 480x 480x150 мм [30]
РЗ-38	Реактор-змішувач для приготування стерильного розчину NaOH		

Ф-39	Ферментер об'ємом 10 м ³	1	Ферментер об'ємом 10 м ³ виробник «Bioreactors» (Латвія), матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 316L, обладнаний турбінною мішалкою з швидкістю обертання 320 об/хв, рубашкою, пробовідбірником, датчиками температури, тиску, швидкості перемішування, рН, рО ₂ , піноутворення, DO, контролером, барботером з подачею повітря в діапазоні від 0 – 2 об/об/хв, також містить хімічно інертний фільтрувальні картридж з політетрафторетиленовою мембраною для очищення повітря. габаритні розміри: 1800×1800×5300 мм [31]
Н-40	Насос для перекачування культуральної рідини у збірник	1	Перестальтичний насос AS300 «In VIA»(Іспанія), продуктивність 6000 - 30000 л/год, максимальний робочий тиск до 5 бар, швидкість обертання – 7-60 об/хв [32]

Примітка:

- 1 – <https://ccktm.prom.ua/ua/p550110095-kryshnyj-vozduhozabornik-kruglyj.html>;
- 2 – <https://newfilter.com.ua/ua/stysnene-povitria/filtri-stisnenogo-povitrya.html>
- 3 – <https://dalgakiran.ua/uk/products/centrobizhni-kompresory-ih-dalgakiran-seriyi-tra-tm/>;
- 4 – <https://kms-market.com.ua/ua/p34416604-osushiteli-szhatogo-vozduha.html>;
- 5 – <https://tusk.ua/ua/product/resiver-vozdushnyj-lider-10-bar-495-1-rv49560001-1-dlya-kompressora/>;
- 6 – [https://vencon.ua/ua/products/vents-nkv-1000x500-2](https://vencon.ua/ua/products/vents-nkv-1000x500-2;);
- 7 – <https://www.omi-italy.it/en-us/compressed-air-treatment/filters/aluminium-filters/f-0005-f-0440>;
- 8 – <https://newfilter.com.ua/ua/stysnene-povitria/filtri-stisnenogo-povitrya.html>;
- 9 – <https://www.solarisbiotech.com/en/fermenters-bioreactors-pilot-industrial-customizable>;
- 10 – <https://www.pnevnoteh.com.ua/filtr-remeza-pf240-3050-ps?category=1216>;
- 11 – http://servotehnika.in.ua/dozator_serv_w21.html;
- 12 – <https://www.nanbeinstrument.com/glass-reactor/stainless-steel-reactor/30l-double-layer-stainless-steel-reactor.html>;
- 13 – <https://dosingtech.com.ua/uk/product/peristaltichnij-nasos-seko-seriyi-psh-30-60-90-120-1-god-0-1-bar-sekobril/>;
- 14 – <https://www.auroraprosci.com/Centrifugal-Pump/OEM-Mini-DC-Brushless-Water-Pump-ASP4503-2>;
- 15 – <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rabochim-obemom-100-l/>;
- 16 – <https://www.nanbeinstrument.com/glass-reactor/stainless-steel-reactor/30l-double-layer-stainless-steel-reactor.html>;

- 17 – <https://petroline.ua/ru/bd-30-12-30/>;
- 18 – <https://aqueduct.com.ua/ua/nasos-centrobezhnyy-03kvt-hmax-30m-qmax-40lmin-ajm30s-leo-30-775351.html>;
- 19 – <https://www.nanbeinstrument.com/glass-reactor/stainless-steel-reactor/20l-double-layer-stainless-steel-reactor.html>;
- 20 – <https://dosingtech.com.ua/uk/product/pnevmatichnij-membrannij-nasos-seko-duotek-af000007pnttpt1-pp-nbr-ptfe-ptfe-8-l-hv/>;
- 21 – <https://en.sysbiotech.at/industrial-scale-bioreactor-500-1000l/>;
- 22 – <https://tmagro.com.ua/ua/p1345417342-vesovoj-doзатор.html>;
- 23 – https://agro-teh.com.ua/p370228267-doзатор-vody-zhidkostej.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQjwtrSLBhCLARIsACh6Rmg3hZ-cvrBWpA8goQ-8Oxmi2D6GbLGCLWzYTABpFEqO4zkhM4ft2A4aArhCEALw_wcB;
- 24 – <https://jsjinlingdry.en.made-in-china.com/product/RdTaoBIYZwkg/China-Chemical-Reactor-5000L-Stainless-Steel-Continuous-Stirred-Reaction-Tank.html>;
- 25 – <https://giga.in.ua/ua/nasosnoe-oborudovanie/poverhnostniy-nasos/775278.html>;
- 26 – <http://sdlcentrifuge.com/9-continuous-sterilization-system/192767/>;
- 27 – <https://www.tiendainvia.com/en/peristaltic-pumps/2051-bomba-peristaltica-mod-as-200-55.html>;
- 28 – <https://www.acrossinternational.com/ai-dual-jacketed-200l-316l-grade-stainless-steel-reactor.html>;
- 29 – <https://dosingtech.com.ua/uk/product/pnevmatichnij-membrannij-nasos-seko-duotek-af000018phtpt1-pp-hytre1-ptfe-ptfe-20-l-hv/>;
- 30 – <https://www.nanbeinstrument.com/glass-reactor/stainless-steel-reactor/5l-double-layer-stainless-steel-reactor.html>;
- 31 – <https://www.bioreactors.net/pilot-scale-bioreactor>;
- 32 – <https://www.tiendainvia.com/en/peristaltic-pumps/2051-bomba-peristaltica-mod-as-200-55.html>

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Технологічна схема отримання біомаси на основі *Yarrowia lipolytica* S6 наведена наведено у графічній частині курсового проекту. Вона включає наступні стадії:

- Допоміжні роботи
 - Санітарна підготовка виробництва
 - Підготовка та стерилізація аераційного повітря
 - Приготування розчинів титрувальних агентів
 - Приготування і стерилізація поживних середовищ
- Технологічний процес
 - Підготовка посівного матеріалу
 - Виробничий біосинтез
- Знешкодження відходів
 - Знешкодження атмосферних відходів
 - Знешкодження рідких відходів
 - Знешкодження твердих відходів

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка персоналу

Перед початком роботи персонал повинен пройти медогляд, ознайомитись з своїми посадовими обов'язками, прослухати вступний та первинний інструктажі, вивчити діючі інструкції підприємства. У випадку внесення змін до виробничої документації персонал зобов'язаний ознайомитись з ними у найкоротший час

Для підтвердження своїх знань скласти екзамен з охорони праці та технологічний екзамен. З метою нагадування, кожні три місяці персонал заново складає екзамен з охорони праці, а також раз на рік – правила пожежної безпеки.

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми біосинтезу цільового ПРОДУКТУ	Лім.	Арк.	Аркушіє
Розроб.		Сидоренко М.Р.					80	136
Перевір.		Стабніков В.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		

ДР 1.2 Підготовка одягу

Персонал повинен забезпечуватись декількома комплектами спеціального одягу. Для цього його необхідно взяти у комірника. Він складається з блузона, штанів, шкарпеток та взуття. Термін використання становить 1 рік, але у випадку зношування підлягає заміні раніше. В роботі одяг можна використовувати протягом 5 змін або по мірі забруднення віддавати на прання. Для цього в гардеробних розміщуються пластикові контейнери для брудного одягу.

Далі цей одяг перуть в пральних машинах з використанням прального порошку, висушують та прасують. У випадку виявлення дефектів проводять ремонт. Також у комірника перед кожною зміною треба брати засоби індивідуального захисту, а також одноразові шапочки та халати і розкласти по призначених для цього шафах.

ДР 1.3 Підготовка миючих та дезінфікувальних засобів

Спершу визначають кількість робочих розчинів миючих засобів необхідних для миття. Далі зі складу беруть концентровані миючі засоби, одноразові мопи та підготовують порожні відра та швабри для миття. За допомогою мірного циліндра відміняють необхідну кількість концентрату згідно з інструкції від виробника і переливають у відро. Після цього доводять водою до необхідного об'єму. Відра закривають кришками і відносять до місця проведення миття.

ДР 1.4 Підготовка приміщень

Робочий персонал спершу проводить сухе очищення під час якого прибираються залишки скла, розсіпані продукти, тверді відходи. Далі проводять вологе очищення під час якого використовують звичайну воду. Після цього проводять дезобробку приміщень за допомогою дезінфікуючих засобів і перед початком виробничого процесу вичікують час експозиції.

В залежності від об'єктів, які необхідно мити підготовка приміщень поділяється на щоденну та генеральну. Під час щоденного прибирання персонал миє підлогу, обладнання. Під час генерального прибирання миється підлога, обладнання, стіни, вікна та двері.

ДР 1.5 Підготовка обладнання та комунікацій

Спершу персонал проводить візуальний огляд обладнання, де встановлює його цілісність. Далі перевіряє його функціонування, справність роботи різних датчиків і вимірювальних приладів. Також перевіряють герметичність обладнання. Після цього проводять очищення, миття та дезобробку обладнання.

У випадках передбачених технологією підготовки обладнання додатково проводить ополіскування, стерилізацію, охолодження чи підігрів. У випадку використання фільтрувальних матеріалів, проводять їх своєчасну заміну.

Також на цій стадії перевіряють роботу комунікацій. Раз на 3 місяці проводять перевірку на герметичність, або безпосередньо при виявленні відхилень в роботі.

ДР 2 Підготовка та стерилізація аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Від найвищої точки будівлі на висоті 2-3 метри атмосферне повітря забирають за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1) і направляють до наступної стадії підготовки аераційного повітря.

ДР 2.2. Очистка повітря від грубих часток

За допомогою фільтра грубої очистки (Ф-2) повітря (від стадії ДР 2.1) очищується від пилу та інших механічних частинок до ступеня очищення 90%.

ДР 2.3. Стиснення повітря

У компресор (К-3) надходить попередньо очищене повітря, де воно стискається до 0,35 – 0,5 МПа і нагрівається до температури 200 °С.

ДР 2.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи

Під дією теплообмінного апарату (Т-4) отримане стиснене повітря охолоджується до температури конденсації вологи 25-30°C і далі направляється у ресивер (Р-5), де проходить видалення конденсату та усунення пульсацій тиску.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

До теплообмінника-нагрівача (Т-6) надходить охоложене повітря (від ДР 2.4) і під дією пари нагрівається до температури 45 - 50 °С для надійної роботи фільтрів.

ДР 2.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Отримане нагріте повітря (від ДР 2.5) надходить до головного фільтру, де очищується від часток розміром більше 1 мкм до ступеня очищення $E = 95\%$.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Очищене в головному фільтрі повітря (від ДР 2.6) направляють до індивідуальних фільтрів (ІФ-8, ІФ-10, ІФ-18, ІФ-28), які встановлені безпосередньо на кожному ферментері, де відбувається остаточне очищення повітря від часточок розміром більше 0,01 мкм до ступеня очищення $E = 99,999\%$. Отримане повітря безпосередньо подається у інокулятори, посівний апарат і ферментер.

ДР 3 Приготування розчинів титрувальних агентів

ДР 3.1. Приготування 6%-го розчину HCl

ДР 3.1.1 Приготування стерильного 6%-го розчину HCl для підкислення середовища під час культивування в інокуляторі об'ємом 12 л

За допомогою піпетки у асептичних умовах відміряють 5 мл дистильованої води і переливають її у колбу об'ємом 100 мл і додають піпеткою 1 мл 36 % HCl, закривають ватно-марлевою пробкою. Отриманий 6% розчин HCl подають до відповідної стадії.

