

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 СТАБНІКОВ
“ 01 ” березня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КОРОЛЕНКО Богдана Володимирівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Yarrowia lipolytica* для одержання ферменту ліпази

керівник роботи д.т.н., проф. СТАБНІКОВ Віктор Петрович,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи Перед початком роботи було проаналізовано 44 вихідних джерела, робота є представленою через аналіз та опрацювання різної літератури: нормативно- та науково-технічної – для покращення описаних раніше шляхів культивування та біосинтезу ліпази *Yarrowia lipolytica*, штаму IMUFRT 50682.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) У роботі було розглянуто характеристику цільового продукту – ліпази, обґрунтовано вибір конкретного штаму, на основі якого в подальшому було здійснено техніко-економічне обґрунтування доцільності та актуальності подібного культивування та біосинтезу в Україні. Також наведено обґрунтування до графічної частини та специфікацію обладнання до апаратурної схеми. Окремим розділом було винесено методи контролю подібного виробництва та його екологічну безпечність, розроблено системи охорони довкілля.

5. Перелік графічного матеріалу У роботі наведені технологічна та апаратурна схеми культивування *Yarrowia lipolytica* для одержання ферменту ліпази

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	Підготовка та пошук інформації за темою кваліфікаційної роботи	01.03.24 – 10.03.24	
2	Аналіз та упорядкування інформації	12.03.24 – 15.03.24	
3	Початок написання пояснювальної записки	17.03.24 – 21.03.24	
4	Робота з системами САПР для оформлення графічної частини роботи	22.03.24 – 02.04.24	
5	Виправлення помилок у графічній частині, відповідно до зауважень керівника	05.04.24 – 10.04.24	
6	Пошук додаткової інформації та її упорядкування	12.04.24 – 15.04.24	
7	Подання кваліфікаційної роботи на перевірку керівнику	16.04.24	
8	Виправлення помилок у пояснювальній записці, наведених керівником	20.04.24 – 30.04.24	
9	Оформлення презентації до кваліфікаційної роботи, подача її на перевірку керівнику	12.05.24 – 20.05.24	
10	Фінальний етап виправлення зауважень, отриманий на попередньому захисті кваліфікаційної роботи	28.05.24	

Здобувач _____
(підпис)

Богдана Короленко _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Віктор Стабніков _____
(ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	6
ABSTRACT	7
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	9
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	13
<i>Підрозділ 2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування</i>	13
<i>Підрозділ 2.2. Розрахунок складу поживного середовища</i>	21
<i>Підрозділ 2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента</i>	23
<i>Підрозділ 2.4. Таксономічний статус біологічного агента</i>	24
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	25
<i>Підрозділ 3.1. Потреба у цільовому продукті</i>	25
<i>Підрозділ 3.2. Розрахунок потужності виробництва</i>	26
<i>Підрозділ 3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів</i>	26
<i>Підрозділ 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу</i>	27
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	30
<i>Підрозділ 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента</i>	30
<i>Підрозділ 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт</i>	32
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.	36
<i>Підрозділ 5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.</i>	36
<i>Підрозділ 5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.</i>	37
<i>Підрозділ 5.2. Обґрунтування стадій післяферментаційного виділення цільового продукту.</i>	38
<i>Підрозділ 5.4. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів.</i>	41
<i>Підрозділ 5.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища</i>	46
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання	48
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.	51
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	60
<i>Підрозділ 8.1. Карта постадійного контролю.</i>	60
<i>Підрозділ 8.2. Мікробіологічний контроль</i>	67
<i>Підрозділ 8.3. Показники синтезу цільового продукту – ліпази – шляхом визначення її активності</i>	68
<i>Підрозділ 8.5. Показники якості готового продукту.</i>	70
РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля	72

<i>Підрозділ 9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів</i>	<i>72</i>
<i>Підрозділ 9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва</i>	<i>74</i>
ЛІТЕРАТУРА	80

РЕФЕРАТ

Представлена кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня бакалавра є представленою через аналіз та опрацювання різної літератури: нормативно- та науково-технічної – для покращення описаних раніше шляхів культивування та біосинтезу ліпази *Yarrowia lipolytica*, штаму W-29. Також присутній аналіз та обґрунтування вибору біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування можливого виробництва, можливих стадій культивування та виробничого біосинтезу цільового продукту, санітарної підготовки виробництва, миючих та дезінфікуючих засобів, що можуть використовуватися; в окремому пункті описані схеми екологізації виробництва, враховуючи утилізацію відпрацьованих газоподібних відходів та твердих відходів, стічних вод, та води, що використовувалася для приготування розчинів миючих засобів. Наведено таблиці зі специфікацією обладнання для проєктуємого виробництва та його карта контролю.

Робота складається зі вступу, 9 (дев'яти) розділів та списку використаної літератури.

Загальний обсяг роботи – 85 сторінок, 11 рисунків, 9 таблиць, 44 посилання на джерела.

Ключові слова: ліпаза, *Yarrowia lipolytica* W-29, виробничий біосинтез, нормативно-технічна документація, охорона довкілля.

					НУХТ БТЕК 04.03.06 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Короленко Б.В.				РЕФЕРАТ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Стабніков В.П.						4	76
						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

ABSTRACT

The presented qualifying work for obtaining a bachelor's degree is presented through the analysis and processing of various literature: regulatory, scientific and technical – for the improvement of the previously described ways of cultivation and industrial biosynthesis of lipase produced by *Yarrowia lipolytica*, strain W-29. In this work one can also find analysis and justification of the choice of biological agent, technical and economic justification of possible industrial production, possible stages of cultivation, and production biosynthesis of the target product; sanitary preparation of equipment and personnel which could be involved, detergents and disinfectants that could be used. One can also find a few clauses in which charts for greening production are described, taking into account the disposal of spent gaseous waste and solid waste, sewage, and water used for the preparation of detergent solutions. Tables with the specification of equipment for project production and its control map are also provided in this work and signed respectively.

The work consists of an introduction, 9 (nine) chapters and a list of used literature.

The total volume of the work is 76 pages, 11 pictures, 9 charts, 44 references to sources.

Key words: lipase, *Yarrowia lipolytica* W-29, industrial biosynthesis, regulatory and technical documentation, environmental protection.

ВСТУП

За останні 10 років вийшло багато цікавих досліджень сфокусованих на різних аспектах *Yarrowia lipolytica*: дослідження цього організму як представнику класу сахароміцетів, як представнику виду аскомікотових дріжджових грибів, так і щодо різних штамів чи продуктів. За ці роки дослідникам вдалося виявити деякі аспекти які будуть описані більш детально у наступних розділах, проте наразі важливо зазначити одну з особливостей *Y.lipolytica*, на основі якої базується ця робота [1, 2].

Організм є диморфним і здатним до продукування двох дуже рідких продуктів: лимонної кислоти та ліпази, залежно від умов культивування. Особливу увагу дослідники приділяють культивуванню ліпази, оскільки потреба в ній завжди є актуальною. Ліпази, як і ряд інших ферментів, активно застосовуються у біотехнологіях (харчових, фармацевтичних), знайшли своє місце в лабораторних дослідженнях та, як не дивно, в повсякденному житті людей не дотичних до науки взагалі – ліпази є частиною великої кількості мийних ферментних засобів [3, 6, 11].

У самій роботі буде детальніше проаналізовано описані можливості культивування ліпази, особливо ґрунтуючись на дослідження Гонкалвес та ін., які виявили, що *Y.lipolytica* може рости на стічних водах виробництв різних олій (оливкової, соняшnikової, пальмітинової), що в подальшому може призвести до екологізації цих виробництв, та індустрії в загальному. Будуть розглянуті можливості культивування ліпаз технічних для виготовлення ферментних очисних засобів на основі композиції ферментів, для забезпечення відносної дешевизни такого експериментального проєкту.

					НУХТ БТЕК 04.03.06 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Короленко Б.В.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В.П.					6	85
Н. Контр.					Кафедра БТМ			
Затверд.		Стабніков В.П.						

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

Ліпаза (гідролази складного ефіру триацилгліцерину КФ 3.1.1.3) – це позаклітинна ендопептидаза, що здатна каталізувати процес гідролізу жирів. Найтипівішими представниками, з яких його продукують є вид *Yarrowia lipolytica*, що відноситься до класу *Saccharomycetes*, також відомий як *Candida lipolytica*.

Використання ліпаз продукованих *Y. lipolytica* постає доволі різноманітним через їх здатність до гідролізу ліпідів. Так, можливість Lip2p позитивно впливати на засвоєння довголанцюгових тригліцеридів при кислих значеннях рН у присутності жовчних солей, робить її одним із варіантів для замісної терапії зовнішньої секреції підшлункової залози. Більш того, деякі модифіковані штами і зовсім можливо використовувати, як фермент для каталізу реакції переетерифікації тригліцеридів [1,10].

Yarrowia lipolytica – це перспективний варіант збільшення ринку виготовлення ліпаз для біотехнології, але на цьому його можливості не вичерпуються. Подальші дослідження вже довели можливість продуцентів цього організму використовувати його як повсякденну харчову добавку задля полегшення роботи шлунку та покращення засвоєння їжі.

Хоч раніше її використання у біотехнології здебільшого обмежувалося виготовленням сиру Рокфор, час на місці не стоїть, і вже скоро більше і більше дослідників почали звертати свою увагу на дану ліпазу. Її потенціал розкривається у багатьох галузях [11].

					НУХТ БТЕК 04.03.06 КР ПЗ		
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Короленко Б.В.			Розділ 1. Характеристика цільового продукту		
Перевір.		Стабніков В.П.					
						7	85
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.					

Так, у деяких роботах зазначається, що Lip2 – це чудовий біокаталізатор для збагачення олій докозагексаєновою кислотою, яка в свою чергу є одною із найважливіших омега-3 жирних кислот. Як і більшість омега-3 жирів, він пов'язаний із багатьма перевагами для здоров'я, але його потенціал та легкість виробництва може бути збільшено за допомогою *Y. lipolytica*. До того ж у роботах розкривалася тема використання як олії сардини, так і водоростей, що є чудовою можливістю збільшити ринок саме веганських біодобавок [9].

Дослідження вивільнення омега-3 жирних кислот шляхом м'якого ферментативного гідролізу з використанням різних іммобілізованих ліпаз показало, що ферментативний шлях є привабливою альтернативою звичайним хімічним підходам, оскільки його можна проводити у м'яких умовах. Крім того вибірковість ферментів чудово допомагає уникати утворення небажаних побічних продуктів [6, 9].

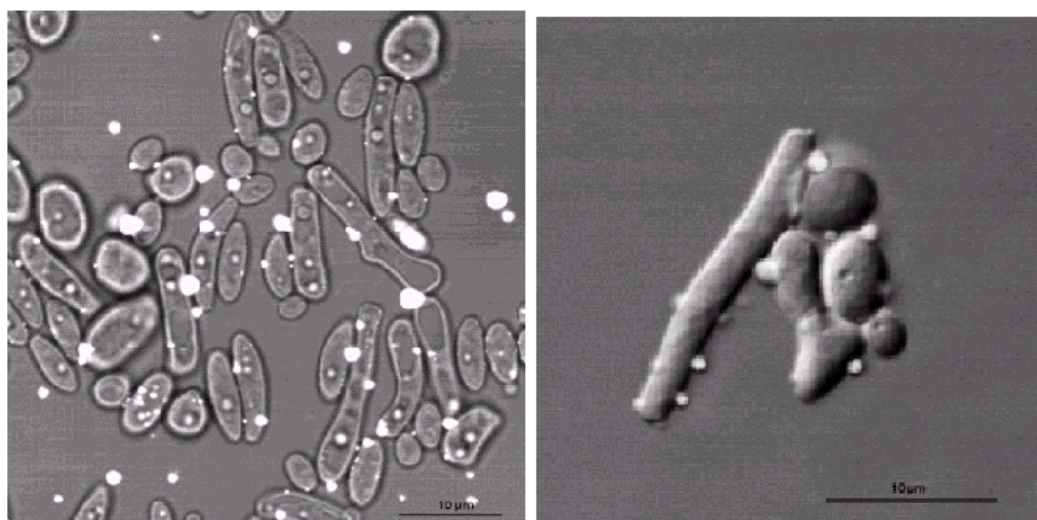


Рис.1.1. Мікроскопічні спостереження адсорбції крапель масляної фази поверхнею клітин *Yarrowia lipolytica*, що були вирощені на метилріцінолеаті [9].

Ще однією безсумнівною перевагою використання ферментів є те, що при одержанні кожної омега-3 жирної кислоти ми маємо чисті зразки, що знижує витрати на відділення ейкозапентаєнової кислоти від докозагексаєнової кислоти. На разі їх майже неможливо відокремити, через

дуже схожі фізичні властивості цих сполук. А дослідження біокатализатора у вигляді ліпази *Y. lipolytica*, що була іммобілізована на гідрофобних пористих носіях показує 7-кратне збільшення активації олій та підкреслено високу селективність щодо ейкозапентаєнової кислоти [10, 11].

Висока специфічність ліпаз *Y. lipolytica* є також чудовим розчинником певних субстратів для їх подальшого розділення або ж повної утилізації. Наприклад, проміжних продуктів біосинтезу, що є доволі токсичними та шкідливими. Так, до прикладу, на разі *Y. lipolytica* ефективно використовується для розділення різноманітних естерів третинних карбонових кислот, оскільки було встановлено, що фермент є високоселективним у гідролізі лише одного ізомеру із суміші енантіомерів [10, 13]. Або ж, за іншими джерелами, його використовують для розщеплення етилових ефірів, ряду ацетилових кислот, естерів, октанів та октанолів [9, 11].

Також це фермент є цікавим для виробництва біопалива завдяки каталізу соєвої олії у дві стадії за допомогою ліпази *Y. lipolytica*, який складався з гідролізу з наступною етерифікацією [14]. На думку авторів, ферментативні шляхи є більш привабливими, оскільки можуть бути розроблені без розчинників на основі гліцерину. Так, вони мають бути більш безпечними та екологічно чистими, оскільки вони не будуть включати органічні розчинники [15].

Отже, даний фермент є доволі широкоформатним та покриває велику кількість галузей. Його подальше вивчення може призвести до більш здорового та чистого майбутнього, оскільки він є як чудовою альтернативою для синтезу біопалива, так і харчовою добавкою.

Також ліпази є привабливим варіантом задля більш екологічного та «чистого» синтезу біоенергетичного палива [11].

Компанією, що займається реалізацією даного ензима є Amano's Enzyme під назвою Amano N-AP, на цьому ринку вони є монополістами [12]. І хоча комерційний потенціал ліпази *Yarrowia lipolytica* у біотехнології все ще високий та актуальний, її «дикий» штам має ряд недоліків, що змушує компанії або відкинути ідею її продукування, або звернутися до мутованих штамів, яких на разі існує доволі небагато. До цих недоліків належать: наявність протеаз, нестабільність, що унеможливорює довге зберігання та втрата властивостей при температурах вище 40°C [13]. Дослідники займаються вирішенням даної проблеми, наприклад, було виведено певні варіації більш стабільного характеру за допомогою таких методів, як розділення та очистка або іммобілізація [13, 14]. Це є ключовою можливістю зробити ліпази більш комерційно вигідними та привабливими.

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента

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

Yarrowia lipolytica постає не єдиним, але доволі перспективним та найбільш вигідним біологічним агентом для вирощування ліпази. Його ефективність доведено великою кількістю різних робіт, які розглядали його як у порівнянні з іншими мікроорганізмами, наприклад, *Candida rugosa* або *Candida cylindracea* (до речі, саме через цей біологічний агент раніше і називали *Candida lipolytica*) – так і між різними штамми самої *Y. lipolytica*, задля визначення найбільш привабливого методу іммобілізації, обробки, культивування тощо [16].

