

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

«__» червня 2022 р.

«__» червня 2022 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: «Культивування ліпидовмісних дріжджів *Trichosporon olegionosus* з метою виробництва біодизелю»

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 1

БЕРГУН Юлія Віталіївна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент Оксана НИЧИК

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Я, як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____
(підпис)

Київ - 2022р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 04 ” квітня 2022 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ВЕРГУН Юлія Віталіївна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування ліпидовмісних дріжджів *Trichosporon*
oleiginosus з метою виробництва біодизелю

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи Штам *Trichosporon oleiginosus* ATCC 20509:
продуктивність виходу ліпиду для виробництва біодизелю - 17.37 г/л, більш
дешево середовище для культивування, час культивування- 48
год.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ; Розділ 1. Характеристика цільового продукту; Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента; Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування; Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми; Розділ 5. Специфікація обладнання; Розділ 6. Опис технологічної схеми; Розділ 7. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема 1 лист А1; Технологічна схема 1 лист А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	04.04.2022 – 09.04.2022	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11.04.2022- 15.04.2022	
3	Техніко-економічне обґрунтування	19.04.2022- 22.04.2022	
4	Специфікація вибору технологічно схеми	25.04.2022- 29.04.2022	
5	Специфікація обладнання	01.05.2022- 04.05.2022	
6	Опис технологічної схеми	10.05.2022- 14.05.2022	
7	Креслення технологічної схеми	19.05.2022- 22.05.2022	
8	Креслення апаратурної схеми	24.05.2022- 26.05.2022	
9	Контроль виробництва	26.05.2022- 27.05.2022	
10	Оформлення кваліфікаційної роботи	28.05.2022- 01.06.2022	

Здобувач _____
(підпис)

Юлія ВЕРГУН _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Юрій РЕЗНИЧЕНКО _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений розробленню технологічної схеми для виробництва біодизелю шляхом культивування ліпидовмісних дріжджів *Trichosporon oleaginosus*.

Дипломний проект складається із вступу, семи розділів, списку використаної літератури з 32 найменувань, технологічної схеми та апаратурної схеми (формат А-1 два аркуші). Загальний обсяг роботи – 66 сторінок, 13 таблиць та 1 рисунок.

У порівнянні з іншими штамами *Trichosporon oleaginosus* дає більший вихід цільового продукту. Обґрунтовано склад поживного середовища для культивування. З урахуванням складу поживного середовища запропоновано схему його підготовки та підібрано режими стерилізації його компонентів. Вирощування *Trichosporon oleaginosus* буде відбуватись у колбах на качалках, культивування в інокуляторі об'ємом 8л, 80л та 8000л, а виробниче культивування у ферментері об'ємом 80м³ здійснюється з дотримання асептичних умов. Ділянки виробництва включають: блок допоміжних робіт (приготування титруючи розчинів, та підготовка та стерилізація поживних середовищ), стадії підготовки посівного матеріалу та вирощування культури у виробничому ферментері.

Ключові слова: біодизелю, *T. oleaginosus*, ліпіди, середовище, культивування.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	7
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА... 10	
2.1. Обгрунтування вибору поживного середовища	12
2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки.....	14
2.3 Таксономічний статус біологічного агента.....	15
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	16
3.1 Потреба у цільовому продукті.....	16
3.2 Розрахунок потужності виробництва.....	17
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	18
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	19
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ. 23	
4.1 Обгрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	23
4.1.1 Обгрунтування способу культивування і типу ферментера	23
Вибір типу ферментера.....	25
4.1.2. Обгрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.	26
4.1.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	27
4.1.4 Обгрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища	31
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	36
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	40
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	53
7.1. Мікробіологічний контроль.....	53
7.2. Показники росту і синтезу	54
7.2.1 Визначення концентрації біомаси	55
7.2.2 Визначення концентрації джерела вуглецю	55
ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА:	62

ВСТУП

Актуальність

Через подорожчання нафти та екологічні проблеми , що утворюються від автомобільних газів, зростаючі ціни на традиційні види палива та постійне зменшення кількості їх запасів спричиняють всесвітню енергетичну кризу. Однією з переваг цього палива є те, що сировина, яка використовується для його виробництва , є натуральною та поновлюваною [1].