ДР 3.1.2 Приготування стерильного 6%-го розчину HCl для підкислення середовища під час культивування в інокуляторі об'ємом 100 л

За допомогою мірного циліндра у асептичних умовах відміряють 47,8 мл дистильованої води і переливають її у колбу об'ємом 100 мл і додають піпеткою 9,6 мл 36 % HCl, закривають ватно-марлевою пробкою. Отриманий 6% розчин HCl подають до відповідної стадії.

ДР 3.1.3 Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища перед стерилізацією композиції Б

За допомогою мірного циліндра відміряють 95,5 мл питної води і переливають її у колбу об'ємом 150 мл і додають мірним циліндром 19,1 мл 36 % HCl, закривають ватно-марлевою пробкою. Отриманий 6% розчин HCl подають до відповідної стадії.

ДР 3.1.4 Приготування стерильного 6%-го розчину HCl для підкислення середовища під час культивування в посівному апараті об'ємом 1 м³

За допомогою мірного циліндра у асептичних умовах відміряють 445,8 мл дистильованої води і переливають її у колбу об'ємом 750 мл і додають мірним циліндром 89,2 мл 36 % HCl, закривають ватно-марлевою пробкою. Отриманий 6% розчин HCl подають до відповідної стадії.

ДР 3.1.5 Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища перед стерилізацією композиції Б

За допомогою мірного циліндра відміряють 890,8 мл питної води і переливають її у колбу об'ємом 1,5 л і додають мірним циліндром 178,2 мл 36 % HCl, закривають ватно-марлевою пробкою. Отриманий 6% розчин HCl подають до відповідної стадії.

ДР 3.1.6 Приготування стерильного 6%-го розчину HCl для підкислення середовища під час культивування в ферментері об'ємом 10 м³

За допомогою мірного циліндра у асептичних умовах відміряють 3750 мл дистильованої води і переливають її у реактор-змішувач (РЗ-37) і додають мірним циліндром 750 мл 36 % HCl при постійному перемішуванні за допомогою мішалки. Отриманий 6% розчин HCl подають до відповідної стадії.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH

ДР 3.2.1 Приготування стерильного 6%-го розчину NaOH для підкислення середовища під час культивування в інокуляторі об'ємом 12 л

На лабораторних вагах зважують 0,36 г NaOH. Наважку поміщають у колбу на 50 мл, і додають за допомогою мірного циліндру 5,64 мл питної води, перемішують і закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують при температурі 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв. Готовий стерильний розчин подають до відповідної стадії.

ДР 3.2.2 Приготування стерильного 6%-го розчину NaOH для підкислення середовища під час культивування в інокуляторі об'ємом 100 л

На лабораторних вагах зважують 3,42 г NaOH. Наважку поміщають у колбу на 150 мл, і додають за допомогою мірного циліндру 53,58 мл питної води,

перемішують і закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують при температурі 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв. Готовий стерильний розчин подають до відповідної стадії.

ДР 3.2.3 Приготування стерильного 6%-го розчину NaOH для підкислення середовища під час культивування в інокуляторі об'ємом 1 м³

На лабораторних вагах зважують 32,1 г NaOH. Наважку поміщають у колбу на 1,5 л, і додають за допомогою мірного циліндру 502,9 мл питної води, перемішують і закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують при температурі 131°C і тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв. Готовий стерильний розчин подають до відповідної стадії.

ДР 3.2.4 Приготування стерильного 6%-го розчину NaOH для підкислення середовища під час культивування в інокуляторі об'ємом 10 м³

На технічних вагах зважують 270 г NaOH. Наважку поміщають у реактор-змішувач (РЗ-38) і додають мірним циліндром 4230 мл води. Перемішують за допомогою мішалки, до повного розчинення солі. Стерилізують при температурі 131 °C і тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв. Після стерилізації отриманий 6% розчин NaOH подають до відповідної стадії.

ДР 4. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Необхідно приготувати 0,55 л поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії 0,06 л та об'єм сирого гліцерину 0,02 л, кількість води для приготування поживного середовища становитиме 0,53 л.

У табл. 5.5 (розділ 5) наведено розрахунок необхідної компонентів для приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках. Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На лабораторних вагах зважують 0,55 г дріжджового екстракту і 0,41 г бактеріологічного пептону. Отримані наважки переносять у колбу об'ємом 500 мл,

мірним циліндром додають дистильовану воду 130 мл, добре перемішують, до повного розчинення речовин. Потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С і тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На лабораторних вагах зважують 1,51 г $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$. Отриману наважку переносять у колбу об'ємом 500 мл, мірним циліндром додають дистильовану воду 150 мл, добре перемішують, до повного розчинення речовин. Потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С і тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На лабораторних вагах зважують 5,5 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та 0,3 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Отримані наважки переносять у колбу об'ємом 750 мл, мірним циліндром додають дистильовану воду 250 мл, добре перемішують, до повного розчинення речовин. Потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С і тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 12 л.

Необхідно приготувати 6,13 л поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії 0,61 л та об'єм сирого гліцерину 0,23 л, кількість води для приготування поживного середовища становитиме 5,81 л.

У табл. 5.6 (розділ 5) наведено розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 12 л. Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На лабораторних вагах зважують 6,13 г дріжджового екстракту і 4,6 г бактеріологічного пептону. Отримані наважки переносять у колбу об'ємом 5 л, мірним циліндром додають 1953 мл дистильованої води, добре перемішують, до повного розчинення речовин. Потім закривають колбу ватно-

марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С і тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На лабораторних вагах зважують 2,75 г $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$. Отриману наважку переносять у колбу об'ємом 2 л, мірним циліндром додають 1951 мл дистильованої води, добре перемішують, до повного розчинення речовин. Потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С і тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР 4.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На лабораторних вагах зважують 61,3 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та 3,1 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Отримані наважки переносять у колбу об'ємом 2 л, мірним циліндром додають 1904 мл дистильованої води, добре перемішують, до повного розчинення речовин. Потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С і тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л.

Необхідно приготувати 57,27 л поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії 5,73 л, об'єм сирого гліцерину 2,1 л, та кількість конденсату 5,52 л, то кількість води для приготування поживного середовища становитиме 48,8 л.

У табл. 5.7 (розділ 5) наведено розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л. Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 57,3 г дріжджового екстракту і 43 г бактеріологічного пептону та переносять в реактор-змішувач об'ємом 30 л (РЗ-12), додають через об'ємний дозатор (Д-11) 24,7 л питної води. У сорочку апарата подають пару для підтримання температури на рівні 30 °С та перемішують за допомогою мішалки, до повного розчинення речовин. Стерилізацію проводять при

температурі 112 °С і тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв. Після стерилізації композицію охолоджують подачею холодної води у сорочку збірника при перемішуванні до температури 30 °С. Після охолодження композицію за допомогою престальтичного насоса (Н-13) перекачують в інокулятор (І-18).

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 157,5 г KH_2PO_4 , 572,7 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та переносять в реактор-змішувач об'ємом 30 л (РЗ-15), додають через об'ємний дозатор (Д-14) 24,1 л питної води, перемішують за допомогою мішалки, до повного розчинення речовин. Потім додають 6% розчин HCl від ДР 2.1.3 до доведення до значення рН 3,5. Після чого зважують на технічних вагах і додають 28,6 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. У сорочку апарата подають пару для підтримання температури на рівні 30 °С та добре перемішують мішалкою, після перемішування дану композицію за допомогою відцентрового насоса (Н-16) перекачують до попередньо простерилізованого інокулятора (І-17), де ця композиція стерилізується при температурі 131 °С і тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв. Після стерилізації композицію охолоджують подачею холодної води у сорочку інокулятора при перемішуванні до температури 30 °С.

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м³.

Необхідно приготувати 534,5 л поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії 53,5 л, об'єм сирого гліцерину 19,7 л, та кількість конденсату 51,48 л, то кількість води для приготування поживного середовища становитиме 452,3 л.

У табл. 5.8 (розділ 5) наведено розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м³. Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 534,5 г дріжджового екстракту і 400,9 г бактеріологічного пептону та переносять в реактор-змішувач об'ємом 300 л (РЗ-21), додають через об'ємний дозатор (Д-19) 230,7 л питної води. У сорочку апарата

подають пару для підтримання температури на рівні 30 °С та перемішують за допомогою мішалки, до повного розчинення речовин. Стерилізацію проводять при температурі 112 °С і тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв. Після стерилізації композицію охолоджують подачею холодної води у сорочку збірника при перемішуванні до температури 30 °С. Після охолодження композицію за допомогою престальтичного насоса (Н-21) перекачують в інокулятор.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1469,9 г KH_2PO_4 , 5345 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та переносять в реактор-змішувач об'ємом 300 л (РЗ-22), додають через об'ємний дозатор (Д-22) 221,6 л питної води, перемішують за допомогою мішалки, до повного розчинення речовин. Потім додають 6% розчин HCl від ДР 2.1.5 до доведення до значення рН 3,5. Після чого зважують на технічних вагах і додають 267,3 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. У сорочку апарата подають пару для підтримання температури на рівні 30 °С та добре перемішують мішалкою, після перемішування дану композицію за допомогою відцентрового насоса (Н-24) перекачують до попередньо простерилізованого посівного апарату (ПА-27), де ця композиція стерилізується при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв. Після стерилізації композицію охолоджують подачею холодної води у сорочку інокулятора при перемішуванні до температури 30 °С.

ДР 4.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого культивування у ферментері об'ємом 10 м³.

Необхідно приготувати 4,5 м³ поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу з минулої стадії 0,5 м³, об'єм сирого гліцерину 165,8 л, та кількість конденсату 433,42 л, то кількість води для приготування поживного середовища становитиме 3833,3 л.

У табл. 5.9 (розділ 5) наведено розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування поживного середовища для виробничого культивування у ферментері об'ємом 10 м³. Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 4.5.1. Приготування композиції А

За допомогою вагового дозатора (Д-29) зважують 4,5 кг дріжджового екстракту, 3,38 кг бактеріологічного пептону, 12,38 кг г KH_2PO_4 , 45 кг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,25 кг $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та переносять в реактор-змішувач об'ємом 5 м³ (РЗ-31), додають через об'ємний дозатор (Д-30) 3833,3 л питної води. У сорочку апарата подають пару для підтримання температури на рівні 30 °С та перемішують за допомогою мішалки, до повного розчинення речовин. Далі композицію за допомогою відцентрового насосу (Н-32) перекачують в установку безперервної стерилізації (УБС-33).

ДР 4.5.2. Стерилізація композиції А в УБС

Отриману композицію А (від ДР 3.5.1) стерилізую в установці безперервної стерилізації (УБС-33), де відбувається стерилізація гострою парою за температури 131°С упродовж хвилин 5-7 хв. Після стерилізації охолоджену до температури 30 °С композицію перекачують за допомогою перестальтичного насосу (Н-34) до ферментера об'ємом 10 м³ (Ф-39).

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Yarrowia lipolytica* S6 зберігають у пробірках при температурі 4°С зі скошеним середовищем УМ-агар. Пересіви здійснюють щомісяця. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах [5].

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з УМ-агаром, розсівають мікробіологічною петлею для отримання ізольованих колоній на чашки Петрі із УМ-агаром і культивують при температурі 30°С упродовж 24 год. [5]

ТП 5.3. Вирощування посівного матеріалу на агаризованих середовищах

Ізольовані колонії (від ТП 4.2) пересівають петлею в 5 пробірок зі скошеним УМ-агаром з розрахунку, що 1 ізольована колонія, яка знаходиться на відстані не менше 1 см від іншої, використовується для засіву. Пробірки ставлять в термостат,

за таких умов: температура культивування – 30°C, тривалість культивування – 24 год.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Для вирощування посівного матеріалу у стерильну колбу об'ємом 750 мл в асептичних умовах додають розчин композиції А (від ДР 4.1.1), Б (від ДР 4.1.2) та В (від ДР 4.1.3), а також 20 мл сирого гліцерину. Перемішують обертовими рухами і розливають в 5 стерильних колб Ерленмейєра об'ємом 750 мл по 110 мл у кожную.