Дуже важливим як для використання у біотехнології, так і з екологічної точки зору є можливість *Y. lipolytica* рости на відходах виробництв оливкової та пальмової олій. Так, було виявлено, що штам *Y. lipolytica* ATCC20255 здатний знижувати початкове значення хімічної потреби в кисні (далі ХПК) з початковим значенням у 146 г/л на 80% протягом 24 год, що супроводжувалося збільшенням його біомаси до 23 г/л, але, на жаль, разом із тим було зафіксовано наявність великої кількості фенолів – 200 мг/л [17]. Дослідники пов'язують вироблення ліпази (у цій роботі було зафіксовано саме 770 од/л через 24 години): вільної та зв'язаної – з розпадом жиру. Окрім вище зазначених фенолів, інші штами також можуть виробляти деякі інші побічні продукти, наприклад, лимонну кислоту [16, 17].

У своїй роботі Гонкалвес та інші повідомили про виробництво ліпази у кількості 3500 од/л у середовищі з добавками, показуючи, що штам W29 можна використовувати для збільшеного виробництва ліпази з відходів виробництва оливкової олії [18].

					НУХТ БТЕК 04.03.06 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Короленко Б.В.						11	85
Перевір.	Стабніков В.П.							
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							
						Кафедра БТМ		

Не дивлячись на те, що спочатку вирощування ліпази реалізовувалося лише на вільних клітинах, вже у 2009 стало можливо використовувати іммобілізовані штами, наприклад, для вирощування на алгальній олії. Також у цій же роботі, було розкрито питання швидкості деградації ХПК результату, іммобілізовані клітини показали вищу швидкість аніж вільні. Цей результат також був підкріплений можливістю іммобілізованих клітин повторно використовуватися (до 12 циклів), що дає можливість набагато зменшити витрати [19].

W29 також відомий штам за своїми високими показниками продуктивності на залишках виробництва пальмової олії – 11 тис. од/л [19].

У таблиці 2.1 продемонстровані деякі із штамів *Y. lipolytica* та їх продукції ліпази. Проте варто зазначити, що склад стічних вод заводів з виробництва оливкової олії буде різним, це прописано окремо у таблиці 2.1. Так само варує зазначити і той факт, що склад для вирощування не буде однаковим при розрахунку його собівартості. Деякі із цих штамів були вирощені задля подальшого використання у лікарських засобах або у якості біодобавок, тобто будуть чистішими, проте дорожчими для культивування.

Провівши аналіз даних із таблиці 2.1, можемо скласти умовний розрахунок вартості середовищ для вирощування агенту. Його наведено у таблиці 2.2. Як було вже зазначено вище, буде відслідковуватися сильний розрив у цінах для 1 г ліпази. Оскільки в українських пост-воєнних реаліях буде відігравати більшу роль нарощування економіки та безвідходне виробництво, то більш детально у подальших розділах розглянемо саме дешевші варіанти для виробництва технічної ліпази на основі стічних вод заводу з виробництва оливкової олії. Хоча Україна і не є провідною країною для вирощування оливок, проте ліпази проявляють можливість рости на середовищах, що містять тригліцериди. Тобто, в теорії, ми отримаємо схожі результати при спробах повторити експеримент вже на соняшниковій олії. Проте без експериментальної основи, наводити чіткі цифри і відмінності

важко. Підведемо підсумки у таблиці 2.3, де буде зазначено найпривабливіший варіант та найменш привабливий.

Таблиця 2.1.

Порівняльна характеристика продукції ліпази різними штамами *Yarrowia lipolytica*

Штам	Склад поживного середовища, г/л	Ліпаза, од/л	Умови культивування	Література
W29	СВЗВОО ¹ – 42 г/л; Амоній сульфат – 6 г/л; ДЕ – 1 г/л;	49...78	96 годин при температурі 25°C, рН = 6,4, корегується під час культивування	Lopes M, Araujo C, Aguedo M, Gomes N, Goncalves C, Teixeira J, et al. The use of olive mill wastewater by wild-type <i>Yarrowia lipolytica</i> strains: medium supplementation and surfactant presence effect by increased air pressure. J Chem Technol Biotechnol 2009;84:533–7.
IMUFRT 50682	СВЗВОО ¹ – 42 г/л; Амоній сульфат – 6 г/л; ДЕ – 1 г/л;	16...27	96 годин при температурі 25°C, рН = 6,4, корегується під час культивування	Lopes M, Araujo C, Aguedo M, Gomes N, Goncalves C, Teixeira J, et al. The use of olive mill wastewater by wild-type <i>Yarrowia lipolytica</i> strains: medium supplementation and surfactant presence effect by increased air pressure. J Chem Technol Biotechnol 2009;84:533–7.

Закінчення таблиці 2.1

DSM 3286	Оливкова олія – 10 г/л; ДЕ – 2 г/л; КН ₂ РО – 0,5 г/л; К ₂ НРО ₄ – 0,5 г/л; MgSO ₄ •7H ₂ O – 0,5 г/л; CaCl ₂ – 0,1 г/л; NaCl – 0,1 г/л;	~ 100	24 години при температурі 29°C, рН = 7, корегується під час культивування	Farshad Darvishi, Iraj Nah Hamid Zarkesh-Esfahani and Fariborz Momenbeik, et.al. Effect of Plant Oils upon Lipase and Citric Acid Production in <i>Yarrowia lipolytica</i> Yeast J Biomed Biotechnol. 2009;2009:562943
WSH-Z06	ДЕ – 20 г/л; Пептон ферментативний – 10 г/л; MgSO ₄ •7H ₂ O – 0.5 г/л; КН ₂ РО ₄ – 1 г/л; NaOH – 4 г/л;	50...80	48 годин при температурі 27°C, рН = 5,5, корегується під час культивування	Zongzhong Yu, Guocheng Du, Jingwen Zhou, Jian Chen Enhanced α -ketoglutaric acid production in <i>Yarrowia lipolytica</i> WSH-Z06 by an improved integrated fed-batch strategy 2012;114: 0960-8524.
IMUFRJ 50682	СВЗВОО ² – 53 г/л; Хлорид амонію – 10...15% від загальної маси СВЗВОО ² ;	32...53	100 годин при температурі 27°C, рН корегується під час культивування	Goncalves C, Lopes M, Ferreira J, Belo I. Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeast. Bioresour Technol 2009;100:3759–63.

Примітка. «СВЗВОО» – стічні води заводу з виробництва оливкової олії, цифра у правому верхньому куту аббревіатури показує, що стічні води бралися із різних заводів, тобто хімічний склад може незначною мірою відрізнятися; «ДЕ» – дріжджовий екстракт.

Вартість поживних середовищ для культивування

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)*
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
W29	СВЗВОО ¹	42	0*	0**	-
	Амоній сульфат	6	52	0,312	1
	ДЕ	1	1100	1,1	2
	Вартість 1 л середовища – 1,41 грн				
IMUFRT 50682	СВЗВОО ¹	42	0*	0**	-
	Амоній сульфат	6	52	0,321	1
	ДЕ	1	1100	1,1	2
	Вартість 1 л середовища – 1,41 грн				
DSM 3286	Оливкова олія	10	220	2,2	1
	ДЕ	2	1100	2,2	2
	K ₂ HPO ₄	0,5	124	0,062	3
	MgSO ₄ •7H ₂ O	0,5	82	0,041	3
	CaCl ₂	0,1	70	0,007	2
	NaCl	0,1	180	0,018	3
	Вартість 1 л середовища – 4,53 грн				

WSH-Z06	ДЕ	20	1100	1,1	2
	Пептон ферментативний	10	1320	13,2	4
	MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5	82	0,041	3
	KH ₂ PO ₄	1	124	0,124	3
	NaOH	4	110	0,44	2
	Вартість 1 л середовища – 14,9 грн				
IMUFRT 50682	СВЗВОО ²	53	0*	0**	-
	Хлорид амонію	5,3***	60	0,318	3
	Вартість 1 л середовища – 0,32 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на березень 2023 р.; ** – даний компонент є відходом виробництва, тобто купівлі/продажі не підлягає, проте може в подальшому використовуватися на побічних цехах виробництва; *** – число було розраховано на основі даних із попередньої таблиці, тобто маса амоній хлориду взята за 10% від загальної маси СВЗВОО. 1 – <https://rozetka.com.ua>; 2 – <http://prom.ua>; 3 – <https://klebrig.com.ua>; 4 – <https://www.systopt.com.ua>.

Так, виходячи із проаналізованої інформації, видно, що штам W29 (0,028 грн/г) виявляє помітно приємні – з економічної точки зору – результати. Розглядаючи його пробу, взяту із стічних вод першого заводу, він не сильно поступається штаму WSH-Z06 (0,029 грн/г), а й навіть виграс. Хоча вартує відмітити, що чистота останнього буде значно вищою, оскільки він був вирощений при ідеальних лабораторних умовах [20]. Проте нас цікавить також інший результат штаму IMUFRT 50682, вирощеного на стічних водах із другого заводу, оскільки його вартість на грам становить рекордні 0,01 грн/г – найнижчий показник серед представлених.

**Умовна вартість 1 г поверхнево-активних речовин, синтезованих
на суміші ростових субстратів (перерахунок)**

Штам <i>Yarrowia lipolytica</i>	Концентрація ліпази у ПС, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної ліпази за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
IMUFRT 50682	27	96	1,17	1,41	0,088
IMUFRT 50682	53	100	0,32	0,32	0,01
W29	78	96	0,51	1,41	0,028
DSM 3286	100	24	4,1	4,53	0,045
WSH-Z06	500	48	10,4	14,9	0,029

І хоча показник синтезу ліпази за годину у штаму W29 не із найкращих – всього 0,51 г/год (поки у його прямого конкурента – штаму WSH-Z06 це число є найвищим серед усіх представлених, а саме 10,4 г/год), як і його чистота, візьмемо його за кінцевий біологічний агент, оскільки на далі буде розглянута саме технічна ліпаза, вироблена на побічному цеху умовного виробництва олії. Таким чином ми відійдемо від ідеально чистої ліпази, проте розглянемо можливість саме додаткового прибутку виробництва, а не його основний дохід.

Також штам W29 є одним із найкращий штамів задля накопичення білків у своїх клітинах, за рахунок інактивації протеаз, що в подальшому може позитивно вплинути на засвоєння ним триглицеридів [21]. Як, до прикладу це робить мікросомальний транспортний білок для перенесення

тригліцеридів, після уживання якого засвоєння організмом вищих жирів відбувається у набагато швидше та ефективніше [22].

Також було обрано підхід до синтезу саме технічної ліпази для мийних засобів, як одного із небагатьох екологічно безпечніших варіантів їх виготовлення. За собою це також тягне і екологічність самих фабрик по виготовленню соняшникової олії, оскільки це робить виробництво на крок ближче до безвідходного, ба більше, як зазначено вище, у результаті можливе отримання додаткового прибутку.

Варто зазначити, що роботи, на основі яких побудовані розрахунки та теоретичні тези наведені тут, розглядали ліпазу синтезовану з відходів виробництв оливкової та пальмітинової олій. Проте це не є критичним, оскільки показники ХПК серед цих олій та їх порівняння з соняшниковою, показали невелике розходження, яке, тим не менш, вартує докладніше перевірити на практиці.

Підрозділ 2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Розрахунок складу поживного середовища (далі ПС) для вирощування штаму *Yarrowia lipolytica* W29 – продуценту ліпази при тривалості культивування у 96 годин, концентрації ліпази у ПС становила 78 одиниць активності на літр. За умови, що в технічному препараті в середньому це число має становити 2 тис. од.акт/л на 1 грам, для подальших розрахунків буде прийнято умовне число у 100 г.

Потреби для синтезу ліпази. Отже, за джерело вуглецю візьмемо тригліцериди, що наявні у стічних водах заводу з виробництва оливкової олії, оскільки дані значення приводилися у статті саме для неї. Для початку потрібен розрахунок кількості вуглецю у 100 г ліпази.

За формулою $C_{45}H_{69}NO_8$ молекулярна маса ліпази становить 751, із яких на Карбон припадає 540. Якщо у 751 г містить 540, то в 100 г $(540 \times 100) / 751 = 72$ г Карбону. І хоча ці розрахунки – теоретично – не мають сильно відходити від практичних результатів, вартує зазначити, що середовище є невизначеного складу. Тобто значення дійсно може відрізнятись.

Задля подальшого прорахунку варто зауважити, що оливкова олія вуглеводи не містить, проте як було вказано раніше, у ПС було введено дріжджовий екстракт (на далі ДЕ), у кількості 1 г/л. Умовно візьмемо відсоток Карбону у ньому за 40%. Отже, у 100 г вуглеводів міститься 40 г Карбону, а в 72 г – $(72 \times 100) / 40 = 180$ г вуглеводів – місткість 72 г Карбону.

Умовно приймемо, що у введеному ДЕ 25 % вуглеводів, тобто для одержання 100 г ліпази, їх вміст у поживному середовищі має складати $180 \times 4 = 720$ г/л.

Проте важливо зауважити, оскільки всі компоненти знаходяться у середовищі невизначеного складу, то чітко розрахувати необхідний вміст ДЕ – неможливо. Тим більше, що ДЕ – мікроелементи для живлення, вуглець в амінній формі, конкретно у цьому випадку великої ролі не відіграє, оскільки стічні води маю у своєму складі більш ніж 50% залишків олії (в деяких випадках це значення може доходити до 90%), тобто ріст культури має забезпечуватися мікроелементами з цього середовища. ДЕ додають лише для прискорення або контролю виживання самого мікроорганізму.

Для розрахунку джерела азотистого живлення у вихідній статті наведено недостатньо даних, проте оскільки азотисте живлення для *Yarrowia lipolytica* не є обов'язковим, то цю частину обрахунків було вирішено пропустити, за узгодженням з керівником кваліфікаційної роботи.

Підрозділ 2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Середня молекулярна маса варіюється від 34 до 44 кДа, в залежності від штаму [1]. До прикладу, для *Y. lipolytica* (CBS 6303) це значення буде становити 38 кДа [2], для *Y. lipolytica* AS 2.1216–LipY8, така сама, як і для *Y. lipolytica* AS 2.1216–LipY7 – 41 кДа [3].

Ліпази продуковані *Yarrowia lipolytica* найбільш пристосовані до росту при температурах між 28°C та 55°C, але дослідження показують, що термостабільність ферменту може триматися аж до 80°C, залежно від штаму. Вважається, що на це впливає кількісний вміст проліну та високі співвідношення аргініну до лізину, що було продемонстровано в одному із порівняльних досліджень, які проводилися на трьох різних ензимах, а саме Lip8p, Lip14p та Lip18p. Відповідно до наведеного порядку зростала кількість вище зазначеного вмісту речовин та, відповідно, їх термостабільність [4].

Найбільшу активність продуцент виявив між рН 6.0 та 10.0, але за оптимум беруть рН 6.0, 7.0 або 9.0, залежно від штаму [5]. За іншими ж дослідженнями оптимальним для культивування буде рН від 6.0 до 7.0, оскільки збільшення кислотності або алкалоїдності середовища може призвести до незворотної інактивації ензиму, не дивлячись на стабільність самої ліпази у проміжку між рН 3.5 до 9.0 [6, 7].