Біодизельне паливо можна використовувати в звичайних дизельних автомобілях не вносячи жодних змін у двигуни, хоча і старіші транспортні засоби можуть вимагати заміни паливних ліній та інших гумових компонентів. Біодизель також можна зберігати та транспортувати за допомогою звичайного дизельного обладнання та резервуарів. Оскільки біодизель кисневий, він є кращим змащувачем , ніж дизельне паливо, збільшуючи термін служби двигунів, і згоряє більш повно. Дійсно, багато країн запроваджують суміші біодизеля для підвищення рівня мастил низькосірчистого дизельного палив. Завдяки відносно низькому профілю викидів він є ідеальним паливом для використання в чутливих середовищах, таких як сильно забрудненні міста [2].

Підсумовуючи все вище сказане, перехід до біодизелю з кожним роком стає все більш необхідним кроком. Одним з найбільш перспективних способів отримання біодизелю , є саме використання мікробних ліпідів. Тому, на даний час це питання стоїть як ніколи актуально. В даний час вартість біодизеля з вихідної сировини першого покоління на 30% вище порівняно з дизелем на нафтовій основі. Крім того, витрати на виробництво біодизеля сильно пов'язані з вартістю сировини (60- 80% від остаточної ціни на біодизель).

					НУХТ БТЕК 04. 01. 09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Вергун. Ю.В			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Резніченко Ю.М.					5	
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Існують різні способи виробництва з різними видами сировини: рафінована, сира або смажена олії. Також існують різні типи каталізаторів, такі основні, як гідроксиди натрію або калію, такі кислоти, як сірчана кислота, іонообмінні смоли та ліпази [1].

Отже новизною даної роботи є: культивування ліпід синтезуючих дріжджів *T. oleaginosus.*, які характеризуються високою здатністю до синтезу цільового продукту.

Також є дослідження по переробці гліцеринової фракції, це говорить про те що, на теперішній час гліцерин у дуже великій кількості утворюється під час виробництва біодизелю як побічний продукт технології, і з кожним роком швидкість його накопичення зростає.

Одним із перспективних підходів використання гліцерину у біотехнологічній галузі - як субстрат для культивування мікроорганізмів. Перевагами гліцерину перед традиційними вуглецевими субстратами (глюкоза, сахароза, крохмаль тощо) є низька вартість, доступність у великій кількості та вищий ступінь біодеградабельності. Крім цього, використання гліцерину у біотехнологічній промисловості може забезпечити утилізацію відходів біодизельних виробництв, що знизить навантаження на екосистему планети [3].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

За своїми фізичними та хімічними властивостями біодизель являє собою рідину жовтого кольору (може бути різних відтінків в залежності від сировини та способу виготовлення), яка майже не змішується з водою, має високу температуру кипіння та низьку пружність пари, виготовлений з незабрудненої сировини біодизель є нетоксичним [Ошибка! Закладка не определена.].

Відносно висока температура займання біодизелю ,робить паливо досить безпечним у питанні протипожежної безпеки.

Фізико-хімічні показники біодизельного палива наведені у *таблиці 1.1*

Таблиця 1.1

Фізико-хімічні показники біодизельного палива

Назва показника	Національний стандарт України на біодизельне паливо ДСТУ 6081:2009	
	Розмірність	Значення
Вміст ефірів	% (м/м)	96,5
Густина за температури 15 °С	кг/м ³	860-900
Кінематична в'язкість за температури 40 °С	мм ² /с	3,5-5,0
Температура спалаху у закритому тиглі, не менше ніж	°С	120
Масова частка сірки, не більше ніж	мг/кг	10
Коксівність 10% залишку перегонки, не більше ніж	% (м/м)	0,3
Цетанове число, не менше ніж		51
Зольність, не більше ніж	% (м/м)	0,02
Вміст води, не більше ніж	мг/кг	500
Вміст механічних домішок, не більше ніж	мг/кг	24
Випробування на мідній пластинці (3 години при 50 °С)	оцінка	клас 1
Окисна стабільність, 110 °С, не менше ніж	годин	6,0
Кислотне число, не більше ніж	мг КОН/г	0,50
Йодне число, не більше ніж	гJ ₂ /100	120