У кожную пробірку з робочою культурою *Yarrowia lipolytica* S6, вирощену на УМ-агарі, вносять 12 мл фізіологічного розчину, змивають культуру, піпеткою відбирають одержану дріжджеву суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію, одержану з однієї пробірки. Колби ставлять на вирощування на качалку при температурі 30°C, швидкості обертання 160 об/хв. Після вирощування визначають концентрацію біомаси, яка повинна становити 21,3 г/л, а також здійснюють мікробіологічний контроль. Далі усі колби зливають у засівну колбу і передають на стадію ТП.5.5 [5].

ТП 5.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 12 л

В боксі в асептичних умовах у спеціальний засівний бачок для асептичної передачі зливають Композицію А (від ДР 4.2.1.), Композицію Б (від ДР 4.2.2.), Композицію В (від ДР 4.2.3.) та 230 мл сирого гліцерину, перемішують і отриманий розчин асептично через конектор передають у інокулятор (І-10). Вмикають перемішуючий пристрій з частотою обертів 200 об/хв. Далі в умовах асептики здійснюють підключення колб з розчинами титрувальних агентів, а саме: 6 % розчину NaOH (від ДР 3.2.1) та 6 % розчину HCl (від ДР 3.1.1) до автоматизованої системи регулювання рівня рН, задають режим підтримки рівня рН = 3.5. Потім через барботер подають стиснене стерильне повітря з аерацією 1 об/об/хв. У сорочку подають холодну воду для підтримки температури $T = 30^{\circ}\text{C}$ в середині інокулятора. Через засівну колбу в асептичних умовах вносять 0,61 л посівного матеріалу від ТП 5.4. Культивування проводять впродовж 24 год. Регулярно через кожні 4 год відбираються проби культуральної рідини в асептичних умовах через

пробовідбірник і проводять визначення концентрації біомаси в культуральній рідині, а також здійснюють мікробіологічний контроль шляхом мікроскопіювання та посівів на чашки Петрі з відповідними середовищами. Отриманий посівний матеріал самоплином подається на наступну стадію.

ТП 5.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

У інокулятор із композицією Б (від ДР 4.3.2) за допомогою перистальтичного насосу (Н-13) додають композицію А (від ДР 4.3.1) та через засівну колбу додають 2,1 л сирого-гліцерину, вмикають перемішувач з частотою обертів 200 об/хв. Далі в умовах асептики здійснюють підключення колб з розчинами титрувальних агентів, а саме: 6 % розчину NaOH (від ДР 3.2.2) та 6 % розчину HCl (від ДР 3.1.2) до автоматизованої системи регулювання рівня рН, задають режим підтримки рівня рН = 3.5. Потім через барботер подають стиснене стерильне повітря з аерацією 1 об/об/хв. У сорочку подають холодну воду для підтримки температури $T = 30^{\circ}\text{C}$ в середині інокулятора. Самоплином вносять 5,73 л посівного матеріалу (від ТП 5.5). Культивування проводять впродовж 24 год. Регулярно через кожні 4 год відбираються проби культуральної рідини в асептичних умовах через пробовідбірник і проводять визначення концентрації біомаси в культуральній рідині, а також здійснюють мікробіологічний контроль шляхом мікроскопіювання та посівів на чашки Петрі з відповідними середовищами. Отриманий посівний матеріал трубою перетискання подається на наступну стадію.

ТП 5.7. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м³

У посівний апарат із композицією Б (від ДР 4.4.2) за допомогою перистальтичного насосу (Н-21) додають композицію А (від ДР 4.4.1) та за допомогою мембранного насосу (Н-24) додають 19,7 л сирого-гліцерину зі збірника об'ємом 20 л (З-25), вмикають перемішувач з частотою обертів 200 об/хв. Далі в умовах асептики здійснюють підключення колб з розчинами титрувальних агентів, а саме: 6 % розчину NaOH (від ДР 3.2.3) та 6 % розчину HCl (від ДР 3.1.4) до автоматизованої системи регулювання рівня рН, задають режим підтримки рівня рН = 3.5. Потім через барботер подають стиснене стерильне повітря

з аерацією 1 об/об/хв. У сорочку подають холодну воду для підтримки температури $T = 30^{\circ}\text{C}$ в середині посівного апарату. Через трубу перетискання вносять 53,5 л посівного матеріалу (від *ТП 5.6*). Культивування проводять впродовж 24 год. Регулярно через кожні 4 год відбираються проби культуральної рідини в асептичних умовах через пробовідбірник і проводять визначення концентрації біомаси в культуральній рідині, а також здійснюють мікробіологічний контроль шляхом мікроскопіювання та посівів на чашки Петрі з відповідними середовищами. Отриманий посівний матеріал трубою перетискання подається на наступну стадію.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 10 м³

У ферментер за допомогою перистальтичного насосу (Н-34) додають композицію А (від *ДР 4.5.2*) та за допомогою мембранного насосу (Н-36) додають 165,8 л сирого-гліцерину зі збірника об'ємом 200 л (З-37), вмикають перемішувачий пристрій з частотою обертів 200 об/хв. Далі самоплином подають розчини титрувальних агентів, а саме: 6 % розчин NaOH (від *ДР 3.2.4*) з реактора-змішувача об'ємом 5 л (РЗ-40) та 6 % розчин HCl (від *ДР 3.1.6*) з реактора-змішувача об'ємом 5 л (РЗ-39) до автоматизованої системи регулювання рівня рН, задають режим підтримки рівня рН = 3.5. Потім через барботер подають стиснене стерильне повітря з аерацією 1 об/об/хв. У сорочку подають холодну воду для підтримки температури $T = 30^{\circ}\text{C}$ в середині ферментера. Через трубу перетискання вносять 0,5 м³ посівного матеріалу (від *ТП 5.7*). Культивування проводять впродовж 24 год. Регулярно через кожні 4 год відбираються проби культуральної рідини в асептичних умовах через пробовідбірник і проводять визначення концентрації біомаси в культуральній рідині, а також здійснюють мікробіологічний контроль шляхом мікроскопіювання та посівів на чашки Петрі з відповідними середовищами. Процес ферментації вважається завершеним, якщо продуцент синтезував достатню концентрацію біомаси 21,3 г/л і якщо час ферментації наблизився до 24 годин. Отриману культуральну рідину перекачують перистальтичним насосом (Н-40) на стадію виділення.

ЗВ 7. Знешкодження відходів

ЗВ 7.1. Знешкодження атмосферних відходів

Отримані атмосферні відходи з кожної стадії направляються на фільтри, де воно очищується від клітин продуцента.

ЗВ 7.2. Знешкодження рідких відходів

Отримані рідкі відходи з кожної стадії направляються на станції очищення стічних вод, після чого зливаються до міської каналізації.

ЗВ 7.3. Знешкодження твердих відходів

Отримані тверді відходи з кожної стадії сортують передають відповідним організаціям на утилізацію. Якщо відходи забрудненні клітинами продуцента або іншими мікрорганізмами, то спершу їх знешкоджують в убойному автоклаві.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Для забезпечення успішності виробничого біосинтезу та безпечності отриманого цільового продукту, необхідно регулярно проводити мікробіологічний контроль. Його здійснюють під час всіх стадій виробничого біосинтезу та під час проходження етапів підготовки виробничого обладнання та поживних середовищ для культивування. Головна мета мікробіологічного контролю – це визначення мікробіологічної чистоти інокуляту та поживного середовища після проходження етапу стерилізації [65].

8.1. Карта постадійного контролю виробництва

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю отримання кормової біомаси

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1.1 Забір атмосферного повітря	Повітрозабірник Висота забору повітря	-	При проектуванні та встановленні	Від найвищої точки будівлі на висоті 2-3 метри
Кт 1.2 Очистка від грубих домішок	Очищене від грубих домішок повітря Ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення	Після очищення повітря у фільтрі грубої очистки	E = 90%
Кт 1.3 Стиснення повітря	Стиснене повітря Температура, тиск	Термометр, манометр	Після стиснення повітря у турбокомпресорі	P = 0,35-0,5 МПа, t = 200°C
Кт 1.4 Охолодження і видалення зайвої вологи	Охоложене повітря Температура, вміст вологи	Термометр, гігрометр	Після охолодження і видалення конденсату	t = 25-30°C, W = 60%

НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ				
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Сидоренко М.Р.		
Перевір.		Стабніков В.П.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва			Лім.	Арк.
				95
			Кафедра БТМ	
			Аркушіє 136	

Продовження табл. 8.1

Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря Температура, вміст вологи	Термометр, гігрометр	Після нагрівання в теплообміннику	t = 45-50 °С, W= 50%
Кт 1.6 <i>Очищення у головному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення	Манометр, перевірка ступеня очищення	Після очищення повітря у головному фільтрі	E = 95 %.
Кт, Км 1.7 <i>Очищення в індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення	Манометр, перевірка ступеня очищення	Після очищення повітря у індивідуальному фільтрі	E = 99,999 % Відсутність мікробіоти
Кх 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.5, 2.1.6, <i>Приготування 6%-го розчину HCl</i>	Розчин соляної кислоти Концентрація	Фізико-хімічний метод	Після приготування розчину	C = 6%
Кх 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4 <i>Приготування стерильного 6%-го розчину NaOH для підкислення середовища під час культивування</i>	Розчин натрію гідроксиду Температура, тиск, час, концентрація, стерильність	Манометр, термометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Концентрація визначається після приготування розчину, тривалість, тиск і температура безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131°C P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, C = 6%, відсутність мікробіоти
<i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках</i> Кт, Км, 3.1.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А Температура, тиск, час, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112°C P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

<p>Кт, Км, 3.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Температура, тиск, час, стерильність</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 131^{\circ}\text{C}$ $P = 0,15 \text{ МПа}$, $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, 3.1.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i></p>	<p>Композиція В Температура, тиск, час, стерильність</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 131^{\circ}\text{C}$ $P = 0,15 \text{ МПа}$, $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти</p>
<p><i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 12 л</i></p> <p>Кт, Км, 3.2.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Температура, тиск, час, стерильність</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 112^{\circ}\text{C}$ $P = 0,05 \text{ МПа}$, $\tau = 30 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, 3.2.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Температура, тиск, час, стерильність</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 131^{\circ}\text{C}$ $P = 0,15 \text{ МПа}$, $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти</p>

<p>Кт, Км, 3.2.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i></p>	<p>Композиція В Температура, тиск, час, стерильність</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 131^{\circ}\text{C}$ $P = 0,15 \text{ МПа}$, $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти</p>
<p><i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в апараті об'ємом 100 л</i></p> <p>Кт, Км, 3.3.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Температура, тиск, час, стерильність</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 112^{\circ}\text{C}$ $P = 0,05 \text{ МПа}$, $\tau = 30 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, 3.3.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Температура, тиск, час, рН, стерильність</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, рН-детектор, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура і рівень рН визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 131^{\circ}\text{C}$, $P = 0,15 \text{ МПа}$, $\tau = 40 \text{ хв}$, $\text{pH} = 3,0$, відсутність мікробіоти</p>
<p><i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в апараті об'ємом 1 м³</i></p> <p>Кт, Км, 3.4.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Температура, тиск, час, стерильність</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 112^{\circ}\text{C}$ $P = 0,05 \text{ МПа}$, $\tau = 30 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти</p>