Ліпази зазнають значної активації за присутності Ca^{2+} , оскільки за різними джерелами іони кальцію є важливим для її метаболізму. Так, під час дослідження Lip2p дійшли до висновків, що дані катіони напрями впливають на стабілізацію фермента та на видалення неперетравлених жирних кислот як нерозчинні солі із Ca^{2+} [5, 8, 9]. Інгібіторами ж слугують Fe^{2+} , Cd^{2+} та Ni^{2+} , за одними дослідженнями та Zn^{2+} , Ni^{2+} та Cu^{2+} за іншими [4, 5]. Достеменно обґрунтувати цю різницю на разі не є можливим, але одним із варіантів подібного розходження є різниця використаних штамів та середовищ для їх вирощування.

Підрозділ 2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Домен: Еукаріоти (*Eukaryota*);

Царство: Гриби (*Fungi*);

Підцарство: Вищі гриби (*Dikarya*);

Тип: Аскоміцети (*Ascomycota*);

Клас: Сахароміцети (*Saccharomycetes*);

Порядок: Сахароміцетальні (*Saccharomycetales*);

Родина: *Dipodascaceae*;

Рід: *Yarrowia* [23].

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

Підрозділ 3.1. Потреба у цільовому продукті

Використання ферментів у виробництві мийних засобів – далеко не нова тема, проте це не значить, що ця галузь промисловості стоїть на місці. Оскільки ферменти мають можливість до розщеплення жирів, їх використовують у великому різноманітті сфер життя людини: миття посуду та кухонного приладдя, машинного знаряддя та елементів, загальна обробка приміщень та предметів.

Так само вічно-актуальним є і питання екологічності виробництва без фінансових втрат. Саме тому дослідники почали звертати увагу на *Yarrowia lipolytica* та ряд її штамів, зокрема W29, що розглядається у цій роботі. Здатність ліпаз *Y. lipolytica* до гідролізу ліпідів (на ряду з естерами, тригліцеридами та рядом інших сполук) робить цей фермент важливою частиною суміші, що буде використана у ряді очисних засобів, а здатність рости на відходах виробництва олій – оливкової, палмової, соняшnikової – наділяє економічною вигодою для власників заводів цих олій. Таким чином ліпази *Y. lipolytica* задовольняють обидва поставлених вище питання: екологічність та беззбитковість виробництва.

На жаль, на разі подібне виробництво є теоретичним, як і його використання та обслуговування. Частково через умови, що були описані вище, частково через нестачу інформації у відкритих джерелах про об'єми, в яких відбувається (і чи відбувається взагалі) виробництво мийних ферментних засобів в Україні.

Тому описані у розділі розрахунки було прийнято провести провівши моніторинг мережі за певними запитами, а саме: приблизні витрати мийних засобів для обробки обладнання на виробництві соняшnikової олії у місті Києві та області, для того аби створити закритий цикл, в якому ліпаза буде вирощена на стічних водах цих виробництв і буде використовуватися для подальшого виробництва мийних засобів для забезпечення цих самих підприємств.

					НУХТ БТЕК 04.03.06 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Короленко Б.В.				РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Стабніков В.П.						24	85 ₂₅
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.							

Підрозділ 3.2. Розрахунок потужності виробництва

Отже, як і було зазначено вище, подальші розрахунки будуть здійснюватися лише для факту забезпечення достатньої кількості сухого ферменту ліпази для подальшого виготовлення мийних засобів, які в свою чергу підуть на забезпечення чистоти в установах по виготовленню соняшникові олії. Згідно з попередніми розрахунками, загальний їх літраж для забезпечення річного запасу буде становити $[365 \times 2 \times 17 =]$ 12 410 л. Звідси, припустимо, що мийний засіб має складати комплекс ферментів, одним з яких буде ліпаза, звідси $1/4$ від цього літражу буде складати композиція ферментів, $1/3$ з цієї композиції складатиме ліпаза. Для виробництва була використана ліпаза *Y. lipolytica* штаму W29, що росте на відходах заводів з виробництва соняшnikової олії. При культивуванні її подібним чином ми отримаємо 78 одиниць активності на 96 годин, а концентрація ліпази становитиме 0,51 г/л ($\text{кг}/\text{м}^3$).

Отже, при таких даних показників, кількість культуральної рідини, що буде використана для біосинтезу мийних засобів за рік складає:

$$1095 / 0,51 = 2147 \text{ л}$$

З урахуванням втрат цільового продукту при виділенні (20%), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = 2147 / (1 - 0,2) = 2684 \text{ л}$$

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

Значення для забезпечення такої потреби ліпази для такого виробництва, з урахуванням всіх факторів становить 2684 м^3 культуральної рідини.

Звідси, розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість трудоднів – 270, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_d = V_{гп} / T_{рд} = 2684000 / 270 = 9941 \text{ л/доба}$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{кр} = (K_1 \times V_d \times T_{цф}) / 24 = (1,1 \times 9941 \times 104,5) / 24 \approx 65838 \text{ л/цикл}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (96 год) та час підготовки ферментера до роботи (8,5 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Визначивши об'єм КР за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_3 , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{г} = V_{цк} / K_3 = 65838 / 0,6 = 109730 \text{ л} = 110 \text{ м}^3$$

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер $V_{ф} = 200 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$K_3 = 110 / 200 = 0,55$ – не перевищує заданого значення, відповідно ферментер було обрано правильно.

Підрозділ 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 109730$ л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб.1} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 109730 / (1 - 0,15) = 129\,095 \text{ л,}$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом :

$$V_{роб.1} = 129\,095 \text{ л.}$$

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

$V_{ф} = V_{роб.1} / K_{зап} = 129\,095 / 0,6 \approx 215\,158$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 250\,000$ л, та уточнюємо прийнятий

раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап1} = V_{роб.1} / V_{сф} = 1549 / 2582 = 0,51.$$

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

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 129\,095 / (1 + 0,1) \approx 117\,359 \text{ л},$$

де $X_{ф} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 129\,095 - 117\,359 = 11\,736 \text{ л}.$$

Для одержання 11 736 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 11\,736 / (1 - 0,10) \approx 13\,040 \text{ л}.$$

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

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{па}) = 13\,040 / (1 + 0,1) \approx 11\,854 \text{ л},$$

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

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 13\,040 - 11\,854 = 1\,186 \text{ л}.$$

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 13\,040$ л можна одержати під час культивування дріжджів у посівному апараті геометричним об'ємом.

$V_{па2} = V_{роб.2} / K_{зап} = 13\,040 / 0,6 \approx 21\,734$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} \approx 25\,000$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з2} = V_{роб.2} / V_{сф} = 13\,040 / 25\,000 = 0,52.$$

Для одержання 1 186 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.3} = V_{пм2}/(1-E_{ін}) = 1\ 186/(1-0,10) \approx 1\ 318 \text{ л.}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$$V_{пс3} = V_{роб.3}/(1+X_{ін}) = 1\ 318/(1+0,1) \approx 1\ 198 \text{ л,}$$

де $X_{ін} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 1\ 318 - 1\ 198 = 120 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.3} = 1\ 318$ л можна одержати під час культивування дріжджів в інокуляторі геометричним об'ємом:

$$V_{ін3} = V_{роб.3}/K_{зап} = 1\ 318/0,6 = 2\ 196 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 2\ 000$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з3} = V_{роб.3}/V_{сф} = 1\ 318/2\ 000 = 0,6.$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{пм4} = 120$ л можна одержати культивуванням дріжджів у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$. Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме $N_{колб} = V_{пм3}/(V_{колб} * K_{зк}) = 120\ 000/750 * 0,2 \approx 3$ колби. Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 3 качалочних колби. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи. Четвертим етапом є сам виробничий біосинтез

РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту

Підрозділ 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Продуцент *Yarrowia lipolytica* при рості на оливковій олії синтезує ліпазу.

Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [24], внаслідок катаболізму оливкової олії утворюються жирні кислоти. Гексадеканоат (жирна кислота) розкладається ферментом довголанцюговою ацил-КоА-синтетазою (КФ 6.2.1.3) до гексадеканоїлу-КоА. З гексадеканоїлу-КоА утворюється L-пальмітоїлкарнітин у присутності ферменту карнітин O-пальмітоїлтрансферази 1 (КФ 2.3.1.21). Отримана сполука повторно перетворюється на гексадеканоїл-КоА ферментом карнітин O-пальмітоїлтрансферазою 2 (КФ 2.3.1.21). З гексадеканоїлу-КоА утворюється транс-гексадек-2-еноїл-КоА при дії наступних ферментів: ацил-КоА-оксидази (КФ 1.3.3. 6), ацил-КоА дегідрогенази (КФ 1.3.8.7), довголанцюгової ацил-КоА дегідрогенази (КФ 1.3.8.8), ацил-КоА-дегідрогенази жирних кислот з дуже довгим ланцюгом (КФ 1.3.8.9) [25].

Транс-гексадек-2-еноїл-КоА перетворюється на (S)-3-гідроксигексадеканоїл-КоА внаслідок впливу двох ензимів – еноїл-КоА гідратази (КФ 4.2.1.17) та середньоланцюгової еноїл-КоА гідратази (КФ 4.2.1.74). Далі відбувається утворення сполуки 3-оксогексадеканоїлу-КоА при дії 3-гідроксіацил-КоА дегідрогенази (КФ 1.1.1.35) та еноїл-КоА гідратази (КФ 4.2.1.17). На заключному етапі 3-оксогексадеканоїл-КоА перетворюється на ацетил-КоА [25].

					НУХТ БТЕК 04.03.06 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Короленко Б.В.			РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В.П.					11	85
						Кафедра БТМ ³⁰		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

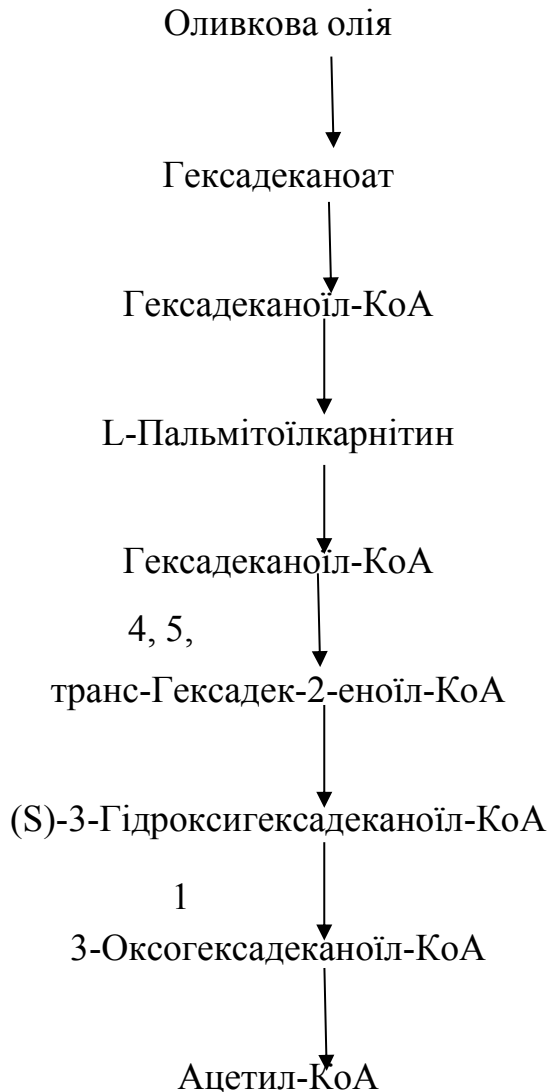


Рис. 1. Схема катаболізму оливкової олії у *Yarrowia lipolytica* [2].

Ферменти:

1 – довголанцюгова ацил-КоА-синтетаза (КФ 6.2.1.3); 2 – карнітин О-пальмітоїлтрансфераза 1 (КФ 2.3.1.21); 3 – карнітин О-пальмітоїлтрансфераза 2 (КФ 2.3.1.21); 4 – ацил-КоА-оксидаза (КФ 1.3.3.6); 5 – ацил-КоА дегідрогеназа (КФ 1.3.8.7); 6 – довголанцюгова ацил-КоА дегідрогеназа (КФ 1.3.8.8); 7 – ацил-КоА-дегідрогеназа жирних кислот з дуже довгим ланцюгом (КФ 1.3.8.9); 8 – еноїл-КоА гідратаза (КФ 4.2.1.17); 9 – середньоланцюгова еноїл-КоА гідратаза (КФ 4.2.1.74); 10 – 3-гідроксіацил-КоА дегідрогеназа (КФ 1.1.1.35); 11 – еноїл-КоА гідратаза (КФ 4.2.1.17).

Підрозділ 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *Yarrowia lipolytica* з використанням оливкової олії як джерела вуглецю, внаслідок катаболізму жирних кислот, утворюється ацетил-КоА. Далі ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Ліпаза – фермент, до складу якого входять 20 амінокислот.

Амінокислоти аспартатної родини (аспартат, аспарагін, метіонін, треонін, ізолейцин) утворюються з оксалоацетату, який є інтермедіатом ЦТК.

Амінокислоти глутаматної родини (глутамат, глутамін, пролін, аргінін) утворюються з 2-оксоглутарату (інтермедіату ЦТК).

Анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення втрат інтермедіатів ЦТК – попередників біосинтезу амінокислот, при рості на оливковій олії є реакції гліоксилатного циклу, які каналізують ферменти ізоцитратліаза (КФ 4.1.3.1) та малатсинтаза (КФ 2.3.3.9).

Для утворення таких сполук, як 3-фосфогліцерат, піруват, глюкозо-6-фосфат, функціонують реакції глюконеогенезу, ключовим ферментом якого є фосфоенолпіруваткарбоксікіназа (АТФ) (КФ 4.1.1.49), під дією якого оксалоацетат перетворюється на фосфоенолпіруват.

Глюкозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу, в якому утворюються попередники ароматичних амінокислот – фосфорибозилпірофосфат (попередник гістидину) і еритрозо-4-фосфат. Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват – попередники фенілаланіну, тирозину і триптофану.