					НУХТ БТЕК 04. 01. 09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Акрюшів
Розроб.		Вергун.Ю.В					7	
Перевір.		Резніченко Ю.М.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Метиллові ефіри ліноленової кислоти, не більше ніж	% (м/м)	12,0
Поліненасичені (>4= подвійні зв'язки) метиллові ефіри	% (м/м)	1
Зміст метанолу, не більше ніж	% (м/м)	0,20
Вміст моногліцеридів, не більше ніж	% (м/м)	0,80
Зміст дігліцеридів, не більше ніж	% (м/м)	0,20
Вміст тригліцеридів, не більше ніж	% (м/м)	0,20
Вільний гліцерин, не більше ніж	% (м/м)	0,02
Спільний гліцерин, не більше ніж	% (м/м)	0,26
1-а група лужних металів (Na+K), не більше ніж	мг/кг	5,0
2-а група лужних металів (Ca+Mg), не більше ніж	мг/кг	5,0
Вміст фосфору, не більше ніж	мг/кг	10,0

При роботі дизельних двигунів на біодизелі значно зменшуються небезпечні для навколишнього середовища викиди продуктів згорання: сірки на 98 %, сажі – на 50-61%, вуглекислих продуктів згорання – на 30-40%. Біодизель є найважливішим біопаливом, виробленим в ЄС, і становить близько 80% загального ринку транспортного біопалива, тоді як на біоетанол припадає решта. У 2017 році світове виробництво біодизелю становило приблизно 15,295 млн. літрів [5].

Вибір вихідної сировини для виробництва біодизелю здебільшого визначається кліматом та географічним положенням виробництва рослин. Для виробництва біодизелю переважно використовують ріпакову, соєву, соняшникову або пальмову олії. Ці олії також використовують для готування їжі, а отже, вони не мають негативний вплив на ціноутворення. Вони розглядаються як перше покоління біодизельної сировини. Наприклад, неїстівні джерела, такі як: ятрофа, караджа, понгамія, жожоба або мікробні ліпіди (від олійних мікроорганізмів культивуються на гідролізатах лігноцелюлози) класифікуються як біодизель другого покоління [6].

Згідно законодавства України щодо сприяння виробництву та використанню біологічних видів палива визначено, що біодизельне паливо(біодизель)- це метиллові або етилові ефіри вищих органічних кислот,

отриманих з рослинних олій або тваринних жирів, що використовуються як біопаливо або біокомпонент [7].

Підсумовуючи все вище сказане, перехід до біодизелю з кожним роком стає все більш необхідним кроком. Одним з найбільш перспективних способів отримання біодизелю, є використання мікробних ліпідів. Тому, на даний час це питання стоїть як ніколи актуально.

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

На даний момент, є ряд продуцентів ліпідів, які є перспективними для виробництва біопалива, а саме дріжджі, бактерії, гриби та мікроводорості [8].

Основною перевагою технологій виробництва біодизеля за участі мікроорганізмів у порівнянні з класичною технологією є те, що їх можна вирощувати в рідкому середовищі в контрольованих умовах і легко обробляти.

Мікроводорості, в порівнянні з іншими продуцентами мають один суттєвий недолік, а саме, обмежені маніпуляції з генетичної трансформації для ядерних та хлоропласних геномів [9].