Кт, Км, 3.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, тиск, час, рН, стерильність	Термометр, манометр, годинник, рН-детектор мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск, температура і рівень рН визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, рН = 3.0, відсутність мікробіоти
Приготування і стерилізація поживного середовища для промислового культивування у ферментері об'ємом 10 м ³ Кт 3.5.1 Приготування композиції А	Композиція А Швидкість перемішування	Тахометр	Частота обертів мішалки під час приготування	w = 80 об/хв
Кт, Км, 3.5.2 Стерилізація композиції А	Композиція А Температура, тиск, час, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131°С P = 0,15 МПа, τ = 5-7 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Yarrowia lipolytica</i> S6 Температура, мікробіологічна чистота	Холодильник, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожного місяця	t = 4 °С, τ = 1 місяць, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.2 Одержання робочої культури	Колекційна культура <i>Yarrowia lipolytica</i> S6 Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 30 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти

<p>Кт, Км 4.3 Вирощування посівного матеріалу на агаризованих середовищах</p>	<p>Колекційна культура <i>Yarrowia lipolytica</i> S6 Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота</p>	<p>Термостат, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування</p>	<p>$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках</p>	<p>Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>Термометр, годинник, тахометр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль проводять після</p>	<p>$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $w = 180$ об/хв, $C_6 = 21,3$ г/л відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.5, 4.6 Вирощування інокуляту в інокуляторах об'ємом 12 та 100 л</p>	<p>Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, рН, аерація, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури, аерації і рН, годинник, тахометр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, аерація, частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль – кожні 4 год і після культивування</p>	<p>$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $A = 1$ об/об/хв $\text{pH} = 3,5$, $\tau = 16$ год, $w = 200$ об/хв, $C_6 = 21,3$ г/л відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.7 Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м³</p>	<p>Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, рН, аерація, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури, аерації і рН, годинник, тахометр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, аерація, частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль – кожні 4 год і після культивування</p>	<p>$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $A = 1$ об/об/хв $\text{pH} = 3,5$, $\tau = 16$ год, $w = 200$ об/хв, $C_6 = 21,3$ г/л відсутність сторонньої мікробіоти</p>

<p>Кт, Км 5.1 Виробничий культивування у ферментері об'ємом 10 м³</p>	<p>Культуральна рідина Температура, аерація, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, рН, аерація, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури, аерації і рН, годинник, тахометр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, аерація, частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль – кожні 4 год і після</p>	<p>t = 30 °С, A= 1 об/об/хв рН = 3.5, τ = 16 год, w = 200 об/хв, C_б = 21,3 г/л відсутність сторонньої мікробіоти</p>
--	---	---	---	---

8.2. Мікробіологічний контроль

8.2.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Для проведення мікробіологічного контролю поживного середовища необхідно в асептичних умовах відібрати пробу поживного середовища, яке пройшло стерилізацію, і зробити посів 0,1 мл зразка на 2 види щільних поживних середовищ в чашках Петрі: м'ясо-пептонний агар (МПА) для виявлення забруднення бактеріями та сусло-агар (СА) для виявлення забруднення дріжджами та грибами. Після посіву досліджувані чашки Петрі необхідно помістити в термостат для подальшого інкубування протягом декількох дні за температури 30°C. Після інкубування проводять візуальний огляд поверхні поживних середовищ на наявність колоній контамінантів. Для того щоб підтвердити стерильність поживного середовища, на поживних середовищах не повинно бути будь-яких колоній мікроорганізмів [65].

8.2.2. Мікробіологічний контроль чистоти виробничої культури

Для перевірки чистоти виробничої культури проводять 2 види мікробіологічного контролю: розсів на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопуванням [65].

Розсів методом виснажуючого штриха виробничої культури здійснюють в асептичних умовах на агаризовані поживні середовища: м'ясо-пептонний агар (МПА) для виявлення забруднення бактеріями та сусло-агар (СА) для виявлення забруднення дріжджами та грибами. Після розсіву чашки Петрі ставлять у термостат на декілька днів та інкубують за температури 30°C. На кінець інкубування проводять візуальну оцінку поверхні поживних середовищ. На середовищі МПА не повинно бути жодних колоній, а на середовищі СА повинні бути виключно колонії *Yarrowia lipolytica*, яка має білі, пастоподібні, злегка шорсткі та підняті в центрі колонії [27, 65].

Розсів на чашки Петрі довготривалий процес, тому для контролю також використовують метод світлового мікроскопіювання. Для проведення цього методу готують препарат «розчавлена крапля». На першому етапі приготування в асептичних умовах відбирають пробу культуральної рідини і наносять невеликою краплиною на попередньо знежирене предметне скло, далі зразок накривають покривним скельцем і легенько притискають, щоб з під нього вийшли бульбашки повітря та зайва волога, яку збирають фільтрувальним папером. Мікроскопіювання спершу проводять на збільшенні 8х, а потім переходять на збільшення 40х [66].

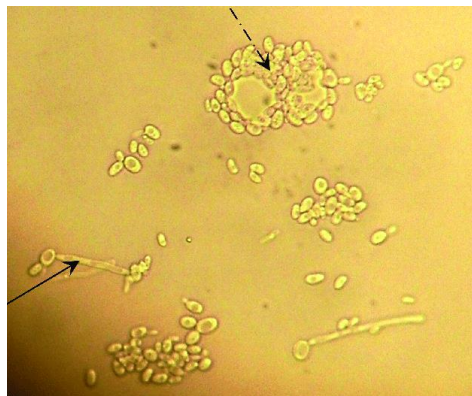


Рис 8.1 Світлове мікроскопіювання *Y. lipolytica* при збільшенні 40х [67]

При умові відсутності сторонньої мікрофлори, у досліджуваному зразку можна спостерігати клітини *Yarrowia lipolytica*. Клітини цих дріжджів мають сфероїдну, еліпсоїдну або витягнуту форму. Їхня довжина в середньому сягає 5- 10 мкм, а

діаметр 3-7,8 мкм. Клітини поодинокі або в ланцюжках, що включають 3 – 4 клітини. Мають полярне або латеральне брунькування [27].

8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.3.1. Концентрація біомаси

Концентрацію біомаси мікроорганізмів у поживному середовищі можна визначити за допомогою гравіметричного методу (у літературі частіше зустрічається як метод сухої ваги). Концентрацію біомаси визначають у грамах на літр. Цей метод особливо корисний для культур з низькою вихідною біомасою, коли інші методи можуть бути недостатньо чутливими для виявлення невеликих кількостей мікроорганізмів [68].

Принцип методу: Гравіметричні методи аналізу засновані на законах збереження маси і сталості складу речовин. Принцип цього методу полягає у очищенні зразка культуральної рідини з біомасою за допомогою центрифугування культурального середовища для збору дріжджових клітин, промивання їх відповідним розчинником для видалення залишків середовища, а потім висушування клітин у сушильній шафі до досягнення постійної ваги. Потім зважують суху вагу дріжджової біомаси і використовують це значення для розрахунку концентрації біомаси в культуральному середовищі [69, 70].

Матеріали та обладнання [70]:

- Центрифужні пробірки
- Мембранні фільтри
- Дистильована вода
- Центрифуга
- Сушильна шафа
- Аналітичні ваги
- Ексикатор з безводним хлористим кальцієм (CaCl_2)
- Зразок культуральної рідини

Хід виконання:

Спершу відбирають визначений об'єм культуральної рідини 10 мл у центрифужні пробірки. Потім зразок центрифугують за таких параметрів 5000 об/хв

15 хв 2-3 рази. Після кожного спроби центрифугування з центрифужної пробірки обережно відливають супернатант і додають дистильовану воду до початкового об'єму [69, 70].

Після центрифугування зразок двічі промивають дистильованою водою, щоб змити з нього залишки поживного середовища. Після цієї процедури зразок у центрифужній пробірці, а також порожню центрифужну пробірку поміщають у сушильну шафу і сушать за температури 105 °С 1-2 години. Після цього центрифужну пробірку кладуть в ексикатор на охолодження. Через годину зважують на аналітичних вагах. Висушування і зважування повторюють поки маса не набуде постійного значення [69, 70].

Отримані значення підставляють у формулу визначення маси сухої біомаси (5.1):

$$M = \frac{(A-B) \cdot 1000}{V} \quad (5.1)$$

де А – маса центрифужної пробірки зі зразком; В – маса порожньої центрифужної пробірки; V – об'єм дослідного зразку;

Обладнання для проведення аналізу:

A&D HR-250AG — аналітичні ваги 1 класу точності з зовнішнім калібруванням і великим знімним протипротяговим боксом з антистатичним покриттям. Бюджетна серія аналітичних ваг у компактному корпусі з межею зважування до 250 г [71].



Рис.8.2. Ваги аналітичні A&D HR-250AG [71]

8.3.2 Визначення концентрації джерела вуглецевого живлення у поживному середовищі

Джерелом вуглецевого живлення в середовищі для культивування *Yarrowia lipolytica* є гліцерин ($C_3H_8O_3$). Для визначення вмісту гліцерину в середовищі обрано метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з рефрактометричним детектором, який визначає показник заломлення [72].

Принцип методу: Він полягає розділенні отриманої рідини на окремі фракції за допомогою хроматографічної колонки і паралельному вимірюванні показника заломлення. Для визначення концентрації порівнюють площі піків сигналів [73, 74].

Перелік необхідних матеріалів і реактивів: центрифуга, піпетки, епандорфи або центрифужні пробірки мембранні фільтри, система ВЕРХ, яка складається з насоса, інжекторної системи, модулю нагрівання колонок, з'єднаних між собою катіонообмінних колонок, рефрактометричного детектора та комп'ютера [73, 74].

Умови проведення дослідів: спершу відбирають зразок культуральної рідини і центрифугують його при 10 000 об/хв протягом 10 хв при 4°C, після цього відбирають 1,2 мл супернатанту і пропускають його через мембранний фільтр з діаметром пор 0,2 мкм. Зразок зберігають при температурі 20°C до початку аналізу. Хроматографію проводять при швидкості потоку 0,6 мл/хв, температуру підтримують на рівні 45°C, як розчинник використовують 5 мМ H_2SO_4 . У систему вводять зразок об'ємом 20 мкл. За цих умов час утримання становить приблизно 13,5 хв. Визначають показник заломлення за допомогою детектора. Потім порівнюють площу піку зразка з площами піків стандартних розчинів гліцерину з відомою концентрацією. [73, 74].

8.3.3 Визначення концентрації джерела азотного живлення у поживному середовищі

Джерелом азотного живлення в середовищі для культивування *Yarrowia lipolytica* є амоній сульфат ($(NH_4)_2SO_4$). Для визначення концентрації амонію у культуральній рідині використовують модифікований метод Бертло. [75].

Принцип методу: До очищеного зразка додають саліцилат та забуферений гіпохлоритний реагент для утворення зеленого забарвлення. Після цього вимірюють поглинання світла спектрофотометрично при 660 нм [75, 76].