3-Фосфогліцерат є попередником серину, гліцину і цистеїну. Піруват – попередник аланіну, валіну і лейцину. Піруват утворюється з фосфоенолпірувату за допомогою піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

З 2-оксоглутарату і ацетил-КоА за допомогою гомоцитратсинтази (КФ 2.3.3.14) утворюється гомоцитрат, який далі за участю гомоаконітази (КФ 4.2.1.-), гомоаконітатгідратази (КФ 4.2.1.36), гомоізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.87), 2-аміноадипаттрансамінази (КФ 2.6.1.39) перетворюється на 2-

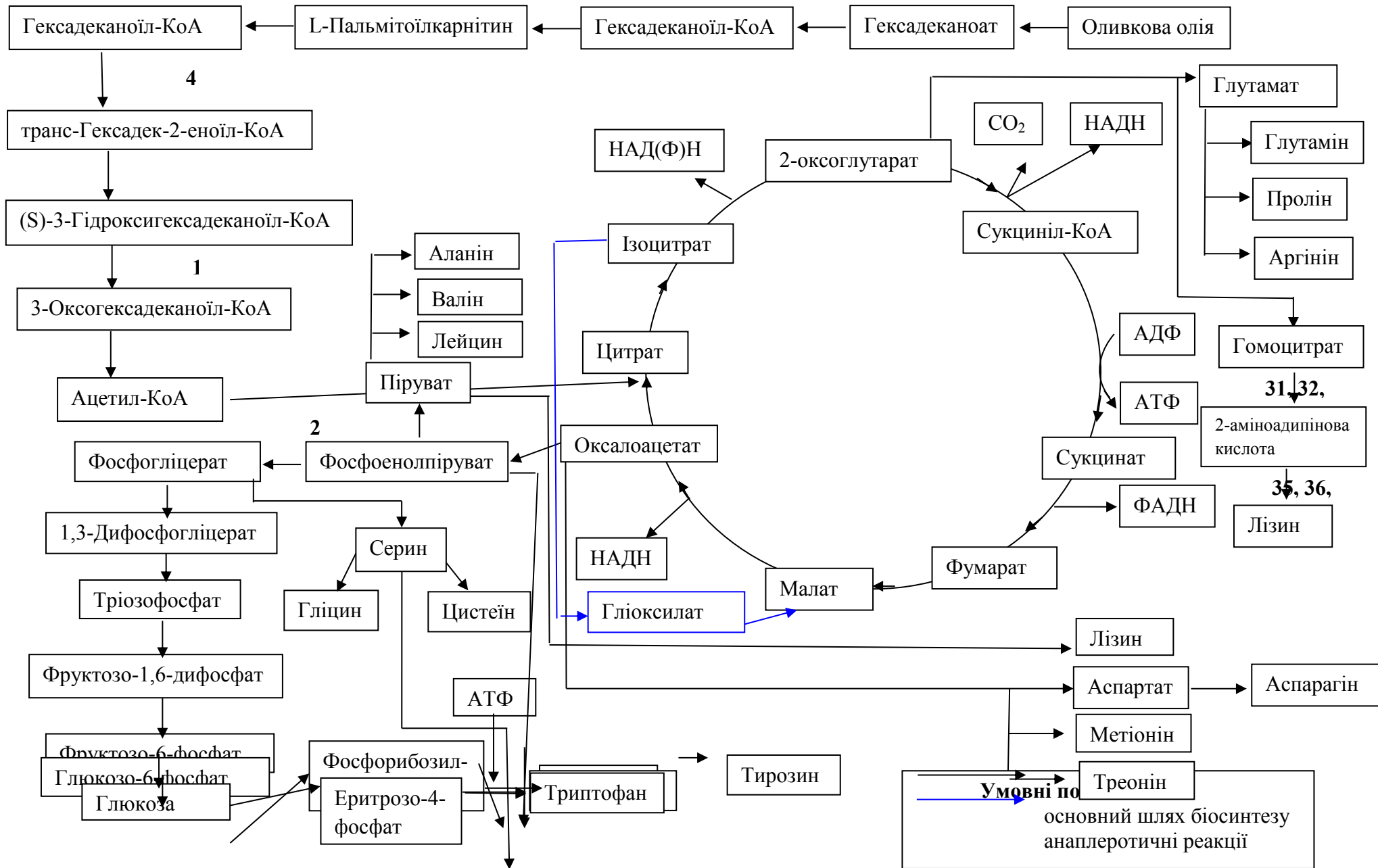
аміноадипінову кислоту, з якої за допомогою L-2-аміноадипатредуктази (КФ 1.2.1.95), сахаропіндегідрогенази (НАДФ⁺ залежної) (КФ 1.5.1.10), сахаропіндегідрогенази (НАД⁺ залежної) (КФ 1.5.1.7) утворюється лізин.

Схему біотрансформації оливкової олії у цільовий продукт представлено нижче.

Ферменти:

1 – довголанцюгова ацил-КоА-синтетаза (КФ 6.2.1.3); 2 – карнітин О-пальмітоїлтрансфераза 1 (КФ 2.3.1.21); 3 – карнітин О-пальмітоїлтрансфераза 2 (КФ 2.3.1.21); 4 – ацил-КоА-оксидаза (КФ 1.3.3.6); 5 – ацил-КоА дегідрогеназа (КФ 1.3.8.7); 6 – довголанцюгова ацил-КоА дегідрогеназа (КФ 1.3.8.8); 7 – ацил-КоА-дегідрогеназа жирних кислот з дуже довгим ланцюгом (КФ 1.3.8.9); 8 – еноіл-КоА гідратаза (КФ 4.2.1.17); 9 – середньоланцюгова еноіл-КоА гідратаза (КФ 4.2.1.74); 10 – 3-гідроксіацил-КоА дегідрогеназа (КФ 1.1.1.35); 11 – еноіл-КоА гідратаза (КФ 4.2.1.17); 12 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 13 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 14 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42.); 15 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа (КФ 1.2.4.2); 16 – сукцинаттіюкіназа (КФ 6.2.1.5); 17 – сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); 18 – фумараза (КФ 4.2.1.2); 19 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 20 – фосфоенолпіруваткарбоксікіназа (КФ 4.1.1.49); 21 – фосфогліцератфосфомутаза (КФ 5.4.2.1); 22 – гліцератфосфомутаза (КФ 5.4.2.11); 23 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 24 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 25 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 26 – гексозодифосфатаза (КФ 3.1.3.11); 27 – глюкозо-6-фосфатаза (КФ 3.1.3.9); 28 – глутамінсинтетаза (КФ 6.3.1.2); 29 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40); 30 – гомоцитратсинтаза (КФ 2.3.3.14); 31 – гомоаконітаза (КФ 4.2.1.-); 32 – гомоаконітатгідратаза (КФ 4.2.1.36); 33 – гомоізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.87); 34 – 2-аміноадипаттрансаміназа (КФ 2.6.1.39); 35 – L-2-аміноадипатредуктаза (КФ 1.2.1.95); 36 – сахаропіндегідрогеназа (НАДФ⁺ залежна) (КФ 1.5.1.10); 37 –

сахаропіндегідрогеназа (НАД⁺ залежна) (КФ 1.5.1.7); 38 – ізоцитратліаза (КФ 4.1.3.1); 39 – малатсинтетаза (КФ 4.1.3.2).



РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.

Підрозділ 5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.

Оскільки умови та спосіб культивування повністю залежать від фізіолого-біохімічних властивостей, то саме на них і спирають під час підбору даних характеристик.

Yarrowia lipolytica є аеробним організмом, що надає перевагу температурі 25-29°C та середньому рівню рН, якщо розглядаємо конкретно штам W29, то часто його культивують при рН=6,4...7,2. Тому в ідеалі при попередньому вирощуванні культури в лабораторії вартує віддати перевагу колбам качалкам або колбам Ерленмеєра задля забезпечення достатньої аерації. Проте у таких колбах можливе виникнення контамінації нейтрофільних мезофілів, тому важливо дотримуватися асептичних умов, тобто варіант поверхневого культивування є доволі невідповідним. Також, незважаючи на асептичні умови, до колби все ще має проходити повітря у достатній кількості для нормального росту культури. Його очищення можна забезпечити КОН або простим стерильним повітрям, проте у такому випадку вартує заздалегідь тримати колбу під надлишковим тиском [11].

Найвищого ступеню отримання ліпази культура доходить на етапі експоненційної фази росту, що пояснюється властивістю цього мікроорганізму до перероблення вуглеводнів до алканів, кислот, жирів тощо. Тому за можливості вартує підтримувати організм саме у цій фазі [3].

Оскільки кожен організм унікальний у своїх умовах для культивування, то ферментер бажано підбирати відповідний, згідно з особливостями росту культури, важливими факторами тощо.

					НУХТ БТЕК 04.03.06 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Короленко Б.В.				РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Стабніков В.П.						37	85
						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

До прикладу, під час культивування *Yarrowia lipolytica* треба забезпечити аеробні умови, тобто має бути наявним барботер через який у ферментер буде подаватися стерильне повітря, задля уникнення ризику контамінації. Гарним рішенням задля підтримування подібних умов може стати турбінна мішалка, що забезпечить насичення кисню нижніх шарів культури. Проте це не єдиний варіант, іншою опцією є лопатева мішалка, оскільки у зазначених умовах *Y. lipolytica* не синтезує міцелій.

Також може синтезувати лимонну кислоту, тому важливо контролювати та підтримувати рН у нормі, для цього встановлюється датчик контролю рН. Інший фактор, який потребує контролю є насиченість киснем, оскільки мікроорганізм є аеробом – тобто має бути встановлений датчик контролю кисню. Для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується сорочкою і датчиком температури.

Підрозділ 5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.

Задля отримання повітря правильної температури та консистенції, яка б не зашкодила ані процесам культивування, ані вже процесам виробничого біосинтезу, повітря має пройти через ряд очищувальних та нормалізуючих процедур перед його подачею до інокуляторів, ферментерів тощо. Тому, було обрано здійснювати забір атмосферного повітря на висоті 20-30 м до досягнення необхідного об'єму. Після цього вже починається процес очистки.

Його [процесу] першою стадією буде відділення повітря від механічних часточок, що можуть у ньому знаходитися: пил, частки дрібного сміття тощо, для цього доцільно використовувати фільтри грубої очистки з фільтр-матеріалом типу поліестру. Після цього повітря компресують, проте на цьому етапі воно також починає набирати температуру, як через власні особливості, так і через особливості компресувальних апаратів. Для того, аби знизити температуру від минулої стадії до усередненої, буде використано теплообмінник-охолоджувач. Одною із його переваг також можна виділити

наявність ресивера, який стане помічним у видаленні зайвої вологи з повітря [26].

Проте на цьому етапі профільтроване повітря все ще може утворювати конденсат на фільтрах індивідуальної очистки, що облаштовані на деяких зі стадій виробничого культивування. Для унеможливлення цього, його температуру важливо підняти у теплообміннику-нагрівачі. Після виконання всіх вище перелічених стадій, повітря може подаватися на головний та індивідуальні фільтри. На цих стадіях важливо підібрати фільтри з якомога вищим ступенем очистки, тому головний фільтр має бути облаштованим фільтр-матеріалом з пропіленового волокна, а індивідуальні – скловолокном. Так, можна забезпечити очищення повітря до $E \geq 92,92\%$ та відсутність сторонньої мікробіоти.

Підрозділ 5.2. Обтрунтування стадій післяферментаційного виділення цільового продукту.



Рис.5.1. Частина технологічної схеми, що демонструє описаний етап.

Після закінчення фінального етапу виробничого біосинтезу культуральну рідину перекачують до збірника-змішувача. У цьому збірнику її зберігають, та підтримують сталу температуру рідини до подальших етапів. Цього ефекту досягають шляхом циркуляції охолодженої води у зовнішньому контурі апарату. Температуру підтримують на рівні 10 градусів Цельсія.

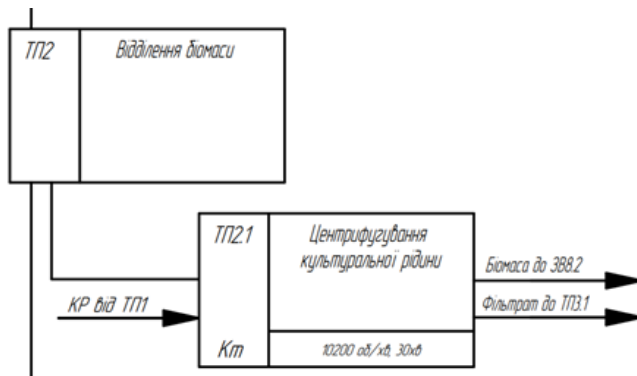


Рис.5.2. Частина технологічної схеми, що демонструє описаний етап.

Після цього шляхом центрифугування відокремлюють біомасу від культуральної рідини (локалізація цільового продукту є безпосередньо у культуральній рідині). Оскільки продуктом є сухий концентрат ліпази, для подальшого етапу висушування, виступає необхідним проведення проміжного етапу, а саме концентрування.

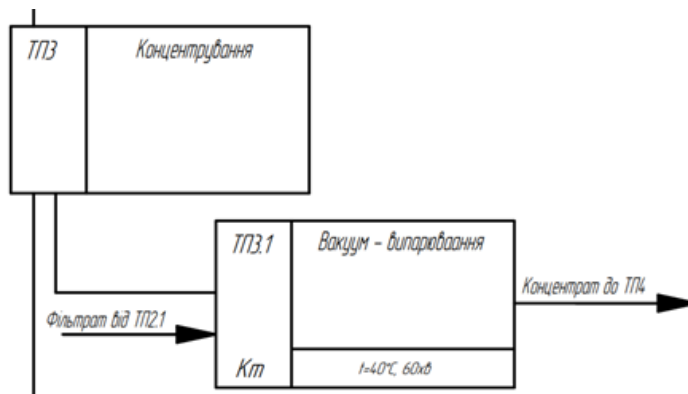


Рис.5.3. Частина технологічної схеми, що демонструє описаний етап.

Найдоцільнішим з можливих методів, та згідно різних переваг і недоліків, для подібного описаного у роботі виробництва є оптимальним метод вакуум випарювання. Після досягнення певного відсотку концентрування, концентрат подають на подальший етап, а тобто сушіння.

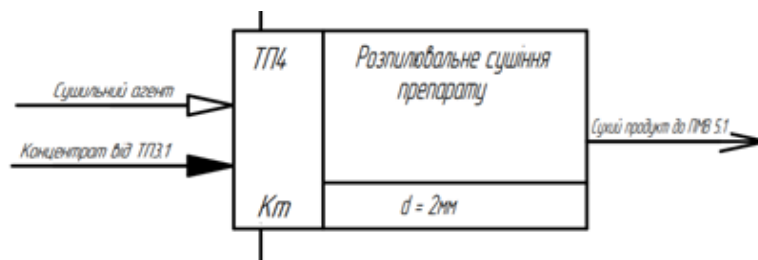


Рис.5.4. Частина технологічної схеми, що демонструє описаний етап.

Для цього обираємо оптимальний та, що важливіше, продуктивний спосіб висушування – розпилювальне сушіння. У камеру сушильного апарату подається теплоносій, який і здійснює висушування субстанції яку подають через розпилювальну форсунку вгорі апарату.

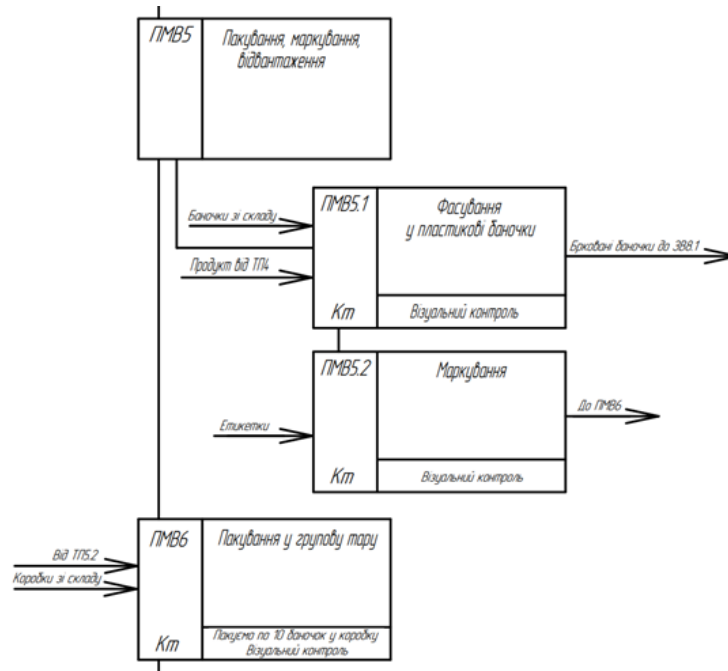


Рис.5.5. Частина технологічної схеми, що демонструє описаний етап.

Готовий препарат (субстанцію) подають на фінальний етап пакування та маркування. Як тару для подальшого зберігання та транспортування було обрано пластикову баночку з кришечкою. Готовий продукт пакують у групову тару до подальшого зберігання, перевірки та реалізації.