Моделей видів мікроводоростей не вистачає, оскільки процес модифікації даних еукаріотичної клітини є складним. Тому в даний час досліджуються інші мікроорганізми, здатні накопичувати внутрішньоклітинні ліпіди у кількостях більше 20% від сухої маси клітини. Дослідження демонструють, що дріжджі є більш ефективними, ніж бактерії та мікроводорості в плані накопичення ліпідів та різних параметрів процесу [10]. Серед дріжджів представники родів *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Lipomyces* і *Trichosporon* вважаються олеогенними. За певних умов культивування дріжджі здатні накопичувати до 50–76% ліпідів із сухої маси клітини [11].

Серед представлених продуцентів ліпідів свою увагу зосередимо на перспективних представниках роду *Trichosporon*.

Перевага маслянистих культур дріжджів – незалежність від погодних умов, більш значимих у випадку з рослинами, а також відсутність синтезу ендотоксинів, що є значним недоліком при роботі з бактеріями. Залежно від виду дріжджів для досягнення фази стабільного накопичення ліпідів (стаціонарна фаза) потрібно майже 3–7 днів.

					НУХТ БТЕК 04. 01. 09 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Вергун.Ю.В				10	
Перевір.		Резніченко Ю.М.			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.					10		
Затверд.		Стабніков В.П.					

Крім того, маслянисті дріжджі мають унікальну здатність синтезувати ліпіди, споживаючи велику кількість поновлюваних субстратів, таких як органічні залишки сільського господарства та промисловості, що може зменшити виробничі витрати [12].

Як найактивніші продуценти досліджують різні мікробні культури, зупинимось на трьох найперспективніших.

У статті [13] рівень концентрації біомаси *T. Cutaneum* В3 сягає 15,2 г/л. У новіших статтях штам *T. fermentans* СІСС 1368 досягає максимальної концентрації біомаси 22,77 г/л [14]. Найпродуктивнішим з усіх порівняльних мікроорганізмів, є дріжджі *T. oleaginosus* АТСС 20509.

Порівняльну характеристику та технологічних особливостей культивування даних продуцентів для отримання ліпидовмісної біомаси наведено у *табл. 2.1*. Найвищий показник синтезу продукту 44,48 г/л досягається при культивуванні *T. oleaginosus*. Нижча концентрація цільового продукту спостерігається у *T. cutaneum* В3 (15,2 г/л) та у *T. fermentans* СІСС 1368 (22,77 г/л). Тривалість культивування *T. oleaginosus* становить 48 год, *T. cutaneum* В3 – 72 год, а *T. fermentans* СІСС 1368– 120 год.

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів ліпідів для отримання біопалива

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація біомаси, г/л	Концентрація ліпідів, г/л	Умови культивування	Література
<i>T.oleaginosus</i> АТСС 20509	Гліцерин 40; Na ₂ HPO ₄ – 0,95; NH ₄ Cl – 1,616; ЕДТА – 0,1; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,2; Пептон - 0,4; CaCl ₂ ·2H ₂ O – 0,04; FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,0055; ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,001; MnSO ₄ ·H ₂ O – 0,00076.	44,48	17.37 ± 1.22	28 ⁰ С рН 6.5. 48год.	Zhang X., Chen J., Wu D., Li J., Tyagi R. D., & Surampalli R. Y. "Economical lipid production from <i>Trichosporon oleaginosus</i> via dissolved oxygen adjustment and crude glycerol addition." <i>Bioresource technology</i> 273. 2019: 288-296.