Перелік необхідних матеріалів і реактивів: спектрофотометр, дистильована вода, центрифуга, мембранні фільтри, піпетки, епандорфи або центрифужні пробірки, колби, піпетки, саліцилат, забуферений гіпохлоритний реагент, стандартний амонійний розчин [76]

Умови проведення дослідю: спочатку відбирають зразок культуральної рідини і центрифугують його при 10 000 об/хв протягом 10 хв при 4°C, після цього відбирають 5 мл супернатанту і пропускають його через мембранний фільтр з діаметром пор 0,2 мкм. Зразок зберігають при температурі 20°C до початку аналізу. Очищений зразок об'ємом 5 мл додють в 50-мл мірну колбу. Потім до колби додають 5 мл саліцилату, і колбу легенько струшують. Доводять об'єм до 40 мл дистильованою водою. Після цього до колби додають 3 мл забуференого гіпохлоритного реагенту для утворення зеленого забарвлення, після чого доводять об'єм до 50 мл дистильованою водою, і вміст колби ретельно перемішують. Колбу залишають на 60 хвилин при кімнатній температурі. Вимірювання поглинання хвилі проводять при довжині хвилі 660 нм проти холостого розчину реагенту. Отриману результати порівнюють з калібрувальним графіком, який будують з використанням поглинання стандартних розчинів [76].

8.4 Методи ідентифікації цільового продукту

Ідентифікацію цільового продукту проводять за його органолептичними показниками: за зовнішнім виглядом та запахом. Згідно із ДСТУ 8723:2017 Дріжджі кормові. Методи випробування цільовий продукт повинен мати вигляд порошку або гранул від бежевого до світло-жовтого кольору з легким характерним дріжджовим запахом, без стороннього запаху [77].

8.5 Визначення показників якості цільового продукту

8.5.1 Метод визначання масової частки вологи

Для визначення вмісту вологи в кормовій біомасі використовується гравіметричний метод. Гравіметричний метод визначення масової частки вологи заснований на вимірюванні різниці маси продукту до та після висушування при заданій температурі. Цей метод характеризується простотою, високою точністю до 0,01-0,005% і гарною відтворюваністю [78].

Принцип методу: Наважку цільового продукту висушують до постійної маси за певної температури та часу і зважують на вагах. Масову частку вологи розраховують за формулою [78].

Матеріали та обладнання [79]

- Ваги аналітичні
- Сушильна шафа
- Ексикатор
- Ваговий стаканчик з кришкою
- Пінцет

Хід виконання: Спершу проводять зважування порожнього вагового стаканчика з кришкою. Далі у ваговий стаканчик насипають від 5-10 г цільового продукту і розподіляють його по дну рівномірним шаром. Після цього стаканчик накривають кришкою і зважують. Відкритий стаканчик з продуктом і кришкою до нього кладуть в сушильну шафу і висушують при 105 °C протягом 30 хвилин. Після процедури ваговий стаканчик з висушеним продуктом за допомогою пінцету накривають кришкою і ставлять в ексикатор для охолодження до кімнатної температури, а далі зважують і отримані дані підставляють у формулу (8.1) для проведення розрахунку [79].

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \times 100 \quad (8.1)$$

де m_1 – маса вагового стаканчика з продуктом до висушування; m_2 – маса вагового стаканчика з продуктом після висушування; m – маса порожнього вагового стаканчика з кришечкою [79];

Обладнання для проведення аналізу:

Для аналізу застосовують ті самі аналітичні ваги, що і для методу визначення концентрації біомаси.

Сушильна шафа Memmert UN260plus

Універсальна сушильна шафа Memmert UN260plus об'ємом 256 л з природною конвекцією повітря призначена для теплової обробки. Прилад виготовлений з високоякісної гігієнічної нержавіючої сталі, що легко очищується. Характеризується зручним інтерфейсом та високою точністю [80].



Рис.8.3. Сушильна шафа Memmert UN260plus [80]

8.5.2. Метод визначання масової частки білку

Метод К'ельдаля – це класичний спосіб визначення білка в сировині та готових харчових продуктах і кормах для тварин. Даний метод можна використати для визначення концентрації білку в біомасі. Метод включає в себе кілька основних етапів: пробопідготовку, мінералізацію, дистиляцію і титрування [81, 82].

Принцип методу: Зразок розкладають кип'ятінням з концентрованою H_2SO_4 з додаванням K_2SO_4 з мідним каталізатором для підвищення швидкості реакції. N,

який міститься в білку, перетворюється на $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Потім додають концентрований NaOH, щоб нейтралізувати кислоту і зробити осад основним, а вивільнений NH_3 переганяють у розчин борної кислоти і титрують сильнішою стандартизованою кислотою HCl, до колориметричної кінцевої точки [81].

Кількість Нітрогену в зразку розраховують математично за формулою (8.2):

$$N = \frac{(V_s - V_b) \times M \times 14.01}{W \times 10} \quad (8.2)$$

Де N – кількість нітрогену в білку; V_s – об'єм (мл) стандартизованої кислоти, використаної для титрування; V_b – об'єм (мл) стандартизованої кислоти, використаної для титрування холостого реагенту; M - молярність стандартного HCl; 14,01 – атомна маса N; W – маса (г) наважки або стандарту; 10 – коефіцієнт для перерахунку мг/г у відсотки;

Кількість білків у біомасі визначають у перерахунку x кількості нітрогену в зразку за формулою (8.3):

$$P = N * F \quad (8.3)$$

Де P – кількість у відсотках білку в біомасі; N - кількість нітрогену в білку; F – коефіцієнт для переводу, для біомаси дріжджів становить 6,5

Матеріали та обладнання [81]:

- Нагрівний блок
- Нагрівні труби
- Дистиляційні трубки
- Дистиляційні блоки
- Колба для титрування
- Газовідвідний колектор
- Папір для зважування
- Дозатор для піпетування

- Сірчана кислота концентрована - 95-98%.
- Каталізатор: 7,0 г K₂SO₄ + 0,8 г CuSO₄
- Розчин гідроксиду натрію - 40%
- Розчин індикатора метилового червоного - розчиняють 100 мг метилового червоного в 100 мл метанолу.
- Розчин індикатора бромкрезолового зеленого - розчинити 100 мг бромкрезолового зеленого в 100 мл метанолу.
- Розчин борної кислоти - 4%
- Розчин борної кислоти -1%
- Стандартний розчин соляної кислоти
- Референтні стандарти: сульфат амонію, триптофан, лізин-НСІ або п-толуолсульфо кислота гліцину, для використання в якості стандарту 99.9%.

Обладнання для проведення аналізу:

NDA 702 Dumas

Аналізатор елементів NDA 702 Dumas - найкраще рішення для високопродуктивних лабораторій, яким потрібен швидкий і безпечний аналізатор з можливістю вибору між гелієм і аргоном в якості газу-носія. [83].



Рис.8.4. Аналізатор елементів NDA 702 Dumas[83]

DKL 20

Реактори DKL повністю автоматичні, вони складаються з алюмінієвого нагрівального блоку, підйомника для автоматичного переміщення зразків, витяжної шафи, пробірок, штатива для пробірок і піддону для крапель. [83].



Рис.8.5. Автоматична установка для розщеплення DKL 20 [83]

UDK 159 Automatic Kjeldahl Nitrogen Protein Analyzer

Повністю автоматичний процес забезпечує ефективну роботу, дистиляцію і титрування виконуються одночасно. Преміальна точність і достовірність результатів завдяки вбудованому колориметричному титратору з високоточною бюреткою. Автоматичне видалення залишків з титратора і пробірки для зразків. [83].



Рис.8.6. UDK 159 Automatic Kjeldahl Nitrogen Protein Analyzer [83]

8.5.3 Метод визначання масової частки золи

Зола - це маса неорганічних залишків, що залишаються після випаровування води та спалювання органічної матерії, яка характеризує загальний вміст

мінеральних речовин у кормах. Визначання масової частки золи в цільовому продукті проводять згідно з ISO 5984:2022 [84].

Принцип методу: Зважену наважку карбонізують, а потім спалюють при температурі 550 ± 25 °С. Після охолодження отриману золу зважують на вагах і проводять розрахунок за формулою, отриманий результат округлюють з точністю до 0,1 % (8.4) [84].

$$w = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \quad (8.4)$$

де m_1 – маса тигеля із золою; m_2 – маса тигеля з продуктом; m_0 – маса порожнього тигеля

Матеріали та обладнання [84]:

- Аналітичні ваги
- Муфельна піч
- Сушильна шафа
- Плита або газовий пальник
- Порцеляновий або кварцовий тигель для спалювання

Хід виконання:

Спершу нагрівають тигель протягом 30 хв у муфельній печі за температури 550 ± 25 °С і потім охолоджують його в ексікаторі до кімнатної температури. Далі цей тигель зважують з точністю до 0,001 г. Після цього у нього додають 5 г цільового продукту, який підлягає аналізу, і зважують, далі поступово нагрівають на плиті або газовому пальнику до моменту поки наважка не обвуглиться [84].

Потім тигель ставлять у муфельну піч, яка попередньо нагріта до 550 ± 25 °С і залишають на 3 години. Після цього візуально перевіряють чи немає в попелі вугільних частинок, якщо ні, то ставлять тигель назад в піч і ще прогрівають 1 годину, якщо вугільні частинки видно або є сумніви щодо їх наявності, то золу охолоджують, далі змочують дистильованою водою і обережно випаровують в

сушильній шафі за температури 105 °С, а потім знову ставлять тигель в піч на 1 годину [84].

Після нагрівання його охолоджують до кімнатної температури у сушильній шафі та проводять зважування з точністю до 0,001 г. Отримані дані використовують для розрахунку за формулою вказаною вище [84].

Обладнання для проведення аналізу:

Для аналізу застосовують ті самі аналітичні ваги, що і для методу визначення концентрації біомаси.

Муфельна піч СНОЛ 8,2/1100

Муфельна піч СНОЛ 8,2/1100 — універсальна, високої точності лабораторна електропіч розроблена для термічної обробки різних матеріалів [85].



Рис.8.7. Муфельна піч СНОЛ 8,2/1100 [85]

8.5.4 Метод визначання масової частки ліпідів

Принцип методу: Зразок гідролізують соляною кислотою при нагріванні, далі отриманий розчин охолоджують і фільтрують. Залишок промивають і сушать, потім піддають екстрагуванню легкою нафтою. Використаний розчинник видаляють перегонкою та сушінням. Отриманий залишок зважують і проводять розрахунок за формулою (8.5) [86].

(8.5)

$$w_2 = \frac{(m_6 - m_5)}{m_4} \times f$$

де m_4 – маса зваженої наважки цільового продукту; m_5 – маса колби з карбідом кремнію; m_6 – маса колби зі стружкою карбіду кремнію та висушеним залишком легкої нафтової витяжки; f – коректуючий коефіцієнт ($f = 1000$ г/кг) [45].

Матеріали та обладнання [86]:

- Вода
- Легка нафта
- Карбід кремнію
- Ацетон
- Соляна кислота
- Фільтрувальний папір
- Діатоміт для фільтрування
- Екстракційний наперсток
- Екстрактор
- Плита або газовий пальник
- Вакуумна шафа
- Десикатор

Хід виконання: Спершу зважують наважку 5 г цільового продукту і переносять в конічну колбу на 300 мл. До зразка додають 100 мл соляної кислоти і стружку карбіду кремнію і накривають колбу склом. Отриману суміш повільно доводять до кипіння на гарячій плиті або газовому пальнику і підтримують його протягом 1 години, при цьому перемішуючи кожні 10 хв, щоб виключити прилипання продукту [86].

Далі охолоджують до кімнатної температури і додають невелику кількість засобу для фільтрації, щоб запобігти втраті жиру під час фільтрації. Розчин фільтрують через зволожений та попередньо знежирений фільтрувальний папір складений вдвоє. Отримані залишок промивають холодною водою до отримання нейтрального фільтрату [86].

Після цього обережно поміщають фільтр з залишком в екстракційний наперсток і висушують під вакуумом протягом 60 хвилин вакуумній шафі при 80 °С. Коли процес закінчується, з шафи виймають наперсток і накривають його знежерованою ватою [86].