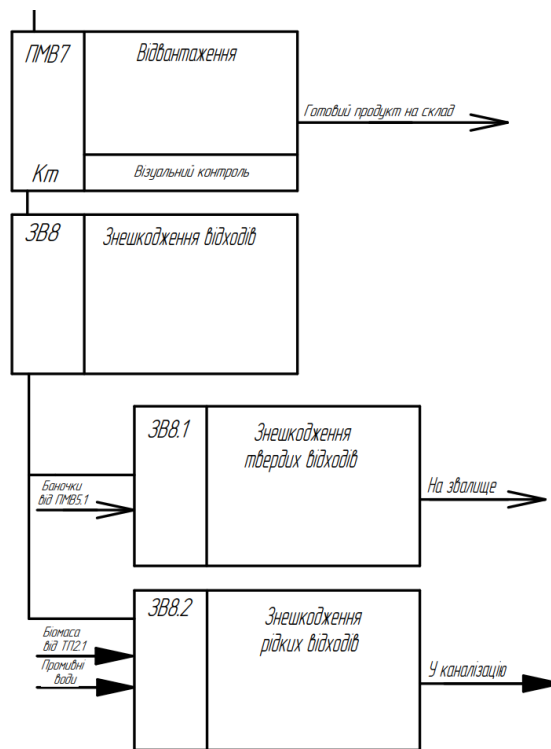


Рис.5.6. Частина технологічної схеми, що демонструє описаний етап.

Після чого відбувається фінальний етап виробництва, а саме знешкодження відходів.

Підрозділ 5.4. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів.

На ринку представлена велика кількість різних засобів, є ті, які використовують виключно для підлоги, обладнання чи конкретною одиниці інвентарю, проте можливі ситуації, коли готують мийно-лужний розчин і залежно від концентрації різних речовин у ньому, його розподіляють на різні очисні потреби виробництва. Так само існують вже готові мийні розчини, як хлоровмісні, так і ні; а виробництвах можливе створення розчинів на їх основі. До таких засобів можна віднести: Дезекон ОМ, Санітаб, Соліклор, Дезмарк 300, Максисан, Санімакс, Полідез-А тощо.

Мийні/дезінфікуючі засоби, їх коротка характеристика та застосування

Назва мийного/дезінфікуючого засобу	Діюча речовина	Об'єкти миття/дезінфекції	Джерело інформації (1, 2, 3)
1	2	3	4
Дезекон ОМ	Композиція: дідецилдіметил-амоніум хлориду; амінопропілдодецил-пропандіаміна; полігексаметіленбігуанід гідрохлориду	Поверхні панелей, шафи, санітарно-технічне обладнання	1
Солізим	Композиція ферментів: протеаза, ліпаза, амілаза	Поверхні приміщень та обладнання	1
Санітаб	Дихлоризоціанурат натрію	Стеля та стіни, дверні ручки, підлога	2
Дезмарк 300	Натрієва сіль дихлоризоціанурової кислоти	Контейнери для сміття, прибиральний інвентар, каналізаційні трапи, решітки, раковини для миття рук	3
Максисан	Комплекс чотирьох четвертинних амонієвих сполук	Поверхні приміщень, для щоденних і генеральних вологих прибирань	4

Примітка. 1 – <https://www.baltiachemi.ee/et/>; 2 – <https://interdez.com.ua/>; 3 – <https://uht24.ua/>; 4 – <https://ukranalitika.com.ua/ua/>.

Дезекон ОМ. Бактерецидний та фунгіцидний засіб на основі дидецилдиметиламоніум хлориду, амінопропілдодецилпропандіаміну, полігексаметиленбігуанід гідрохлориду, а також інших допоміжних компонентів. Засіб не містить альдегідів, фосфатів чи активного хлору, що дозволяє використовувати його навіть у присутності сторонніх осіб, оскільки [при використанні шляхом змочування і протирання поверхонь] не становить небезпеки для респіраторних шляхів чи очей. IV клас небезпеки (малонебезпечні речовини за ГОСТ 12.1.007-76) при нанесенні на шкіру, інгаляційній дії в умовах вільного випаровування; III клас небезпеки (помірно небезпечні речовини за ГОСТ 12.1.007-76) при введенні у шлунок.

Також препарат не має фіксуючої дії, тому не потребує повторного змивання водою чи іншими речовинами, є ефективним при очистці поверхонь з високим білковим навантаженням.

Засіб є універсальним у сферах застосування: дезінфекція медичних виробів і апаратури, інших видів медобладнання (і тому числі використаного), знезараження медичних відходів тощо; очищення апаратів у харчовій промисловості (холодильні камери, цехи виробництва, трубопроводи, тари); а також загальні типи приміщення у сфері обслуговування чи учбових закладах [27].

Солізим. Засіб володіє високою бактерицидною, мікобактерицидною, віруліцидною, фунгіцидною, спороцидною діями. Особливістю засобу є його склад який забезпечує ферментне очищення, оскільки засіб містить ПАР, ферментний комплекс (протеаза, ліпаза, амілаза), тетраацетілетілендіамін та перкарбонат натрію. Має IV клас небезпеки (малонебезпечна речовина за ГОСТ 12.1.007-76), не має кумулятивного, шкірно-резорбтивного, місцево-позбавляючого, сенсibiliзуючого, мутагенного, канцерогенного впливів.

Також засіб не є ембріотоксичним чи тератогенним, тому він дозволений до використання в присутності осіб, не причетних до проведення дезінфекуючих робіт. Гарно підходить до видалення жирних плям чи плям біологічних рідин людини, так само як і попередні засіб, легко змивається та не потребує дообробки поверхонь. Є безпечним для пластикових та металевих поверхонь, поверхонь з гальванічним чи лакофарбовим покриттям, гуми чи інших полімерних матеріалів, скла, деревини тощо. Застосовується у різних галузях: медичній, харчовій, сфері обслуговування, навчальних закладах, транспортних засобах [28].

Санітаб. Засіб є ще одним із представників хлоровмістних очисних та дезінфекційних препаратів. Його діючою речовиною є дихлорізоціанурату натрію, допоміжними – адипінова кислота та карбонат натрію. Деззасіб володіє високою бактерицидною дією; проявляє високу ефективність проти збудників дизентерії, сальмонельозу, черевного тифу, холери, чуми, спороутворюючих мікроорганізмів, SARS, аденовірусної та ентеровірусної інфекцій; володіє фунгіцидною дією. Становить IV клас небезпеки (малонебезпечна речовина по ГОСТ 12.1.007-76). Не має сенсibilізуючої, мутагенної дії; канцерогенні та кумулятивні властивості не виражені.

Засіб дозволено використовувати у різних сферах – харчовій, медичній, тощо –, проте часто його використовують саме для дезінфекції раковин, решіток каналізації, трапів, контейнерів для сміття та іншого санітарно технічного обладнання.

На відміну від інших, можливе багаторазове використання розчинів цього засобу при умові, що вони візуально не містять ознак забруднення [29].

Дезмарк 300. Універсальний хлоровмістний вирулицидний, бактерицидний, фунгіцидний, спороцидний засіб, який використовується здебільшого у медичній сфері для знезараження використаних медичних виробів одноразового використання, перев'язувального матеріалу, харчових

відходів тощо. Проте можливе використання у інших галузях, в тому числі на харчових та біотехнічних виробництвах. За складом містить натрієву сіль дихлорізоціанурової кислоти, адипінову кислоту та натрію бікарбонат. II клас небезпеки (високонебезпечні речовини за ГОСТ 12.1.007-76).

Персонал, який відповідає за миття та дезінфекцію приміщень має слідкувати та не допускати контакту засобу, як у формі таблеток, так і в формі розчину, з очима та іншими слизовими оболонками, оскільки це може призвести до хімічних опіків чи отруєнь, ні в якому разі не допускати потрапляння засобу у шлунок чи будь яким іншим шляхом всередину організму. Також через високі концентрації хлору приміщення, в тому числі ті, в який знаходиться інвентар, що був протертий чи занурений, мають провітрюватися принаймні протягом 15 хвилин.

Отже, засіб має високу ефективність та можливе використання у багатьох сферах, в тому числі виробництвах та виробничих приміщеннях, проте разом із високою ефективністю, з'являється недолік – а саме неможливість використовувати приміщення після обробки ним принаймні 15 хвилин та неможливістю використовувати в присутності персоналу чи пацієнтів [30].

Максисан. Іще один представник засобів, що не містять у складі хлор, натомість засіб працює за рахунок комплексу чотирьох четвертинних амонієвих сполук. Як і всі іще перераховані засоби Максисан має бактерицидну, віруліцидну, фунгіцидну і спороцидну дії. IV клас небезпеки (малонебезпечні речовини за ГОСТ 12.1.007-76) при інгаляційному впливі парів. Засіб не викликає алергенної, тератогенної чи канцерогенної дії.

Його пари відносно безпечні для персоналу, проте при контакті концентрату може подразнювати шкіру та слизову оболонку очей, а отже дозволений у застосуванні методом протирання та занурення при іншому не кваліфікованому в очищенні та дезінфекції персоналу чи пацієнтах. Як й

інші засоби може використовуватися у харчовій та медичній сферах, учбових закладах, транспорті тощо.

Підводячи підсумки, можна зрозуміти, що хлоровмісні препарати можуть становити більшу загрозу для персоналу на ряду з вищою концентрацією активних речовин, що беззаперечно покращує видалення різного типу забруднень та дезінфекцію приміщень та обладнання. Більшість з цих засобів можна використовувати як для обробки приміщень (стін, стелі, підлоги тощо), так і для протирання поверхонь обладнання чи побуту (шаф, полицок тощо), інвентарю з прибирання. Підбір має здійснюватися індивідуально для кожного виробництва, як і сфери використання того чи іншого засобу. До факторів, що можуть вплинути на кінцеве рішення можна віднести: загальний кошторис, навченість персоналу, матеріали обладнання, покриття приміщень тощо [31].

Підрозділ 5.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого біосинтезу ліпази, продукованої *Yarrowia lipolytica*, використовують стічні води заводу з виробництва олій (в різних роботах зазначається можливе використання як оливкової, так і пальмітинової олій; у цій роботі також зазначається про можливість використання соняшникової). Оскільки на разі розглядаємо саме штам W29, використаємо приблизний склад стічних вод, що був наведений у відповідній роботі (посилання на роботу дивитися у таблиці 2.1).

Тобто, склад використаного середовища буде таким:

- Загальна кількість твердих речовин – 10,5 г/л;
- Загальна кількість летких речовин – 7,28 г/л;
- Нітроген (К'ельдаль) – 0,05 г/л;
- Феноли (кавова кислота) – 0,796 г/л;
- Відновлювальні/редукційні цукри – 3,37 г/л;

- Загальна кількість білку – 0,516 г/л;
- Розчин мікроелементів – 0,775 г/л, із них (мг/л): К – 700,33; Са – 39,53; Na – 12,34; Mg – 19,52; Cu – 0,20; Fe – 1,98; Zn – 0,75; Mn – 0,30.
- рН середовища – 4,84.

Додаткові компоненти, що не є частиною стічних вод:

- Амоній сульфат – 6 г/л
- Дріжджовий екстракт – 1 г/л

Отже. Задля здійснення виробничого біосинтезу буде використано ферментер об'ємом 40м³ з коефіцієнтом заповнення 0,7. Підготовка посівного матеріалу відбуватиметься у три стадії: 1 – у колбах на качалці, 2 – у інокуляторі, 3 – у ферментері.

Задля стерилізації середовища для посівного матеріалу в колбах на качалках буде використано автоклав, проте для вирощування матеріалу в інокуляторах та, безпосередньо, для виробничого біосинтезу середовище може бути стерилізовано у самому обладнанні, що використовується. При тому для об'єму в 1л³ стерилізація може відбуватися також у автоклаві, через відносно невеликий розмір, підходящий для автоклава. Для композиції у 10л³ стерилізація також може відбуватися у збірнику. Стерилізація буде відбуватися за допомогою температури та тиску.

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання

Перелік специфікації обладнання зображеного у графічній частині наведено у вигляді таблиці, для полегшення орієнтування за показниками та місцем на схемі. Сама технологічна схема наявна у графічній частині роботи.

Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.03.06 КР ПЗ			
Розроб.		Короленко Б.В.			РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В.П.					49	85
Н. Контр.					Кафедра БТМ			
Затверд.		Стабніков В.П.						

Специфікація обладнання на ділянці виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Коротка характеристика	Джерело інформації (1, 2, 3)
1	2	3	4	5
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Оснащений рядом сіток т решіток для вловлювання часточок пилу чи інших механічних забруднень повітря	Збірний
ФГО-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр матеріалом виступає поліестер у комбінації з оцинкованою сіткою. Матеріал самого корпусу - оцинкована сталь (Україна).	1
К-3	Компресор	1	Турбокомпресори ID TURBO COMPRESSOR серії TRE (Японія), корпус із литого чавунна. Робочий тиск: 0,2 – 1,8 МПа	2
ТО-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря Jh 18APV (Китай). Робочий тиск: 1,8 МПа; зниження вологості до 26 °С	3
Р-5	Ресивер	1	УКРГАЗКОМПЛЕКТ-2010 (Україна) дозволяє замовити компресори об'ємом від 0,1 до 20 м ³ із робочим тиском від 0,6 до 4,0 МПа.	4
ТН-6	Теплообмінник-нагрівач	1	ОРЕКС (Україна) дає можливість вибору фільтру з нержавіючі сталі з робочим тиском від 0,8 до 1,6 МПа	5
Ф-7 Ф-8	Фільтр очистки повітря	2	Матеріал корпусу: нержавіюча або оцинкована сталь; фільтруючий матеріал – поліпропіленове волокно, Е = 90 В	6

РЗ-8	Реактор-збірник	1	Реактори усіх трьох об'ємів із нержавіючої сталі можуть бути доступні під замовлення від фірми «Wise Master»	6
РЗ-9	Реактор-збірник	1		
РЗ-10	Реактор-збірник	1		
ЗЗ-11	Збірник-змішувач	1	Змішувач на 20 л від фірми Vikspack із нержавіючої сталі	7
ІН-12	Інокулятор	1	Має відповідати вимогам: коефіцієнт заповнення 0,6; об'єми 25 та 250 л відповідно; оснащений мішалкою та датчиками рівню аерації та рН.	Під замовлення
ІН-14	Інокулятор	1		
ФР-16	Ферментер	1	Має відповідати вимогам: коефіцієнт заповнення 0,6; об'єми 2 500 л; має бути оснащеним барботером та рубашкою.	Під замовлення
Ф-13 Ф-15 Ф-17	Індивідуальний фільтр очистки повітря	1	Фільтр-матеріалом в яких є скловолокно; Е = 99,999 %, контроль повної відсутності сторонньої мікробіоти	Збірні
НВ-18	Насос відцентровий	1	Відцентровий насос Speroni CS 50-160 А (Італія), оснащений електродвигунами (2850 об/хв), сам корпус та його деталі – нержавіюча сталь.	8

Примітка. 1 – <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-gruboy-ochistki-vozduha-panelniy/>; 2 – <https://dalgakiran.ua/uk/products/centrobizhni-kompresory-ih-dalgakiran-seriyi-tre/>; 3 – <https://tdfavorit.com.ua/ua/p493549575-ohladitel-vozduha-jhcool.html>; 4 – <https://ukrgaz.com.ua/catalog/rezervuary-iemnosti-baky/promyslovyj-resyver-dlia-stysnenoho-povitria-hazu/>; 5 – <https://technofilter.kiev.ua/>; 6 – <https://wise-master.com.ua/ua/p730702549-himicheskij-reaktor-sbornik.html>.