Закінчення табл. 2.1

<i>T. cutaneum</i> ВЗ	Глюкоза – 60; Дріжджовий екстракт – 3,0; KH ₂ PO ₄ – 0,75; MgSO ₄ – 0,4.	15,2	12,528	72 год, 28°C, pH 5,8	Wang, Y., Yan, R., Tang, L. et al. Dimorphism of <i>Trichosporon cutaneum</i> and impact on its lipid production. <i>Biotechnol Biofuels</i> . 2019, 12, 203. doi:10.1186/s13068-019-1543-3
<i>T. fermentans</i> CICC 1368	Фруктоза - 70.0; NH ₄ Cl - 1.37; MgSO ₄ ·7H ₂ O - 1.5; (NH ₄) ₂ SO ₄ - 5.0; KH ₂ PO ₄ - 3.6; CaCl ₂ ·2H ₂ O - 4.0; Цитратна кислота·H ₂ O - 0.52; FeSO ₄ ·7H ₂ O - 0.55; MnSO ₄ ·H ₂ O - 0.076; ZnSO ₄ ·7H ₂ O - 0.10; 100 мг 18 М H ₂ SO ₄	22,77	6,5	120 год, 28°C	Bao, R., Wu, X., Liu, S., Xie, T., Yu, C., & Lin, X. Efficient Conversion of Fructose-Based Biomass into Lipids with <i>Trichosporon fermentans</i> Under Phosphate-Limited Conditions. <i>Applied Biochemistry and Biotechnology</i> . 2017, 184(1), 113–123. doi:10.1007/s12010-017-2536-y

2.1. Обґрунтування вибору поживного середовища

Порівняльна характеристика продуцентів, наведена у табл. 2.1, є недостатньою. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента порівнювали вартість поживних середовищ (табл. 2.2). Дані, наведені у табл. 2.2, засвідчують, що середовище для культивування *T. oleaginosus* є найдешевшим, ніж середовище для культивування *T. cutaneum* ВЗ та *T. fermentans* CICC 1368. Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент розраховували умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3).

Узагальнивши всі дані, можна зробити висновок, що доцільніше використовувати для одержання ліпидовмісної біомаси продуцент *T. oleaginosus*. Середовище для культивування має найнижчу собівартість за 1 л, а саме 2,76 грн/л.

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування
Trichosporon cutaneum В3, *Trichosporon oleaginosus* ATCC 20509 та
Trichosporon fermentans CICC 1368**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації
<i>T. oleaginosus</i> ATCC 20509	Гліцерин – 40	50	2	1
	Na ₂ HPO ₄ – 0,95	250	0,2375	1
	NH ₄ Cl – 1,616	113,4	0,1832	1
	ЕДТА – 0,1	105,56	0,0105	2
	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,2	14,25	0,0028	1
	Пептон – 0,4	750	0,3	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O – 0,04	65	0,0026	1
	FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,0055	2,4	0,00001	2
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,001	80	0,00008	1
	MnSO ₄ ·H ₂ O – 0,00076	45	0,00003	1
Вартість 1 л середовища – 2,76 грн				
<i>T. cutaneum</i> В3	Глюкоза – 60	50	3	1
	Дріжджовий екстракт – 3	1100	3,3	3
	K ₂ HPO ₄ – 0,75	120	0,09	1
	MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,5	14,25	0,007125	1
Вартість 1 л середовища – 6,4 грн				
<i>T. fermentans</i> CICC 1368	Фруктоза – 70,0;	80	5,6	1
	NH ₄ Cl – 1,37;	113,4	0,1553	3
	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 1,5;	14,25	0,0213	3
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 5,0;	20	0,1	1
	KH ₂ PO ₄ – 3,6;	120	0,432	1
	CaCl ₂ ·2H ₂ O – 4,0;	65	0,26	1
	Цитратна кислота·H ₂ O – 0,52;	40	0,0208	1
	FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,55;	2,4	0,00132	1
	MnSO ₄ ·H ₂ O – 0,076;	45	0,00342	1
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,10;	80	0,008	1
	100 мкл 18 М H ₂ SO ₄	1370,125	0,137	2
Вартість 1 л середовища – 6,74 грн				

Примітка: * - Ціни вказано станом на січень 2021 р. :

1. [https://prom.ua.](https://prom.ua/), 2. <https://flagma.ua/>, 3. <https://all.biz/uk/>.