Далі зважують трохи стружки кабіду кремнію і додають у нову колбу. З'єднують колбу з екстрактором і поміщають наперсток в нього. Після цього проводять процес екстракції протягом 6 годин з використанням легкої нафти у якості розчинника. Розчинник відганяють, поки колба не стане майже вільною від нього. Далі у колбу додають 2 мл ацетону, збовтують і обережно нагрівають, щоб видалити ацетон[86].

Отриманий залишок сушать у колбі протягом 1,5 години під вакуумом у вакуумній шафі за температури 80 °С. Після цього колбу охолоджують до кімнатної температури і зважують на аналітичних вагах. Отримані дані підставляють у формулу наведену вище і проводять розрахунок [86].

Обладнання для проведення аналізу:

Ексикатор Сокслета

Ексикатор Сокслета — це прилад для безперервної екстракції важкорозчинних твердих речовин з твердих матеріалів [87].



Рис.8.8. Ексикатор Сокслета [87]

Вакуумна сушильна шафа СВ-80

Вакуумна сушильна шафа зазвичай використовують для сушіння у вакуумі до 0,002 атм і температури до 200 °С. Ця серія шаф призначена для щадного сушіння матеріалів і зразків, нестійких до високих температур [88].



Рис.8.9. Вакуумна сушильна шафа СВ-80 [88]

8.5.5. Перевірка інактивації біологічного агента

Для забезпечення безпечності продукції та унеможливлення промислового шпіонажу, після сушіння відбирають декілька проб та висівають на поживне середовище сусло-агар та інкубуються протягом декількох діб за температури 30°C в термостаті. На кінець інкубування на поживному середовищі не повинен спостерігатися ріст колоні *Yarrowia lipolytica* [65].

РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

Відходи виробництва – це речовини та сполуки, які утворюються на певних стадіях технологічного процесу і не застосовуються у наступних стадіях виробництва. Вони можуть бути небезпечними для людини та довкілля, тому обов’язково потребують знешкодження та утилізації. Відходи біотехнологічних виробництва, умовно можна розділити за агрегатним станом речовин: на тверді, рідкі та газоподібні відходи.

9.1 Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця утворення твердих, рідких та газоподібних відходів

Результати аналізу технологічної схеми виробництва кормової біомаси *Yarrowia lipolytica* S6 наведено в табл 9.1

Таблиця 9.1

Результати аналізу технологічної схеми виробництва кормової біомаси

Стадія технологічної схеми	Вид відходів	Висновок
ДР 1.2 Підготовка одягу	Картон Поліетилен Поліпропілен Зіпсований технологічний одяг та взуття Пральний порошок, у якого закінчився термін придатності	Ця стадія є місцем значного утворення відходів
ДР 1.3 Підготовка миючих та дезінфікувальних засобів	Картон Порожня тара Поліетилен	Ця стадія є місцем незначного утворення відходів

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля	Лім.	Арк.	Аркушів
Розроб.	Сидоренко М.Р.						117	136
Перевір.	Стабніков В.П.					Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

ДР 1.4 Підготовка приміщень	Використані мопи Відпрацьована вода Одноразові серветки Склобій Відпрацьовані розчини миючих та дезінфікуючих засобів	Ця стадія є місцем значного утворення значної
ДР 1.5 Підготовка обладнання та комунікацій	Відпрацьовані розчини миючих та дезінфікуючих засобів Відпрацьоване повітря Відпрацьована вода	Ця стадія є місцем значного утворення значної
ДР 2.2 Очищення повітря від грубих частинок	Фільтрувальні матеріали	Ця стадія є місцем незначного утворення значної
ДР 2.6 Очищення повітря в головному фільтрі	Фільтрувальні матеріали	Ця стадія є місцем незначного утворення значної
ДР 2.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Фільтрувальні матеріали	Ця стадія є місцем незначного утворення значної
ДР 3.1 Приготування 6%-го розчину НСІ	Склобій Пролиті хімічні речовини Зіпсовані розчини	Ця стадія є місцем незначного утворення значної
ДР 3.2 Приготування 6%-го розчину NaOH	Склобій Розсипані хімічні речовини Зіпсовані розчини	Ця стадія є місцем незначного утворення значної
ДР 4.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках	Зіпсована сировина Склобій Конденсат	Ця стадія є місцем незначного утворення значної

ДР 4.2 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 12 л	Зіпсована сировина Склобій Конденсат	Ця стадія є місцем незначного утворення значної
ДР 4.3 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л	Зіпсована сировина Конденсат	Ця стадія є місцем незначного утворення значної
ДР 4.4 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м ³	Зіпсована сировина Конденсат	Ця стадія є місцем незначного утворення значної
ДР 4.5 Приготування та стерилізація поживного середовища для промислового гультивування у ферментері об'ємом 10 м ³	Зіпсована сировина Конденсат	Ця стадія є місцем незначного утворення значної
ТП 5.1 Підтримання колекційної культури	Склобій Контаміновані пробірки з культурою	Ця стадія є місцем незначного утворення значної
ТП 5.2 Одержання робочої культури	Склобій Контаміновані пробірки з культурою	Ця стадія є місцем незначного утворення значної
ТП 5.3 Вирощування посівного матеріалу на агаризованих середовищах	Склобій Контаміновані чашки Петрі	Ця стадія є місцем незначного утворення значної
ТП 5.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалка	Склобій Контаміновані колби з поживним середовищем	Ця стадія є місцем незначного утворення значної
ТП 5.5 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 12 л	Відпрацьоване повітря Конденсат	Ця стадія є місцем незначного утворення значної

ТП 5.6 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л	Відпрацьоване повітря Конденсат	Ця стадія є місцем значного утворення значної
ТП 5.7 Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м ³	Відпрацьоване повітря Конденсат	Ця стадія є місцем значного утворення значної
ТП 6.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 10 м ³	Відпрацьоване повітря Конденсат	Ця стадія є місцем значного утворення значної
ТП 7 Виділення цільовго продукту	Супернатант культуральної рідини Відпрацьоване повітря	Ця стадія є місцем значного утворення значної

9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

9.2.1 Системи знешкодження рідких відходів

Рідки відходи, які утворюються під час процесу отримання біомаси *Yarrowia lipolytica* S6 складаються з:

- Відпрацьованих залишків мийних та дезінфікувальних засобів;
- Відпрацьованої води для ополіскування обладнання;
- Відпрацьованих залишків культуральної рідини після виділення біомаси;
- Відпрацьованої побутової води

Необхідно визначення режиму очищення стічних вод, який залежить від загальних витрат стічних вод. Для цього необхідно попередньо розрахувати середні витрати стічних вод, об'єм стічних вод на одиницю продукту та добову потужність підприємства.

Відпрацьованих залишків мийних та дезінфікувальних засобів

Миття резервуарів виробничого обладнання може здійснюватися 2 способами: як вручну, так і з використанням циркуляційної СІР-мийки. Використання 2 способу

дозволяє зменшити витрати мийного розчину до 20-30% від кожного з об'ємів обладнання, а також підвищити якість миття апаратури.

Відповідно до специфікації обладнання з курсового проектування з ємнісного обладнання маємо: інокулятор об'ємом 12 л, реактор-змішувач для приготування композиції А об'ємом 30 л, реактор-змішувач для приготування композиції Б об'ємом 30 л, інокулятор об'ємом 100 л, реактор-змішувач для приготування композиції А об'ємом 300 л, реактор-змішувач для приготування композиції Б об'ємом 300 л, збірник для сирого гліцерину об'ємом 20 л, посівний апарат об'ємом 1 м³, реактор-змішувач для змішування компонентів поживного середовища перед стерилізацією в УБС-28 об'ємом 5 м³, збірник для сирого гліцерину об'ємом 200 л, реактор-змішувач для приготування стерильного розчину HCl об'ємом 5 л, реактор-змішувач для приготування стерильного розчину NaOH об'ємом 5 л та ферментер об'ємом 10 м³.

Таким чином, геометричний об'єм ємнісного обладнання $V_{\text{ємностей}}$ буде дорівнювати сумі всіх об'ємів ємнісного обладнання:

$$V_{\text{ємностей}} = 12 \text{ л} + 30 \text{ л} + 30 \text{ л} + 100 \text{ л} + 300 \text{ л} + 300 \text{ л} + 20 \text{ л} + 1000 \text{ л} + 5000 \text{ л} + 200 \text{ л} + 5 \text{ л} + 5 \text{ л} + 10\,000 \text{ л} = 17\,002 \text{ л}$$

Для розрахунку приймемо, що в середньому витрати мийно-дезінфікуючих розчинів складатимуть 20 % від кожного з об'ємів обладнання, тоді об'єм мийно-дезінфікуючих розчинів $V_{\text{засобів}}$ становитиме:

$$V_{\text{засобів}} = 17\,002 \text{ л} * 0,2 = 3400,4 \text{ л}$$

Відпрацьована вода після ополіскування обладнання

Після використання мийно-дезінфікуючих розчинів обладнання необхідно прополоскати, для цього використовують 20-30% води від кожного з об'ємів обладнання. Тому, кількість води для ополіскування становить 3400,4 л. Тобто загальна кількість стічних вод, яка отримується після миття та ополіскування обладнання становить:

$$V_{\text{миття}} = 3400,4 \text{ л} + 3400,4 \text{ л} = 6800,8 \text{ л}$$

Об'єм стічних вод які утворюються на 1 т готового продукту

Відповідно до ТЕО після виробничого процесу отримуємо 4,25 м³ культуральної рідини з концентрацією абсолютно сухої біомаси 21,3 г/л. Варто зазначити, що після процесу сепарування отримують дріжджова суспензія з часткою вологи 70 %. Тобто, концентрація вологої біомаси в культуральній рідині буде становити: $C_{\text{вб}} = 21,3 \text{ г/л} * 100 \% / 30 \% = 71 \text{ г/л}$. Тоді, у 4,25 м³ культуральної рідини міститься 4250 л * 71 г/л = 301 750 г вологої біомаси.

Основою культуральної рідини є вода, тому кількість супернатанту $m_{\text{супернатанту}}$ складає:

$$m_{\text{супернатанту}} = 4\,250\,000 \text{ г} - 301\,750 \text{ г} = 3\,948\,250 \text{ г}$$

або

$$V_{\text{супернатанту}} = 3948,25 \text{ л}$$

Так, як готовим продуктом нашого виробництва висушена біомаса, то отриманий супернатант, буде стічними водами. З розрахунку можна зробити висновок, що за 1 виробничий цикл отримуємо 3948,25 л + 6800,8 л = 10 749,1 л стічних вод.