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.

Технологічна схема біосинтезу ліпази *Yarrowia lipolytica* штаму W29 включає в себе як допоміжні роботи, так і опис самого технологічного процесу. Також ознайомитися зі схематичним зображенням процесу є можливим через технологічну схему, що наведена у графічній частині кваліфікаційної роботи.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря.

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря.

Перед очищенням атмосферного повітря, його збирають на висоті 20-30 м до досягнення необхідного об'єму (ПЗ-1).

ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря від пилу та механічних часточок.

Після забору, повітря пропускають через фільтр грубої очистки з фільтр-матеріалом у вигляді поліестру, так можливо досягти ступеню очищення повітря $E = 80\%$, за рахунок затримки не тільки крупних часточок бруду, а також пилу чи інших можливих забруднювачів (ФГО-2).

ДР 1.3. Стиснення повітря.

Після, повітря передається у наступний відділ – компресування. Там, воно проходить крізь ряд змін, доки не досягне температури $T = 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ і тиску $p = 0,35\text{-}0,5\text{ МПа}$ (К-3).

					НУХТ БТЕК 04.03.06 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Короленко Б.В.			РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В.П.					52	85
						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР 1.4. Охолодження повітря.

На наступній стадії повітря подається до теплообмінника-охолоджувача, аби знизити температуру від минулої стадії до усередненої, яка становить приблизно $T = 25-40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (ТО-4). Після, як і зазначено у назві самої стадії, відбувається видалення зайвої вологи у ресивері, після чого її відносний вміст має становити $W = 50-60 \%$ (Р-5).

ДР 1.5. Стабілізація та нагрівання повітря.

Перед подачею вже відфільтрованого повітря на головні та індивідуальні фільтри, важливо унеможливлення конденсації пари на волокнах цих фільтрів. Для цього у теплообміннику-нагрівачі, його температуру підіймають до $T = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (ТН-6).

ДР 1.6. Очищення в головному фільтрі.

На цій стадії очищення, повітря пропускають через два головних фільтри, задля забезпечення якомога кращої якості повітря, а завдяки фільтрувальному матеріалу – поліпропіленове волокно – можна досягти ступеню очищення $E = 99,92 \%$. (Ф-7; Ф-8).

ДР 1.7. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах.

Перед двома інокуляторами, а також перед ферментером встановлюють по одному індивідуальному фільтру, фільтрувальним матеріалом в яких є скловолокно. Таким чином забезпечується подача повітря, ступінь очищення якого може становити до $E = 99,999 \%$, а також повна відсутність сторонньої мікробіоти (Ф-13, Ф-15, Ф-17).

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів .

ДР 2.1. Підготовка і стерилізація титрувального агента NaOH для інокулятора 25л

Для корегування рН необхідно приготувати титрувальний розчин з розрахунку 2мл/л культуральної рідини.

$m(\text{NaOH}) = \frac{28 \times 6}{100} = 1,68\text{г} \approx 2\text{г}$ (потрібно для приготування 6 % NaOH об'ємом 28мл)

На технічних вагах зважують 2 г NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 50 мл, і додають 28 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 2.2. Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH для інокулятора 250л

ДР 2.3. Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH для ферментера 2,5м³

ДР2.4. Підготовка титрувального агенту HCl для інокулятора 25 л

HCl готують змішуванням концентрованої HCl з дистильованою водою в у стерильній колбі.

Розрахунок кількості 36 % HCl необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 6 %, об'ємом 26мл):

$$0,36x = 0,06 \times 26$$

$$0,36x = 1,56$$

$$x = 4,3 \text{ мл} \approx 4 \text{ мл (36\% – і HCl)}$$

Розрахунок кількості води необхідної для приготування 26 мл

6 % HCl:

$$26 - 4 = 22 \text{ мл (дистильованої H}_2\text{O)}$$

Приготування кислоти відбувається у колбі об'ємом 50мл.

Мірником відміряють 4 мл концентрованого 36% розчину HCl, та поміщають в колбу об'ємом 50 мл, і додають 22 мл дистильованої води, ретельно перемішують.

ДР 2.5. Підготовка титрувального агенту HCl для інокулятора 250 л

ДР 2.6. Підготовка титрувального агенту HCl для ферментера 2,5м³

HCl готують змішуванням концентрованої HCl з дистильованою водою в у стерильній колбі.

Розрахунок кількості 36 % HCl необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 6 %, об'ємом 2756 мл):

$$0,36x = 0,06 \times 2756$$

$$0,36x = 156$$

$$x = 433,3 \text{ мл} \approx 433 \text{ мл (36\% - і HCl)}$$

Розрахунок кількості води необхідної для приготування 2756 мл

6 % HCl:

$$2756 - 433 = 2323 \text{ мл (дистильованої H}_2\text{O)}$$

Приготування кислоти відбувається у бутлі об'ємом 4000мл.

Мірником відміряють 433 мл концентрованого 36% розчину HCl, та поміщають у бутль об'ємом 4000 мл, і додають 2323 мл дистильованої води, ретельно перемішують

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ.

ДР 3.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуяту в колбах на качалках.

Вміст компонентів для вирощування 1,4 л поживного середовища у колбах на качалках наведено у табл. 7.1.

ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А.

На лабораторних вагах зважують 1,4 г дріжджового екстракту, після чого наважку поміщають у колби об'ємом 300 мл і розпроділяють по ним 1,38 л стічних вод рівномірно, розчин перемішують і закривають колби ватно-марлевым короком. Стерилізація відбувається в автоклаві при температурі $T = 112^\circ \text{C}$ впродовж 30 хв, перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти.

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

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л, мл/л	Вміст компонента в 1,4 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Стічні води		1,38 (л)	А	1,38
Дріжджовий екстракт	1	1,4		
(NH ₄) ₂ SO ₄	6	8,4	Б	0,02
Вода	1125 (мл)			
Разом:	1,4 л			1,4

ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б.

На лабораторних вагах зважують 8,4 г солі амонію ((NH₄)₂SO₄), наважку вносять в колби об'ємом 300 мл і додають 1125 мл дистильованої води, по колбам розприділяють рівномірно. Колби закривають ватно-марлевым короком і стерилізують в автоклаві при температурі T = 131°C впродовж 40 хв, перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 25л.

Для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 25 л готують поживне середовище об'ємом у 15 л. Вміст компонентів, як і на минулій стадії, описано у таблиці.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 15 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація г/л, мл/л	Вміст компонента в 15 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Стічні води		12,06 (л)	А	13,4
Дріжджовий екстракт	1	15		
Конденсат	1,34 (л)			
(NH ₄) ₂ SO ₄	6	90	Б	0,2
Вода	1125(мл)			
Разом:	1,4 л			

ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 15 г дріжджового екстракту, після чого наважку поміщають у збірник і додають до нього 12,06 л стічних вод, розчин перемішують за допомогою влаштованого перемішувального пристрою. Стерилізація відбувається в автоклаві при температурі $T = 112^{\circ}\text{C}$ впродовж 30 хв, перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б.

На технічних вагах зважують 90 г солі амонію ((NH₄)₂SO₄), наважку вносять до збірника та додають 1125 мл дистильованої води, після чого запускають перемішувальний пристрій. Стерилізують в автоклаві при температурі $T = 131^{\circ}\text{C}$ впродовж 40 хв, перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера 2,5 м³.

Для вирощування посівного матеріалу у фермері об'ємом 2,5 м³ готують поживне середовище об'ємом у 1549 л. Вміст компонентів, як і на минулій стадії, описано у таблиці.

Таблиця 7.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1549 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л, мл/л	Вміст компонента в 1549 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Стічні води		1240,2(л)	А	1378
Дріжджовий екстракт	1	1549		
Конденсат	137,8(л)			
(NH ₄) ₂ SO ₄	6	9294	Б	30
Вода	1125(мл)			
Разом:		1,4		1408

ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 1549 г дріжджового екстракту, після чого наважку поміщають у збірник і додають до нього 12402 л стічних вод, розчин перемішують за допомогою влаштованого перемішувального пристрою. Стерилізація відбувається в автоклаві при температурі $T = 112^{\circ} \text{C}$ впродовж 30 хв, перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б.

На технічних вагах зважують 9294 г солі амонію ((NH₄)₂SO₄), наважку вносять до збірника та додають 1125 мл дистильованої води, після чого запускають перемішувальний пристрій. Стерилізують в автоклаві при

температурі $T = 131^{\circ}\text{C}$ впродовж 40 хв, перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Yarrowia lipolytica штаму W29 зберігається у пробірках з рідким середовищем при температурі $T = 4^{\circ}\text{C}$, пересів здійснюється 1 раз на 2 місяці. Строго перевіряється відсутність сторонньої мікробіоти, а всі роботи з культурою здійснюються лише в асептичних умовах.

ТП 4.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Колекційну культуру, яка до цього мала зберігатися в пробірках з рідким середовищем, пересівають петлею в пробірки зі рідким середовищем того ж складу і вирощують при температурі $T = 28^{\circ}\text{C}$, впродовж 72 год. Перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.3 Вирощування культури на агаризованому середовищі

Колекційну культуру утримують в пробірках зі рідким середовищем того ж складу і надалі культивують при температурі $T = 28^{\circ}\text{C}$, впродовж 72 год. Перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.4 Вирощування культури в колбах на качалках

Із пробірки з культурою піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і переносять до колби (з розрахунком, що одна пробірка дорівнює одній колбі), яку в свою чергу закривають ватно-марлевым короком. Після цього в ці ж колби вносять композиції А та Б (від ДР 3.1.1 та ДР 3.1.2 відповідно). Культивування проводять у колбах на качалці (150 об/хв) при температурі $T = 28^{\circ}\text{C}$ впродовж 48 годин. Перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.5 Вирощування в інокуляторі 25л

До посівного матеріалу зі збірників подається стерилізована композиція А та композиція Б (від ДР 3.2.1 та ДР 3.2.2 відповідно), на цій стадії для додаткової аерації подається повітря стерилізоване (від ДР 1.7) та натрій гідроксид для підтримки рівню рН (від ДР 2.2). Культивування проводять при температурі $T = 30^{\circ}\text{C}$ впродовж години, підтримуючи швидкість перемішування на 100об/хв. Перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти (ІН-12).

ТП 4.6 Вирощування в інокуляторі 250л

До посівного матеріалу зі збірників подається стерилізована композиція А та композиція Б (від ДР 3.3.1 та ДР 3.3.2 відповідно), на цій стадії для додаткової аерації подається повітря стерилізоване (від ДР 1.7) та натрій гідроксид для підтримки рівню рН (від ДР 2.2). Культивування проводять при температурі $T = 30^{\circ}\text{C}$ впродовж 48 годин, підтримуючи швидкість перемішування на 100об/хв. Перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти (ІН-14).

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування

Для виробничого культивування культуру з інокулятора (ІН-14) разом з композиціями А та Б (від ДР 3.4.1 та ДР 3.4.2 відповідно) подають до заздалегідь простерилізованого ферментера (ФР-16). До ферментера також постійно подається очищене повітря зі швидкість 1 м/с через фільтр (Ф-17) та натрій гідроксид для підтримки рівню рН (від ДР 2.2).

Культивування проводять при температурі $T = 28^{\circ}\text{C}$ впродовж 96 год, підтримуючи швидкість перемішування на 100 об/хв.

Контролюють виробничий процес як періодичним відбором проб культуральної рідини та наступним її мікробіологічним контролем, так і наприкінці культивування, визначаючи показники біосинтезу.

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва

Контроль виробництва має відбуватися на усіх стадіях виробництва для забезпечення адекватного та правильного вирощування культури та її виробничого біосинтезу. Важливою стадією перед більшим заглибленням у методи та особливості контролю, є стадія складання карти поетапного контролю, яка має давати коротку характеристику методик, які будуть використовуватися на відповідних етапах виробництва та має відповідати технологічній схемі, які була розписана у минулому розділі.

Підрозділ 8.1. Карта поетапного контролю.

					НУХТ БТЕК 04.03.06 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Короленко Б.В.			РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В.П.					61	85
Н. Контр.					Кафедра БТМ 60			
Затверд.		Стабніков В.П.						

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кт 1.2 Очищення від пилу і механічних часточок	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Стиснення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	P = 0,35-0,5 МПа t = 200 °C
Кт 1.4 Охолодження та видалення вологи	Охолоджене повітря	Термометр технічний	Під час проведення операції	t = 25-40 °C W = 50-70°
Кт 1.5 Стабілізація та нагрівання	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 60 °C
Кт 1.6 Очищення в головному фільтрі	Очищене повітря	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на тиждень	E = 99,92 %
Кт 1.7 Очищення повітря на індивідуальних фільтрах	Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на місяць	E = 99,9999 %

Продовження таблиці 8.1.

Кт, Кх 2.1 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH для інокулятора 25л	Перевірка концентрації, температура, час	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	C = 6 % t = 131°C τ = 60хв P = 0,15 МПа Відсутність мікробіоти
Кт, Кх 2.2 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH для інокулятора 250л	Перевірка концентрації, температура, час	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	C = 6 % t = 131 °C τ = 60хв P = 0,15 МПа Відсутність мікробіоти
Кт, Кх 2.3 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH для ферментера 2,5м ³	Перевірка концентрації, температура, час	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	C = 6 % t = 131 °C, τ = 60 хв P = 0,15 МПа Відсутність мікробіоти
Кт, Кх 2.4. Підготовка титрувального агенту HCl для інокулятора 25 л	Перевірка концентрації	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	C = 6 %
Кт, Кх 2.5. Підготовка титрувального агенту HCl для інокулятора 250 л	Перевірка концентрації	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	C = 6 %
Кт, Кх 2.6. Підготовка титрувального агенту HCl для ферментера 2,5 м ³	Перевірка концентрації	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	C = 6 %

Продовження таблиці 8.1.

Кт, Км 3.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 30\text{ хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 40\text{ хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 30\text{ хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 40\text{ хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 30\text{ хв}$ Відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 8.1.

Кт, Км 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C τ = 40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C τ = 40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Yarrowia lipolytica</i> Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час збереження, мікробіологічний контроль після збереження	t = 4 °C Пересів 1 раз на 2 місяці. Відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження таблиці 8.1.

Кт, Км 4.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	$t = 28^{\circ} \text{C}$ $\tau = 72 \text{ год.}$ Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.3 Вирощування культури на агаризованому середовищі	Тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	$t = 28^{\circ} \text{C}$ $\tau = 72 \text{ год.}$ Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безпосередньо під час виробничого процесу.	$t = 28^{\circ} \text{C}$ $\tau = 48 \text{ год,}$ 150 об/хв. Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 4.5 Вирощування в інокуляторі 25л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН - метр мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	$t = 30^{\circ} \text{C}$ $\tau = 48 \text{ год}$ $\text{pH} = 6,4$ Відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення таблиці 8.1.