Умовна вартість 1г цільового продукту

Біологічний Агент	Концентрація біомаси г/л	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація ліпідів г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Концентрація цільового продукту утвореного за годину, г/год
<i>T.oleaginosus</i> ATCC 20509	44,48	2,76	17.37	0,06	48	0,93
<i>T.cutaneum</i> ВЗ	15,2	6,4	12,528	0,42	72	0,21
<i>T.fermentans</i> ССС 1368	22,77	6,74	6,5	0,3	120	0,18

Підсумовуючи можна сказати, що *T. oleaginosus* ATCC 20509 є перспективним продуцентом для виробництва ліпидовмісної біомаси з подальшим виробництвом біодизелю. У порівнянні з вище описаними продуцентами, цей мікроорганізм має меншу собівартість поживного середовища для культивування, а також більшу біосинтезуючу здатність до виробництва цільового продукту.

Отже, в якості основного продуцента ліпидовмісної біомаси, обираємо дріжджі *T. oleaginosus* ATCC 20509.

2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки

Колонії *Trichosporon oleaginosus* - це дріжджоподібні, швидко зростаючі, гладкі, зморшкуваті, підняті, складені, голі до оксамитових, тьмяні, ламкі, воскові, білі або жовтуваті-білі до кремового кольору. Зовнішній вигляд зморшок стає більш помітним з часом. Типовим є скупчення в центрі колонії. Вироблення ферментів уреазі є важливою особливістю цього роду. Часто зустрічаються міцелієподібні клітини різної довжини з поперечними перегородками. У клітинах добре помітні жирові включення. Діаметр клітин 2 – 5, довжина 10 – 15 мкм і більше. *Trichosporon oleaginosus*, окислює численні органічні сполуки, включаючи деякі токсичні (напр., фенол), відіграє важливу роль в системах аеробної переробки стоків.

2.3 Таксономічний статус біологічного агента

- Домен – *Eukaryota*
- Відділ – *Basidiomycota*
- Клас – *Tremellomycetes*
- Родина – *Trschosporonaceae*
- Рід – *Trichosporon*
- Вид – *Trichosporon oleaginosus* [32]

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1 Потреба у цільовому продукті

Біопаливо є відновлюваними заміниками викопного палива з вищими екологічними вигодами порівняно з викопним паливом, але їх виробництво все ще є економічно неконкурентоспроможним. Тому уряди кількох країн підтримують виробництво біопалива через податкові пільги для виробників. Виробництво біопалива зменшує надмірну залежність від імпортованого викопного палива, сприяє економічному зростанню сільських регіонів та зменшує викиди парникових газів[15].

Біодизель є найважливішим біопаливом, виробленим в ЄС, і становить близько 80% загального ринку транспортного біопалива, тоді як на біоетанол припадає решта. У 2017 році світове виробництво біодизелю становило приблизно 15,295 млн. літрів[16].

За 10 місяців 2018 році споживання бензинів і дизельного пального (ДП) в Україні склало 5,9 млн тонн - на 2,1% (на 123,5 тис. тонн) більше, ніж у січні-жовтні 2017 року. Про це повідомляє Державна служба статистики України (Держстат)[15].

У жовтні споживання пального 2018 р становило 760,1 тис. тонн - на 6,2% більше, ніж у жовтні 2017 року [17].

Тенденції споживання бензинів та дизпального різновекторні: бензинів - падає, дизпального - росте. Зокрема, за 10 місяців ринок ДТ склав 5,42 млн тонн - на 10% (507 тис. тонн) більше, ніж за аналогічний період 2017 року. Українські НПЗ забезпечили 13% споживання, решту покрив імпорт.

Тим часом, обсяг українського ринку бензину скоротився на 3,3% - до 1,64 млн т. Імпорт знизився на 8% до 934 тис. тонн. Внутрішнє виробництво за цей період зросло на 3% - до 704 тис. Тонн [17].