Згідно з ТЕО за виробничий цикл отримуємо 81,3 кг готового продукту. Тому, об'єм стічних вод які утворюються на 1 т готового продукту за пропорцією становить:

$$81,3 \text{ кг} - 10\,749,1 \text{ л}$$

$$1000 \text{ кг} - x \text{ л}$$

$$X = 132\,215,25 \text{ л або } 132,25 \text{ м}^3$$

Середня за добу витрата виробничих стічних вод $Q_{\text{в}}$

Згідно з ТЕО за 1 виробничий цикл, який складає 24 години, отримуємо 81,3 кг готового продукту. Тоді $n = 81,3 \text{ кг/добу} = 0,0813 \text{ т/добу}$.

$$Q_{\text{в}} = 132,25 \text{ м}^3/\text{т} * 0,0813 \text{ т/добу} = 10,75 \text{ м}^3/\text{добу}$$

Середня за добу витрата побутових стічних вод $Q_{п}$

На одну зміну, яка складає 12 годин, необхідно 10 людей (майстер зміни, 2 техніка-технолога з приготування, 2 слюсара-ремонтника, мікробіолог, прибиральник, хімік-аналітик та 2 оператора). Норму водовідведення приймаємо 0,025 м³/(зм люд) як для холодного цеху.

$$Q_{п} = 0,025 \text{ м}^3/(\text{зм люд}) * 10 \text{ люд} = 0,25 \text{ м}^3/\text{зміну}$$
$$(0,25 \text{ м}^3/\text{зміну} * 24 * 2) / 12 = 1 \text{ м}^3/\text{зміну}$$

Середня за добу витрата атмосферних стічних вод $Q_{а}$

Умовно можна прийняти у 5 разів меншу за витрати побутових стічних вод. Тому, кількість атмосферних стічних вод становитиме:

$$Q_{а} = 1 \text{ м}^3/\text{добу} / 5 = 0,2 \text{ м}^3/\text{добу}$$

Загальні витрати стічних вод, що утворилися на підприємстві $Q_{з}$

$$Q_{з} = 10,75 \text{ м}^3/\text{добу} + 1 \text{ м}^3/\text{добу} + 0,2 \text{ м}^3/\text{добу} = 11,95 \text{ м}^3/\text{добу}$$

Відповідно до проведених розрахунків загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві складають 11,95 м³/добу, що менше ніж 100 м³/добу, тому їх доцільно очищати в періодичному режимі за допомогою біологічного очищення.

Для вирішення цього завдання запропоновано використати Блочно-модульну локальну очисну споруду МакВохПро 15 з продуктивністю 15 м³/добу. Габаритні розміри якого становлять 2160×4000×2600 мм [89].



Рис. 9.1 БМЛОС «МакВохПро 15» [89].

Стічні води з підприємстві самоплином через трубопровід надходять до колодязя гасника. Далі вони потрапляють на стадію механічного очищення. Тут стічні води через сито звільняються від механічних домішок розміром більше за 5 мм. Затримані відходи періодично в ручному режимі видаляють [89].

Далі стічні води потрапляють в усереднювач. Там розміщується насос, який через певні проміжки часу здійснює рівномірну подачу стічних вод на біологічну очистку. Від компресора через аератори в усереднювач подається повітря з метою запобігання осадження завислих речовин [89]

На наступному етапі стічні води надходять в зону денітрифікації, де відбувається процес біологічного очищення в безкисневому режимі та перемішування за допомогою дискових аераторів, що розташовані на дні, для запобігання накопичення на дні осаду [89].

Після цього біологічне очищення проходить з додаванням кисню. В аеротенку відбувається процес сорбції, окиснення органічних речовин та нітрифікація. Обов'язково в процесі відбувається рециркуляція активного мулу, який надходить в зону денітрифікації за допомогою насосів. Також в аеротенку відбувається біологічне завантаження [89].

Далі отримані біологічно очищені стічні води подають у вторинний відстійник. Тут відбувається процес поділу мулової суміші на активний мул та воду. Активний мул повертають до зони денітрифікації. Вода далі потрапляє на стадію доочистки гіпохлоритом натрію в реакторі з подачею повітря. Після цього вона проходить піщано-гравітаційний фільтр, який промивають по мірі забруднення [89].

Надлишковий активний мул та біоплівку з реактора доочистки перекачують до аеробного стабілізатора. Далі вони надходять до блоку зневоднення осаду в гідрофобних мішках. Після зневоднення осад додатково підсушують [89].

9.2.2 Системи знешкодження газоподібних відходів

Під час культивування продуцента необхідно забезпечити повітрям з аерацією 1 об/об/хв. Відповідно буде отримано майже така сама кількість відпрацьованого повітря.

Загальний об'єм відпрацьованого повітря

Буде складатись з об'ємів відпрацьованого повітря стадій отримання посівного матеріалу та виробничого культивування.

$$Q_3 = (6,13 \text{ л} + 57,27 \text{ л} + 534,5 \text{ л} + 4500 \text{ л}) * 1 \text{ об/об/хв} * 60 * 16 \text{ год} = 4\,894\,080 \text{ л або } 4894,1 \text{ м}^3 \text{ відпрацьованого повітря за виробничий цикл}$$

Утворене відпрацьоване повітря буде містити в собі аерозоль клітин продуцента та краплинонос поживного середовища.

Для знешкодження такої кількості відпрацьованого повітря необхідно встановити фільтри для очищення та знешкодження повітря безпосередньо на ферментерах перед випуском повітря в атмосферу.

9.2.3 Системи знешкодження твердих відходів

При аналізі нашого виробництва можна передбачити наступні тверді відходи:

- Забруднені фільтри від системи підготовки аераційного повітря;
- Зіпсовані хімічні реактиви в яких вийшов термін придатності або вони були пролиті або розсипані;
- Залишки групових та первинних пакувальних матеріалів;
- Скlobій лабораторного посуду;
- Використані мопи та засоби індивідуального захисту;
- Зіпсований технологічний одяг та взуття.
- Залишки використаного агаризованого поживного середовища

Забруднені фільтри. На фільтрувальних матеріалах затримується пил та мікроорганізми, а на фільтрах для очищення відпрацьованого повітря - клітини продуцента. Тому використані фільтри піддають термічній обробці та передають іншим організаціям на утилізацію.

Непридатні хімічні речовини. Хімічні речовини в яких завершився термін придатності необхідно зберігати в спеціально відведеному місці в зіп-пакеті до моменту передачі іншим організаціям на утилізацію. Пролиті та розсипані реактиви необхідно зібрати в зіп-пакет за допомогою совка зі щіткою або одноразових серветок.

Залишки використаного агаризованого поживного середовища. Перед передачею іншим організаціям на знищення необхідно інактивувати в автоклаві.

Використані моти та засоби індивідуального захисту. Зберігати в сміттєвих пакетах до передачі спеціальним організаціям на утилізацію.

Зіпсований технологічний одяг та взуття. Зберігати в сміттєвих пакетах до передачі спеціальним організаціям на утилізацію.

Залишки групових та первинних пакувальних матеріалів. Сортують та зберігають у спеціально відведеному місці до передачі стороннім організаціям.

9.2.4 Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Розглянувши відходи, які утворюються на виробництві можна зробити висновок, що утворюється мало небезпечних відходів. Всі відходи можуть легко і з високою ефективністю перероблюватись при правильному підборі методів утилізації.

Для зменшення твердих відходів пропонується повторно використовувати пакувальні матеріали, а для зменшення рідких відходів пропонується впровадити системи очищення та рециркуляції води для інших технологічних процесів, таких як промивання та охолодження. Також можна використовувати конденсат, отриманий при випаровуванні, як додаткове джерело технічної води.

Обов'язково на виробництві необхідно впровадити систему ощадливого виробництва «Lean». Вона не вимагає капіталовкладень, але дає неймовірний результат. Це рішення впливатиме не тільки на ефективність виробництва, але і на його екологізацію.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Meat and Dairy Production. Our World in Data [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://ourworldindata.org/meat-production>
2. Moore M, Gould P, Keary BS. Global urbanization and impact on health. *Int J Hyg Environ Health* 2003, 206(5): 269-278 doi: 10.1078/1438-4639-00223
3. Patsios, S.I.; Dedousi, A.; Sossidou, E.N.; Zdragas, A. Sustainable Animal Feed Protein through the Cultivation of *YARROWIA Lipolytica* on Agro-Industrial Wastes and by-Products. *Sustainability*. 2020, 12: 1398. doi: 10.3390/su12041398
4. Jach ME, Serefko A, Ziaja M, Kieliszek M. Yeast Protein as an Easily Accessible Food Source. *Metabolites* 2022, 12(1): 63 doi: 10.3390/metabo12010063
5. Juszczak P., Rymowicz W., Kita A., Rywińska A. Biomass production by *Yarrowia lipolytica* yeast using waste derived from the production of ethyl esters of polyunsaturated fatty acids of flaxseed oil. *Industrial Crops and Products* 2019, 138: 111590 doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111590.
6. Bankar A., Kumar A., Zinjarde S. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009, 84(5): 847–865 doi: 10.1007/s00253-009-2156-8
7. Czech, A., Smolczyk, A., Ognik, K., & Kiesz, M. Nutritional Value of *Yarrowia Lipolytica* Yeast and its Effect on Growth Performance Indicators in Piglets. *Annals of Animal Science* 2016, 16(4): 1091-1100 doi: 10.1515/aoas-2016-0034
8. Дріжджі кормові (ДЛЯ ТВАРИН) порошок, 1 кг. TABLETKI.UA // [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/Дрожжи-кормовые/1049331/>
9. Turck D., Castenmiller J., Henauw S., Kearney J., Maciuk A., Mangelsdorf I. et al. Safety of *Yarrowia lipolytica* yeast biomass as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* 2019, 17(2): doi: 10.2903/j.efsa.2019.5594
10. Guardiola, F.A., Esteban, M.Á. & Angulo, C. *Yarrowia lipolytica*, health benefits for animals. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021, 105: 7577–7592 doi: 10.1007/s00253-021-11584-5

11. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс : Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.
12. About us Yarrowia Equinox [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://yarrowiaequinox.com/o-nas/>
13. Skotan [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://skotansa.pl/>
14. Equinox Classic. Yarrowia Equinox [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://yarrowiaequinox.com/product/equinox-classic/>
15. Equinox Calm. Yarrowia Equinox [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://yarrowiaequinox.com/product/equinox-calm/>
16. Equinox Muscle. Yarrowia Equinox [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://yarrowiaequinox.com/product/equinox-muscle/>
17. Canifelox puppy. Yarrowia Canifelox [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://yarrowiacanifelox.pl/en/produkt/puppy-2/>
18. Canifelox mobility. Yarrowia Canifelox [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://yarrowiacanifelox.pl/en/produkt/mobility-2/>
19. Masneuf-Pomarede I. and Neuveglise C. Yarrowia lipolytica Strains and Their Biotechnological Applications: How Natural Biodiversity and Metabolic Engineering Could Contribute to Cell Factories Improvement. *Journal of Fungi* 2021, 7(7): 548 doi: 10.3390/jof7070548
20. Dalcanton F., Michelon M., Furlong E., Burkert J. et al. Biomass production by Yarrowia lipolytica as a source of lipids: bench scale cultivation on raw glycerol-based medium. *International Food Research Journal* 2015, 22(3): 1253-1260.
21. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія // Підручник. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ. – 2010. – 632 с.
22. Lapsongphon, N., Rodtong, S., & Yongsawatdigul, J. Spent brewery yeast sludge as a single nitrogen source for fibrinolytic enzyme production of *Virgibacillus* sp. SK37. *Food Science and Biotechnology* 2013, 22(1), 71–78. doi:10.1007/s10068-013-0010-3

23. Claesson K. Effects of nutrients supplementation on fermentability of lignocellulosic hydrolysates under high gravity conditions. *Industrial Biotechnology* 2011. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://publications.lib.chalmers.se/records/fulltext/164835.pdf>
24. Soong Y., Liu, N., Yoon S., Lawton, C., & Xie, D. Cellular and Metabolic Engineering of Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica* for Bioconversion of Hydrophobic Substrates into High-Value Products. *Engineering in Life Sciences*. 2019, 19(6): 423 -443 doi: 10.1002/elsc.201800147
25. Ruiz-Herrera, J., García-Maceira, P., Castillo-Barahona, L.C. et al. Cell wall composition and structure of *Yarrowia lipolytica* transposon mutants affected in calcofluor sensitivity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2003, 84: 229–238 doi: 10.1023/A:1026007923908
26. Timoumi, A., Cléret, M., Bideaux, C. et al. Dynamic behavior of *Yarrowia lipolytica* in response to pH perturbations: dependence of the stress response on the culture mode. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017, 101: 351–366 doi: 10.1007/s00253-016-7856-2
27. Darvishi F. *Biotechnological Applications of the Yeast Yarrowia lipolytica*. Springer. 2014. 16p doi: 10.1007/978-3-319-06437-6
28. Barth G., Gaillardin C., *Physiology and genetics of the dimorphic fungus Yarrowia lipolytica/ FEMS Microbiology Reviews* 1997, 19(4): 219–237 doi: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x
29. *Microbe Guide: Yarrowia lipolytica*. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://microbialfoods.org/microbe-guide-yarrowia-lipolytica/>, Barth, G. *Yarrowia lipolytica*. Genetics, Genomics, and Physiology. *Microbiology Monographs* 2013, doi: 10.1007/978-3-642-38320-5
30. Çelik E., Çalık P., Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances* 2012, 30(5): 1108-1118. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.011.
31. *Mycobank Database*. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.mycobank.org/>