<p>Кт, Км, 4.5 Вирощування в інокуляторі 250л</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, рН - метр мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.</p>	<p>$t = 30^{\circ} \text{C}$ $\tau = 48$ год $\text{pH} = 6,4$ Відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, 5.1 Виробниче культивування</p>	<p>Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація клітин, активність ферменту</p>	<p>Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, непрямий метод визначення біомаси, Визначення активності ферменту</p>	<p>Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.</p>	<p>$t = 28^{\circ} \text{C}$ $\tau = 96$ год $\text{pH} = 6,4$. Ліпаза – 78 ОД/мл Відсутність сторонньої мікробіоти</p>

Підрозділ 8.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль є важливою частиною контролю якості майбутньої продукції, та виступає як перший етап перевірки процесу культивування, завдяки якому можливо завчасно позбутися негативних впливів, домішок [тощо.] та забезпечити нормальний ріст культури. Щодо самої ж культури, то вона має підтримуватися у асептичних умовах, задля запобіганню ризику контамінації. Асептичність має періодично перевірятися рядом методів, наприклад, висівом на аграризовані середовища на чашках Петрі (до прикладу, середовищем може виступати м'ясо-пептонний агар (МПА)) з подальшим мікроскопіюванням методом «роздавленої краплі».

Щодо ж самого обладнання на якому буде проводитися дослід, то його перед цим треба підготувати та простерилізувати, задля запобіганню контамінації самої культури. Чашки Петрі, до прикладу, мають бути заздалегідь простерилізовані у сухожаровій шафі і тільки після цього можливе заливання самого середовища – МПА. Після чого чашки знову стерилізують, тепер вже із поживним середовищем, для цього їх поміщають до автоклаву та залишають там на певну кількість днів (1-3 доби) при температурі 30 °C [32].

Також, задля перевірки чистоти, можливий збір зразків з обладнання та поверхонь, що теоретично могли контактувати з персоналом чи самими чашками чи колбами, де знаходилися культури. Їх в свою чергу так само досліджують на МПА методом виснажувального штриха, або ж на середовищі Сабуро, залежно від того ризик чого саме – бактерій чи грибів [відповідно до зазначених середовищ] – був виявлений чи перевіряється [33].

Особливістю *Yarrowia lipolytica* – є те, що культура є характерно диморфною, відповідно, може відрізнитися її продукування залежно від складу поживного середовища в якому вона заходиться. Однією з характеристик, яку важливо контролювати – утворення культурою міцелію,

оскільки це може сигналізувати про порушення умов культивування. До прикладу, наявності амідів у поживному середовищі або нестатку кисню [9].

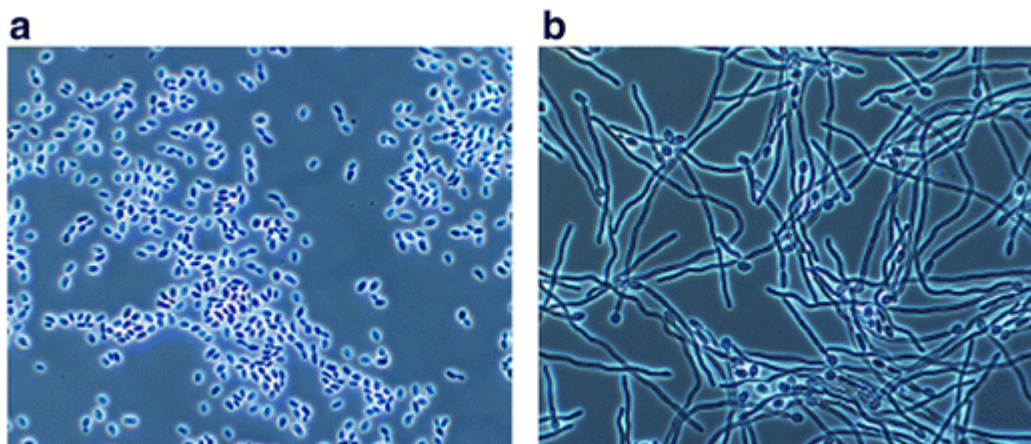


Рис.8.1. – *Yarrowia lipolytica* (штам W29) при мікроскопіюванні на збільшенні 40х. На рисунку зображено одну й ту саму колонію, проте вирощену при різних умовах аерації: а – культура має зерноподібну форму та була вирощена при достатній наявності кисню ($pO_2 \approx 65\%$); б – культура, що росла без аерації та, як результат, спостерігається утворення міцелію ($pO_2 \approx 0\%$) [9].

При дотриманні всіх норм під час висіву на солодовий агар має спостерігатися культура *Yarrowia lipolytica* тьмяна, ниткоподібна, жовтувато білого кольору. Також можуть спостерігатися поодинокі скупчення клітин, самі ж початкові клітини мають бути у формі витягнутого овалу, нагадуючи зерна пшениці.

Підрозділ 8.3. Показники синтезу цільового продукту – ліпази – шляхом визначення її активності.

Оцінку якості готового продукту – ліпази, а точніше її ферментної активності (од/г) – проводять за методом Ота та Ямади, що заснований на визначенні жирних кислот при їх титруванні лугом. Кислоти будуть утворюватися під дією ліпази, а в якості субстрату використовується оливкове масло [34].

Перед самим дослідженням готують ряд емульсій та розчинів, що будуть компонентами надалі проведених реакцій, цими компонентами є:

- *Буферний розчин полівінілового спирту.* Компонентами є: 20 г полівінілового спирту; дистильована вода у кількості 800 см³; 1 н соляної кислоти. Розчин готують шляхом змішування полівінілової кислоти та дистильованої води (у кількостях зазначених раніше) у колбах, та їх настоюванні протягом 30 хв при кімнатній температурі, після чого до колб додається соляна кислота, а сам розчин перемішують протягом години при температурі у 80-90 °С. Готовий розчин охолоджують та перевіряють його рН (він має становити рН 7) та фільтрують.
- *Субстрат на основі оливкової олії.* Компонентами є: 100 см³ оливкової олії та 150 см³ 2% розчину полівінілового спирту. Обидва компоненти змішують та утримують при температурах нижчих за нуль або на льоду. Перед використанням готову емульсію перевіряють на відсутність розшарування.

Сам дослід відбувається шляхом додавання у колбу 5 см³ емульсії на основі оливкової олії та 4 см³ буферного розчину полівінілового спирту, після додавання колбу закривають корок та утримують на водяній бані протягом 10 хв, температуру підтримують на 35-38 °С. Після цього наступним кроком додають розчин ферменту – ліпази – та перемішують, після чого продовжують утримувати на водяній бані за тим же температурним режимом протягом години. По проходженню визначеного часу, до колби додають 30 см³ етилового спирту, це робиться для припинення реакції та унеможливлення синтезу сторонніх суб-продуктів або фракцій.

Після цього додають 1% фенолфталеїн, а сам розчин титрують дозами по 0,05 н розчином лугу до появи забарвлення, що сигналізує про те, що реакція відбулася. Контрольна проба готується таким самим чином, після чого аналогічно титрується, проте на відміну від експериментальної – контрольна містить лише одну дозу 0,05 н лугу. Кількість 0,05 н лугу, який було використано для нейтралізації жирних кислот у

експериментальному зразку відповідає різниці між результатами титру контрольної та досліджуваної проби.

Таким чином ліпазна активність ферменту (од/г) буде визначена за наступною формулою:

$$ЛА = \frac{А * Т * 50}{В}$$

де ЛА – ліпазна активність (од/г);

А – результат між титрами досліджуваної та контрольної проб (см³);

Т – титр лугу (г/мл);

В – концентрація зразку ферментного розчиннику (г/см³);

50 – коефіцієнт перерахунку в мкмоль жирних кислот.

Підрозділ 8.5. Показники якості готового продукту.

Оскільки готовим продуктом є сухий фермент, то двома важливими точками контролю виступають сухість ферменту та його активність. Оскільки визначення активності самого ферменту вже було наведено у попередньому підрозділі, важливим у цьому розділі є проаналізувати методи визначення сухості ліпази у вигляді готового продукту.

Отже, для визначення сухості ферменту можна використати ряд гравіметричних методів. Перевагою методу є висока точність та відтворюваність, а також відносна дешевизна обладнання (хоч на разі й існує багато різних промислових апаратів, що оснащенні не тільки системами для вимірювання ваги).

Загалом гравіметричні методи поділяються за способом одержання продукту для подальшого вимірювання (до них відносять хіміогравіметричні, електрогравіметричні та термогравіметричні); та за процесами, що будуть

використані для вимірювання (до цієї категорії відносять методи виділення, відгонки та осадження). Таким чином, для визначення вмісту вологи у ферменті можливе використання термогравіметричного методу, суть полягає в обчисленні масової частки сухих речовин пробою, що поглинає вологу при різних тисках (атмосферному та зниженому) та температурних режимах протягом певного часового проміжку [35].

Альтернативно, можливим є використання вологометра, проте цей варіант може бути дорожчим як для закупівлі, так і експлуатації. Принцип дії вологометра полягає у випарюванні вологи зі зразка, який буде внесено, та реєстрація зменшення його ваги, після чого обраховують різницю між вагою зразка до і після випарювання та реєструють показники. Цей метод частіше використовують на сучасних виробництвах у відділах контролю виробництва, оскільки вони є зручними та швидкими у використанні та, в порівнянні з минулим методом, можуть мати меншу похибку, оскільки меншою буде вплив людини на проходження процесу висушування наважки.

Можливим вибором на ринку вагових аналізаторів вологості є продукти фірми «RADWAG» (Польща), їх аналізатори можуть підтримувати температуру на діапазоні від 50 до 160 °С завдяки інфрачервоним лампам, які забезпечують проходження процесів сушіння швидше, не втрачаючи у точності вимірювання, а дискретність визначення вологості у їх продукції становить 0,0001% (II клас точності за ДСТУ EN 45501) [36].



Рис.8.2. – ваговий аналізатор вологості, модель MA 50/1.R від фірми «RADWAG» (Польща) [36].

РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля

Підрозділ 9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Підрозділ 9.1.1. Розрахунок орієнтовної кількості рідких відходів.

До переліку очікуваних рідких відходів можна віднести:

- відпрацьовані залишки мийних і дезінфікуючих засобів;
- відпрацьовані води для обробки та промивання обладнання.

1.1) Відпрацьована вода, що становить залишки мийних і дезінфікуючих засобів.

Відповідно до специфікації апаратурної схеми маємо наступний перелік обладнання: реактор Р-5; ряд реакторів-змішувачів РЗ-8, РЗ-9, РЗ-10; інокулятори ІН-12 та ІН-14; ферментер ФР-16. Звідси, потрібний об'єм залишкової води від мийних та дезінфікуючих засобів, можна дізнатися через розрахунок приблизних витрат на приготування робочих розчинів – 20-30% від об'єму ємкісного обладнання. Таким чином отримуємо наступні розрахунки:

$$V_{\text{ємностей}} = V_{\text{Р-5}} + V_{\text{РЗ-8}} + V_{\text{РЗ-9}} + V_{\text{РЗ-10}} + V_{\text{ІН-12}} + V_{\text{ІН-14}} + V_{\text{ФР-16}} = 20 + 200 + 1500 + 100 + 25 + 250 + 2\ 500 = 4\ 595 \text{ л.}$$

Відповідно розраховуємо об'єм мийно-дезінфікуючих засобів, а саме 20-30% від об'єму $V_{\text{ємностей}}$:

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0,2 = 4\ 595 \text{ л} \times 0,2 = 919 \text{ л};$$

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0,3 = 4\ 595 \text{ л} \times 0,3 = 1\ 378,5 \text{ л} (\approx 1\ 379 \text{ л}).$$

					НУХТ БТЕК 04.03.06 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Короленко Б.В.			РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В.П.					73	85
						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Таким чином об'єм відпрацьованих залишків буде дорівнювати 919 - 1389 л, тобто розрахованому об'єму цих засобів.

1.2) Відпрацьована вода після ополіскування обладнання.

Оскільки її об'єм буде приблизно дорівнювати вище обрахованому об'єму відпрацьованої води, що використовується для приготування мийних та дезінфікуючих розчинів, то цей параметр буде становити таку ж кількість, що й минулий, а саме 919 - 1379 л.

Відповідно орієнтовна кількість стічних вод за цикл становитиме:

$$1379 + 1379 = 2758 \text{ літрів за цикл.}$$

Підсумовуючи, для обраного типу та площі виробництва було прорахованого наступні об'єми стічних вод: об'єм відпрацьованих вод, що використовуються для приготування мийних засобів буде становити 919 - 1389 л; орієнтовна кількість стічних вод за цикл становитиме 2758 літрів за цикл.

Підрозділ 9.1.1. Розрахунок орієнтовної кількості газоподібних відходів.

Отже, для визначення розміру викидів, треба обрахувати орієнтовний об'єм відпрацьованого повітря за 1 цикл ферментації. Таким, чином отримуємо наступні розрахунки.

На виробництві буде облаштовано реактор Р-5 (20 л); ряд реакторів-змішувачів РЗ-8 (200 л), РЗ-9 (1 500 л), РЗ-10 (100 л); інокулятори ІН-12 (25 л) та ІН-14 (250л); ферментер ФР-16 (2 500 л), коефіцієнт заповнення яких буде становити 0,6; для аерації буде використане стерильне повітря зі швидкістю в 1 л/лПС на хвилину. Виробничий біосинтез має проходити протягом 96 годин, а отримання посівного матеріалу – 52 години. Звідси маємо наступне рівняння:

$$\begin{aligned} & ((20 + 200 + 1\,500 + 100 + 25 + 250) \times 0,6 \times 96 \times 270) + (2\,500 \times 0,6 \times 96 \times 270) \\ & = 71\,461\,440 \text{ л або } 71\,461,44 \text{ м}^3. \end{aligned}$$

Отже орієнтовна кількість газоподібних відходів за цикл становитиме:

$$71\,461\,440 \text{ л або } 71\,461,44 \text{ м}^3.$$

Підрозділ 9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

Підрозділ 9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Для очищення стічних вод виділяють наступні методи:

- механічні методи (проціджування, відстоювання стічних вод у відстійниках, фільтрування);
- хімічні (нейтралізація, коагуляція, флокуляція);
- фізико-хімічні (флотація, сорбція, екстракція, електрокоагуляція, електрофлотація);
- комбіновані.

Важливими характеристиками для підбору методу можуть виступати рН відходів, температура, неопосередковано їх склад та фазово-дисперсна система домішок. До прикладу, такими системами очищення можуть виступати піскоуловлювачі та жируловлювачі, осаджувальні центрифуги, відстійники та фільтри різного типу тощо [33].

Також важливо зазначити, що на різних підприємствах, кількість та склад виробничих стічних вод може відрізнятися, навіть при однакових технологічних процесах. Головним фактором, що визначає їх склад є сировина, яку переробляють чи виготовляють. Також склад може різнитися залежно від режиму роботи підприємства, допоміжних компонентів, що використовуються для отримання основної продукції, чи проміжних продуктів; рідше вплив мають певні місцеві умови чи особливості водоспоживання виробництва, склад води, що використовується для

виробництва або очистки апаратів, інших факторів. Іноді склад стічної води буде варіюватися навіть на одному виробництві, проте в різних його цехах, на яких виконуються різні етапи виробництва [37].

Зазвичай очищення може проводитися у декілька етапів, проте можливе виконання лише одного-двох, залежно від складу.

Для обраного виробництва не потрібно обирати багато складних схем очищення стічних вод. За ДБН В.2.5-75:2013 «КАНАЛІЗАЦІЯ. ЗОВНІШНІ МЕРЕЖІ ТА СПОРУДИ.», діапазон рН очищених стічних вод, що будуть перенаправлені до міської каналізації, має становити від 6,5 до 8,5, тобто у цьому конкретному випадку можливе звичайне скидання до каналізації, якщо вони відповідають нормам. У випадку якщо цього не відбувається і рН є зависоким чи занижким буде використано один із вище зазначених методів хімічного очищення стічних вод – *нейтралізацію* [38], [39].