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04. 01. 09 КР ПЗ		
Розроб.		Вергун.Ю.В			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Резніченко Ю.М.				16	
Реценз.					Кафедра БТМ 16		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

За 5 місяців 2020 року в Україні вироблено дизельного пального – 391,2 тис. тонн, що на 24,8% більше. Ніж за 5 місяців 2019 року [15].

Оскільки, дані щодо реалізації біодизелю в Україні відсутні, то ми будемо брати невелику частку від виробленого дизельного пального (а саме, 2% від загального об'єму виробництва за 5 місяців).

За даними Держстату, щороку споживання пального в агрогалузі зростає в середньому на 110 тисяч тонн, зокрема завдяки поповненню парку тракторів, комбайнів та вантажівок. Збільшення парку на одиницю агротехніки означає в середньому збільшення купівлі пального на 44 тонни за рік [16].

Наприклад, за даними Міністерства економіки та сільського господарства землероби Івано-Франківської – 17,2 тисячі тонн, Чернівецької – 6,6 тисяч тонн, та Закарпатської областей – 2,4 тисячі тонн [18].

Подальший розрахунок будемо зосереджувати для забезпечення потреб Закарпатської області.

3.2 Розрахунок потужності виробництва

Для стандартної технології одержання біодизелю з ліпідів коефіцієнт перерахунку ліпідів на метилові естери жирних кислот складає 95%. Кількість ліпідів, що необхідна для виробництва такої кількості біодизелю:

$$100\% - 17,37 \text{ г/л}$$

$$95\% - x \text{ г/л}$$

$$X = \frac{95 \times 17,37}{100} = 16,5 \text{ г/л}$$

Спочатку, пропонуємо, що ми будемо забезпечувати 2% від загального об'єму споживання по Закарпатській області:

$$2400 \text{ тис. тонн} - 100\%$$

$$X. \text{ тис. тонн} - 2\%$$

$$X = \frac{2400 \times 2\%}{100\%} = 48 \text{ тонн.}$$

Далі, для подальшого розрахунку, тонни пального (48 тонн) переводимо у літри -

$$48000\text{л} - \text{біодизелю}$$

Для одержання такої кількості біодизелю річний об'єм культуральної рідини має становити:

$$16,5 \text{ г/л} - 1 \text{ л}$$

$$X \text{ г/л} - 48000 \text{ л}$$

$$16,5 \text{ л} = 0,0165 \text{ м}^3$$

$$48000/0,0165 = 2909091 \text{ л культуральної рідини}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (40 %), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{кр.} = 2909091/(1-(0,3+0,1)) \approx 4848485 \text{ л}$$

Тобто, для отримання 48000 л – біодизелю необхідно 4848 м^3 культуральної рідини

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для забезпечення біодизелем розрахункову потребу ринку, потрібно одержати (з врахуванням втрат при виділенні) 4848 м^3 культуральної рідини ($V_{гп}$) (див. підрозділ 1.2). Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) 330, тоді кількість продукту на добу ($V_{д}$) становитиме:

$$V_{д} = V_{гп}/T_{рд} = 4848485/330 = 14692 \text{ л/доба}$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{кр} = (K_1 \times V_{д} \times T_{цф})/24 = (1,1 \times 14692 \times 59)/24 \approx 39729 \text{ л/цикл}$$

де, $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (48 год) та час підготовки ферментера до роботи (11 год).

Тоді таку кількість культуральної рідини можна отримати у ферментері геометричний об'єм якого має становити:

$$V_{г} = V_{цк}/K_3 = 39729/0,6 = 66215 \text{ л.}$$

Найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_{ф} = 63000 \text{ л}$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зф} = V_{цк}/V_{ф} = 39729/63000 = 0,6, \text{ що не перевищує заданого значення.}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 39729$ 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:

$$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-E_f) = 39729/(1-0,15) = 46740\text{л},$$