32. Кормові дріжджі для свиней: види, як правильно давати в домашніх умовах. Lifehacker // [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://lifehacker.org.ua/kormovi-drijdji-dlia-svinei-vidi-iaak-pravilno-davati-v-domashnih-umovah/>

33. Моніторинг стану галузей тваринництва. МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ ТА ПРОДОВОЛЬСТВА УКРАЇНИ // [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://minagro.gov.ua/napryamki/tvarinnictvo/analiz-ta-monitoring-stanu-galuzej-tvarinnictva>

34. АСУ назвала ТОП-55 найпотужніших свиного господарств України. Agravery // [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://agravery.com/uk/posts/show/asu-nazvala-top-55-najpotuznisih-svinogospodarstv-ukraini>

35. Кормові дріжджі: що це таке, з чого роблять, для чого і як давати коровам. Supermg.com // [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://ua.supermg.com/tvarini/15711-kormovi-drizhdzhi-shho-ce-take-z-chogo-robljat%D1%8C.html#i-2>

36. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Yarrowia lipolytica*. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/yli00010>

37. Paranikolao, S., Veopoulos A., Koletti A., Thévenieau F., Koutinas A.A., Nicaud J. Importance of the methyl-citrate cycle on glycerol metabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of biotechnology* 2013, 168(44): 303-314 doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.10.025

38. Citrate cycle (TCA cycle)- *Yarrowia lipolytica*. [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?yli00020

39. Glyoxylate and dicarboxylate metabolism- *Yarrowia lipolytica*. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/yli00630>

40. Biosynthesis of amino acids- *Yarrowia lipolytica*. [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?yli01230

41. Pentose phosphate pathway - *Yarrowia lipolytica*. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/yli00010>

42. Pyrimidine metabolism- *Yarrowia lipolytica*. [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?yli00240
43. Purine metabolism- *Yarrowia lipolytica*. [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?yli00230
44. Amino sugar and nucleotide sugar metabolism - *Yarrowia lipolytica*. [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?yli00520
45. Fructose and mannose metabolism - *Yarrowia lipolytica*. [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?yli00051
46. Starch and sucrose metabolism- *Yarrowia lipolytica*. [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?yli00500c
47. Gonçalves, F. A. G., Colen, G., & Takahashi, J. A. *Yarrowia lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry. *The Scientific World Journal* 2014, 1–14. doi:10.1155/2014/47620
48. Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова // Загальна біотехнологія : підручник. - Київ : НУХТ, 2009.
49. Which Impeller Is Right for Your Cell Line? [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://bioprocessintl.com/analytical/cell-line-development/which-impeller-is-right-for-your-cell-line-183538/>
50. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П. , Гуляєв В.М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.
51. Грегірчак Н.М. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Н.М.Грегірчак – К.: НУХТ, 2020. – 177 с.

52. Державний реєстр дезінфекційних засобів [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/Держреєстр%20деззасобів/10-11-2023/Реєстр%20деззасобів%20908.xlsx>

53. Засіб дезінфікуючий «Гуасепт (Guasept)» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://lysoform.ua/products/guasept-11/>

54. CIF Combined Cleaner and Disinfectant, 5 l, CIF "Pro Formula Safeguard" [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://repita.com/household-disinfectants-c3907/cif-combined-cleaner-and-disinfectant-5-l-cif-pro-formula-safeguard-p6441481#ref>

55. Засіб дезінфікуючий з мийною властивістю «Неомоскан РД-Н» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://aprofi-group.com/product/dezinficirujushhee-sredstvo-neomoscan-rd-n-24-kg-dr-weigert/>

56. Засіб мийний з дезінфікуючим ефектом «КлінДез 401 (Clean&Dez 401)» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.mpi-dpr.com.ua/en/content/clindez-401-methodical-instructions>

57. Засіб дезінфікуючий з мийними властивостями «Біонол» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://lysoform.ua/products/bionol/>

58. Каустична сода 25 кг [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://sata-group.com.ua/p1932841285-kausticheskaya-soda-granulirovannaya.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=CjwKCAjwrcKxBhBMEiwAIVF8rKBGTPGkwvjHaXJRA0SH1TVHcbkCnGUH8N-uoKVX5-S8LeQzrYf2QxoCHwAQAvD_BwE

59. Засіб дезінфекційний «Скінман Софт Протект ФФ(Skinman Soft Protect FF)» [Електронний ресурс] / Режим доступу: https://dezplus.com.ua/catalogue/disinfection/antiseptis/skinman_soft_protect_ff.html

60. Засіб дезінфекційний «АХД 2000 ультра» [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://lysoform.ua/products/ahd-2000-ultra/>

61. Патент України на винахід № 95494, СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІОМАСИ КАРОТИНОВМІСНИХ КОРМОВИХ ДРІЖДЖІВ / Стефанишин О.М., Гураль С.В., Камінська М.В., Борецька Н.І., Цепко Н.І., Опубл. 25.12.2014, Бюл.№ 24

62. GEA Westfalia Nozzle Separator // Steephillequipment [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://www.steephillequipment.com/listings/4045247-used-gea-westfalia-nozzle-separator>

63. Відцентрова розпилювальна сушарка LPG-2000 // Griffinmachinery [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://www.griffinmachinery.com/uk/відцентрова-розпилювальна-сушарка/>

64. Поліпропіленові мішки 5 кг // Dendipack [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://dendipack.com/g112202134-polipropilenovye-meshki>

65. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.

66. Біологія клітин [Електронний ресурс]. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навчання / уклад.: В.О. Красінько, І.М. Волошина. – К.: НУХТ, 2014. – 147 с.

67. Csutak, O., Corbu, V., Stoica, I., Ionescu, R., & Vassu, T. Biotechnological Applications of *Yarrowia lipolytica* CMGB32. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 2015, 6: 545–553 doi:10.1016/j.aaspro.2015.08.083

68. GRAVIMETRIC ANALYSIS // TDMUV [Електронний ресурс] Режим доступу: https://tdmuv.com/kafedra/internal/pharma_2/classes_stud/en/pharm/prov_pharm/ptn/analytical%20chemistry/2%20course/13%20Gravimetric%20analysis.htm

69. Carsanba E., Papanikolaou S., Fickers P., Erten H. Lipids by *Yarrowia lipolytica* Strains Cultivated on Glucose in Batch Cultures. *Microorganisms* 2020, 8(7): doi: 10.3390/microorganisms8071054

70. Laboratory Protocols: Determination of Biomass Concentration by Dry Weight Method // The Department of Biosciences and Bioengineering: Indian Institute of Technology Guwahati [Електронний ресурс] Режим доступу:

https://www.iitg.ac.in/biotech/index_post.php?name=Laboratory-38.%20Protocols&page=4f63ca7a47331084d8960e068615de3c949da4de

71. Ваги аналітичні A&D HR-250AG (HM3 252 г, д. 0.0001 г, платформа Ø90 мм) // Venta Lab [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ventalab.ua/vagi-analitichni-hr-250ag-ngz-252-g-d.-00001-g-platforma-90-mm/>

72. Kuhn, J., Müller, H., Salzig, D., & Czermak, P. A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* 2015, 18(3): 252–255. doi:10.1016/j.ejbt.2015.01.005

73. Szymanowska-Powalowska, D. The effect of high concentrations of glycerol on the growth, metabolism and adaptation capacity of *Clostridium butyricum* DSP1 *Electronic Journal of Biotechnology* 2015, 18(2):128–133. doi:10.1016/j.ejbt.2015.01.006

74. Aßkamp, M.R., Klein, M. & Nevoigt, E. *Saccharomyces cerevisiae* exhibiting a modified route for uptake and catabolism of glycerol forms significant amounts of ethanol from this carbon source considered as ‘non-fermentable’. *Biotechnol Biofuels* 2019, 12(257): doi:10.1186/s13068-019-1597-2

75. Schmidt, R. A., Wiebe, M. G., & Eriksen, N. T. Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnology and Bioengineering* 2005, 90(11): 77–84. doi:10.1002/bit.20417

76. Rhine ED, Sims GK, Mulvaney RL, Pratt EJ Improving the berthelot reaction for determining ammonium in soil extracts and water. *Soil Sci Soc Am J* 1998, 62: 473–480 doi: 10.2136/sssaj1998.03615995006200020026x

77. Кравченко О. О. Зберігання та контроль якості кормів : конспект лекцій / О. О. Кравченко. – Миколаїв : МНАУ, 2016. – 112 с

78. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Харчова хімія» для студентів всіх форм навчання спеціальності 181 «Харчові технології» Ч.1. / укладачі Назарко І.С., Покотило О. С. / Тернопіль: ТНТУ, 2020. 64

79. ISO 6496:1999 Animal feeding stuffs — Determination of moisture and other volatile matter content [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/12871/91b7a9edbb24407296cc90b6c8f2b4e1/ISO-6496-1999.pdf>

80. Сушильна шафа Memmert UN260plus, універсальна // Ventalab [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://ventalab.ua/sushilna-shafa-memmert-un260plus-universalna-twindisplay-256-l/>

81. MichalikB., BielW., LubowickiR., and JacynoE.. Chemical composition and biological value of proteins of the yeast *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol. Canadian Journal of Animal Science. 94(1): 99-104. <https://doi.org/10.4141/cjas2013-052>

82. AOAC Official Method 2001.11 Protein (Crude) in Animal Feed, Forage (Plant Tissue), Grain, and Oilseeds Block Digestion Method Using Copper Catalyst and Steam Distillation into Boric Acid First Action 2001. AOAC INTERNATIONAL, 2002 [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://img.21food.cn/img/biaozhun/20100108/177/11285182.pdf>

83. NDA 702 Dumas Nitrogen Analyzer // Velp [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://www.velp.com/en-ww/nda-702-dual-carrier-gas-dumas-nitrogen-analyzer.aspx>

84. ISO 5984:2022 Animal feeding stuffs — Determination of crude ash [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/77807/f18b40dac68e413499c626808840cc12/ISO-5984-2022.pdf>

85. Піч муфельна СНОЛ 8,2/1100 // Spectrolab [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://spectrolab.com.ua/ua/p18553058-pech-mufelnaya-snol.html>

86. ISO 6492:1999 Animal feeding stuffs — Determination of fat content [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/12865/1077661e3bec4ae1ad00884509224224/ISO-6492-1999.pdf>

87. Екстрактор Сокслета // Pervak [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://www.pervak.net/ekstraktor-soksleta/>

88. Вакуумна сушильна шафа СВ-80 // Spectrolab [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://spectrolab.com.ua/ua/p27470570-vakuumnyj-sushilnyj-shkaf.html>

89. Блочно-модульні локальні очисні споруди «МакВохПро» [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://aquapolymer.com.ua/produktsiya/station-biologichnogo-ochyshhennya/makboxpro/>