Нейтралізація може здійснюватися для багатьох цілей, включаючи захист очисних споруд та каналізаційних шляхів [від корозії], довкілля та його біорізноманіття; для того аби запобігти реакції будь-яких хімічних елементів у відпрацьованій воді з реагентами, що використовують для загального очищення стічних вод у каналізаційних мережах чи відстійниках [37], [39].

З основних способів у які здійснюється *нейтралізація* виділяють наступні:

- змішуванням кислотних і основних стічних вод, шляхом їх взаємної нейтралізації;
- додаванням реагентів (не/гашене вапно, сода, крейда);
- фільтруванням кислотних вод через нейтралізуючі матеріали (вапняк, магнезит, доломіт);
- абсорбцією кислотних газів лужними водами або аміаку кислотними водами, забезпечуючи очистку як вод, так і самих газів.

Для вибору методу керуються можливостями підприємства, наявністю на ньому певних реагентів, технологій чи споруд, кількістю та якістю вод, що

надходять на нейтралізацію, загальним кошторисом та витратами на кубометр води. Таким чином у випадку стічних вод проєктуємого у цій роботі виробництва можливе використання методу змішування кислотних та основних стічних вод для їх взаємної нейтралізації, зменшуючи витрати на екологізацію виробництва. Проте можливе і окреме приготування розчинів реагентів для нейтралізації кислих вод розчином NaOH, а лужних – розчином HCl [39].

Окремо важливо виділити метод біологічного очищення з використанням *біофільтрів*. Їх часто використовують при великому біологічному навантаженні у фільтруємих матеріалах. За допомогою шлаків, активованого вугілля чи керамзитів такі фільтри можуть здійснювати нейтралізацію нітритів, амоніаку, залежно від використаного наповнення, може також затримувати певні рештки важких металів, фенолів, радіонуклідів та інших небажаних компонентів біохімічного складу стічних вод [39].

Підсумки: на виробництві буде наявних наступний перелік миючих та дезінфікуючих засобів, а саме: «Дезекон ОМ», «Солізим», «Санітаб», «Дезмарк 300», «Максисан» – для забезпечення різних потреб виробництва у підтримці чистоти робочих місць, виробничих зон, загальних павільйонів тощо. Як методи очистки стічних вод були обрані методи їх нейтралізації – або змішуванням кислотних і основних стічних вод, шляхом їх взаємної нейтралізації, або додаванням реагентів. Також була розглянута можливість використання біофільтрів для більш якісної очистки. Після цього стічні води, які на цьому етапі мають відповідати нормам ДБН, буде скинуто до каналізації. При розгляді можливих методів очистки відпрацьованого повітря, були обрані скрубери та фільтри НЕРА, для підтримки чистоти повітря на виробництві можливе використання «циклонів».

Підрозділ 9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

В результаті діяльності підприємства, очікувано буде утворюватися незначна кількість відходів I - IV класу небезпеки. На самій його території здійснюватиметься лише тимчасове зберігання відходів. Відходи тимчасово розміщуються у спеціально відведених місцях відповідно до класу небезпеки, звідки видаляються на зберігання, знешкодження, утилізацію згідно укладених договорів з спеціалізованими підприємствами. Із цих відходів доцільно виділити відпрацьовану біомасу та матеріали для пакування [39].

Відпрацьовану біомасу доцільно буде спалити, оскільки в подальшому вона не представляє інтересу для інших галузей біотехнології як всередині, так і за межами виробництва. Проте, оскільки для подібного заходу на виробництві має бути наявна ліцензія для цього типу утилізації, то було вирішено після завершення циклу зберігати їх у пластикових контейнерах на території підприємства, після чого відвантажувати усі тверді відходи у вигляді біомаси та передавати їх до інших підприємств, що мають ліцензію та спеціалізуються на поводженні з подібним видом відходів, згідно договорів.

Тверді відходи у вигляді залишків пакувальних елементів та самої упаковки, в тому числі пластикової та картонної, мають накопичуватися у складських приміщеннях до моменту їх перенаправлення на звалище за умовами скиду.

Способи тимчасового зберігання відходів визначаються їх фізичним станом, хімічним складом і класом небезпеки відходів. Обидві наведені вище категорії відходів можна віднести до 4 класу небезпеки, а тобто можуть зберігатися у контейнерах чи ящиках, спеціально відведених місцях чи майданчиках та не потребують створення спеціальних умов для їх утримання [40].

При умові належного тимчасового зберігання відходів у відповідності з санітарними нормами та технікою безпеки, їх сортування та передачі спеціалізованим підприємствам, забезпечується безпечний рівень впливу на навколишнє середовище.

Підрозділ 9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Для очищення повітря найчастіше використовують «циклони». Ці апарати базуються на відцентровій силі та призначені для виділення дрібних часточок пилу чи інших забрудників з повітря. Загалом існує багато різних пиловловлювачів, які працюють за схожим принципом, так само існують апарати схожої конструкції для видалення з повітря крапель рідини. Часто ці конструкції будуються разом для більш комплексної очистки повітря [43].

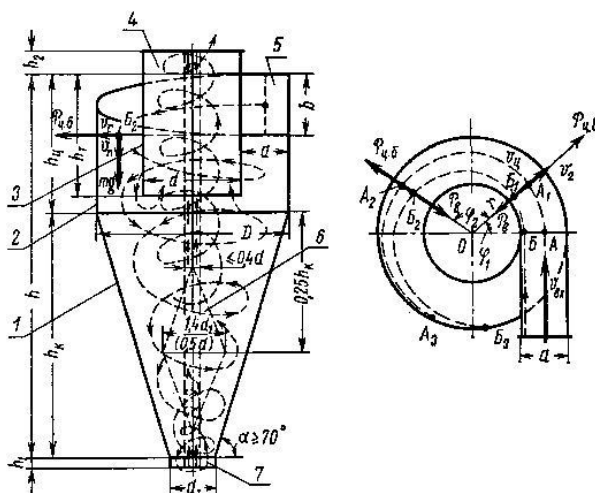


Рис 2.1 Загальна схема циклону [41]

Оскільки на виробництві для висушування продукту ліпази до сухого стану буде використовуватися розпилювальна сушарка, то у повітрі буде накопичуватися відносно велика кількість сухого залишку. На разі більшість сушарок оснащені певними конвекторами чи влаштованими вентиляціями, проте це лише частково вирішує проблему забруднення повітря і майже не вирішує проблему поганих запахів. Саме тому обов'язково має бути облаштована система очистки загального повітря [39].

Для очистки відпрацьованого повітря на виробництві можливо розглянути декілька варіантів: скруббер або фільтри типу HEPA [44].

Скруббер це прилад для напівтонкої очистки повітря від домішок у вигляді інших газів чи твердих домішок. Зазвичай зсередини він облицьований для запобігання внутрішньої корозії. До нижньої частини апарата має подаватися газ, який проходить через ряд труб та форсунок та зрошується водою. Так, можливо забезпечити осідання твердих часточок у газі та відповідно його очищення.

Альтернативним же варіантом виступає *фільтр HEPA*. Його перевагою перед попереднім варіантом є незаперечно вища ефективність, завдяки ряду листів фільтруючого матеріалу, які в свою чергу складається з хаотично розташованих волокон, до прикладу, мікростекловолокон, проте можливе використання інших матеріалів [26], [41].

Отже, було вирішено облаштувати на виробництві як циклони для очистки загального повітря на виробництві; також для очищення відпрацьованого повітря буде встановлено або скруббер або фільтри HEPA, також можливий варіант їх поєднання.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Стаття у журналі:* A. Aloulou, D. Puccinelli, A. De Caro, Y. Leblond, F. Carrière, Biochim. Biophys. Acta 1771 (2007) 1446–1456. A comparative study on two fungal lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity.
2. *Стаття у журналі:* H.-T. Song, Z.-B. Jiang, L.-X. Ma, Protein Expression Purif. 47 (2006) 393–397. Expression and purification of two lipases from *Yarrowia lipolytica* AS 2.1216
3. *Стаття у журналі:* J. Destain, D. Roblain, P. Thonart, Biotechnol. Lett. 19 (1997) 105–107. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*
4. *Стаття у журналі:* A. Kumari, R. Gupta, Biotechnol. Lett. 34 (2012) 1733–1739. Cloning, expression and characterization of a new lipase from *Yarrowia lipolytica*.
5. *Стаття у журналі:* P. Fickers, A. Marty, J.M. Nicaud, Biotechnol. Adv. 29 (2011) 632–644. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications
6. *Стаття у журналі:* Moeller, L., Zehnsdorf, A., Aurich, A., Bley, T., and Strehlitz, B. (2012). Substrate utilization by recombinant *Yarrowia lipolytica* growing on sucrose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93, 1695–1702. doi: 10.1007/s00253-011-3681-9 .
7. *Стаття у журналі:* A. Aloulou, J. Rodriguez, D. Puccinelli, N. Mouz, J. Leclarine, Y. Leblond, F. Carrière, Biochim. Biophys. Acta 1771 (2007) 228–237.

8. *Стаття у журналі:* P. Fickers, M. Ongena, J. Destain, F. Weekers, P. Thonart, *Enzyme Microb. Technol.* 38 (2006) 756–759.
9. *Стаття у журналі:* K.N.S. Yadav, M.G. Adsul, K.B. Bastawde, D.D. Jadhav, H.V. Thulasiram, D.V. Gokhale, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 10663–10670.
10. *Стаття у журналі:* A. Aloulou, J. Rodriguez, D. Puccinelli, N. Mouz, J. Leclarine, Y. Leblond, F. Carrière, *Biochim. Biophys. Acta* 1771 (2007) 228–237.
11. *Стаття у журналі:* Asma Timoumi, Stéphane E Guillouet, Carole Molina-Jouve, Nathalie Gorret. Impacts of environmental conditions on product formation and morphology of *Yarrowia lipolytica*. May 2018.
12. *Інтернет джерело:* **chembk** [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.chembk.com/en/chem/9001-62-1>
13. *Стаття у журналі:* F. Bordes, L. Tarquis, J.M. Nicaud, A. Marty, J. *Biotechnol.* 156 (2011) 117–124.
14. *Стаття у журналі:* F. Darvishi, J. Destain, I. Nahvi, P. Thonart, H. Zarkesh-Esfahani, *New Biotechnol.* 28 (2011) 756–760.
15. *Стаття у журналі:* K. Nie, F. Xie, F. Wang, T. Tan, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 43 (2006) 142–147.
16. *Стаття у журналі:* Fickers P, Benetti PH, Wache Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS, Nicaud JM (2005) Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res* 5:527–543. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>.
17. *Стаття у журналі:* Ledesma-Amaro R, Nicaud JM (2016a) Metabolic engineering for expanding the substrate range of *Yarrowia lipolytica*. *Trends Biotechnol* 34:798–809. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.010>.

18. *Стаття у журналі*: Seraphim Papanikolaou Agricultural University of Athens Isabelle Chevalot French National Centre for Scientific Research Maria Galiotou-Panayotou Michael Komaitis Agricultural University of Athens

Industrial derivative of tallow: A promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*.

19. *Стаття у журналі*: FICKERS, P.; NICAUD, J.M.; GAILLARDIN, C.; DESTAIN, J. and THONART, P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology*, April 2004, vol. 96, no. 4, p. 742-749.

20. *Стаття у журналі*: Zongzhong Yu, Guocheng Du, Jingwen Zhou, Jian Chen Enhanced α -ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by an improved integrated fed-batch strategy. *Bioresource Technology* Volume 114, June 2012, Pages 597-602.

21. *Стаття у журналі*: Coelho, M. A. Z. Amaral, P. F. F. Belo, Isabel. *Yarrowia lipolytica* : an industrial workhorse. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*; Mendez-Vilas, A., Ed.; Formatex Research Center: Badajoz, Spain, 2010; pp. 930–944.

22. *Стаття у журналі*: M Mahmood Hussain, Niels Nijstad, and Lisa Franceschini. Regulation of microsomal triglyceride transfer protein. *Clin Lipidol*. 2011 Jun; 6(3): 293–303. Fvailable in PMC 2012 Apr 1.

23. **MycoBank database** [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/field/Mycobank%20%23/108643>

24. **KEGG**: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.genome.jp/kegg/> .

25. **Fatty acid degradation - Reference pathway** [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/map00071>

26. Технічні засоби очищення газових викидів : навч. посібник / Г.С. Ратушняк, О.Г. Лялюк . – Вінниця; ВНТУ. – 2005. – 158 с
27. Дезекон ОМ, витримка з сайту виробника [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.baltiachemi.ee/et/production/medicine/pinnad/disecon-om/>
28. Солізим/ Baltiachemi, витримка з сайту виробника [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.baltiachemi.ee/et/production/medicine/instrumendid/solizyme/>
29. Санітаб, витримка з сайту виробника [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/dezsredstvo-sanitab>
30. Дезмарк 300, витримка з сайту виробника [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://uht24.ua/ru/products/sredstvo-dezinfitsiruyushchee-dezmark-300-1-kg>
31. Максисан, витримка з сайту виробника [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://ukranalitika.com.ua/ua/goods/dezinfitsiruyushchie-sredstva/dezinfitsiruuschii-kontsentrirovanniyi-rastvor-maksisan-1-1>
32. В. В. Мотроненко, Т. М. Луценко, Л. М. Дронько «Біотехнологія та біоінженерія. Частина 1. Основи біотехнології: рекомендації до виконання практичних робіт» – КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022
33. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв, конспект лекцій – НУХТ, 2019
34. Вітюк, Іван Русланович «Вивчення ферментних комплексів продуцентів *Rhizopus tritici* та *Rhizopus oryzae* з метою застосування в біотехнології – НАУ, 2021
35. ГРАВИМЕТРИЧНИЙ МЕТОД АНАЛІЗУ – УДУХТ, 2018
36. Лабораторний маркет. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://labormarket.com.ua/ua/p69127645-analizator-vlazhnosti->

vesovoj.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=18377678563&utm_network=x&utm_adposition=&utm_device=c&utm_matchtype=&utm_target=&utm_group=&utm_term=&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjw3tCyBhDBARIsAEY0XNkkwRqdUpaP4545_LzT3R6Np22mJtsBwrk6Oy3-jc_aTUIzGA_Lm9kaAq0wEALw_wcB

37. А.І. Горова, С.М. Лисицька, А.В. Павличенко, Т.В. Скворцова. Біотехнології в екології: навчальний посібник. – Національний гірничий університет, 2012.

38. Портал Єдиної державної електронної системи у сфері будівництва [Електронний ресурс] / Режим доступу: https://e-construction.gov.ua/laws_detail/3200391384846566485?doc_type=2

39. Матеріали Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Тенденції та перспективи розвитку науки і освіти в умовах глобалізації»: Зб. наук. праць. – Переяслав, 2021.

40. ПРАВИЛА надання послуг з вивезення побутових відходів. Урядовий портал. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.kmu.gov.ua/npas/177428417>

41. В.В. ШАРАВАРА. Охорона атмосферного повітря: Навчальний посібник – Кам'янець-Подільський, 2012

42. Н. Білявський Т.О., Бутченко Л.І. Основи екології: теорія та практикум. – Вінницький національний аграрний університет, 2012

43. Метод. рекомендації до викон. курсов. пр. для студ. напр. підгот. 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заочн. форм навч. / Уклад.: Ю.В.Караш, В.О.Красінько, І.М. Волошина– К.: НУХТ, 2012. – 85 с.

44. Тодосійчук Т.С. et al. Загальна біотехнологія: Метод. вказівки до викон. лаб.

робіт для студентів напряму 0929 – „Біотехнологія”. Київ: НТУУ “КПІ”, 2006. 56 с.