де E_f – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом

$$V_{роб.1} = 46740\text{л}.$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,5-0,6$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера (V_f), що становить

$$V_f = V_{роб.1}/K_{зап} = 46740/0,6 = 77900\text{л}.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 80000\text{л}$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап1} = V_{роб.1}/V_{сф} = 46740/80000 = 0,58$$

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:

$$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+X_f) = 46740/(1+0,1) = 42491\text{л},$$

де $X_f = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 46740 - 42491 = 4249\text{л}.$$

Для одержання 4249л 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:

$$V_{роб.2} = V_{пм1}/(1-E_{па}) = 4249/(1-0,10) = 4721 \text{ л.}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити

$$V_{пс2} = V_{роб.2}/(1+X_{па}) = 4721/(1+0,1) = 4292 \text{ л,}$$

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

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 4721 - 4292 = 429 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 4721 \text{ л}$ можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{па2} = V_{роб.2}/K_{зап} = 4721/0,6 = 7868 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} 8000 \approx \text{л}$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.2}/V_{сф} = 4721/8000 = 0,59.$$

Для одержання 429 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

$$V_{роб.3} = V_{пм2}/(1-E_{ін}) = 429/(1-0,10) = 477 \text{ л.}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$$V_{пс3} = V_{роб.3}/(1+X_{ін}) = 477/(1+0,1) = 434 \text{ л,}$$

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

Кількість посівного матеріала для інокулятора становить

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 477 - 434 = 43 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.3} = 477 \text{ л}$ можна одержати під час культивування в інокуляторі геометричним об'ємом

$$V_{in3} = V_{роб.3} / K_{зап} = 477 / 0,6 = 795 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 800$ уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.3} / V_{сф.} = 477 / 800 = 0,59$$

Для одержання 43 л посівного матеріалу в малому 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 малому інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.4} = V_{пм3} / (1 - E_{ін}) = 43 / (1 - 0,10) = 48 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) для малого інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища в малому інокуляторі.

Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде становити

$$V_{пс4} = V_{роб.4} / (1 + X_{ін}) = 48 / (1 + 0,1) = 44 \text{ л,}$$

де $X_{ін} = 0,10$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 48 - 44 = 4 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.4} = 48$ л можна одержати під час культивування дріжджів в малому інокуляторі геометричним об'ємом:

$$V_{ін4} = V_{роб.4} / K_{зап} = 48 / 0,6 = 80 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 80 \text{ л}$ уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.4} / V_{сф} = 48 / 80 = 0,6$$

Для одержання 4 л посівного матеріалу в малому 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 малому інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.5} = V_{пм4} / (1 - E_{ін}) = 4 / (1 - 0,10) = 4,44 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) для малого інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища в малому інокуляторі.

Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде становити

$$V_{пс5} = V_{роб.5} / (1 + X_{ін}) = 4,44 / (1 + 0,1) \approx 4 \text{ л,}$$

де $X_{ін} = 0,10$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм5} = V_{роб.5} - V_{пс5} = 4,44 - 4 = 0,44 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.5} = 4,44$ л можна одержати під час культивування дріжджів в малому інокуляторі геометричним об'ємом:

$$V_{ін5} = V_{роб.5} / K_{зап} = 4,44 / 0,6 = 7,4 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 8$ л уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.5} / V_{сф} = 4,44 / 8 = 0,56$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{пм5} = 0,44$ л можна одержати культивуванням 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:

$N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} \cdot K_{зк}) = 440 / (750 \cdot 0,2) = 2,93$. Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 3 качалочні колби. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу кормових дріжджів у ферментері об'ємом 80 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у п'ять етапів та шостий етап процес виробничого біосинтезу.

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1 Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Основними вимогами до посівних апаратів є те, що вони мають забезпечити асептичні умови у процесів культивування продуцента при аерації, та масообмінних процесах, які протікають в середині біореактора. Щоб визначити який саме потрібен ферментер необхідно керуватися даними про процес культивування.

Для культивування *Trichosporon oleaginosus* потрібно підібрати такий ферментер, який задовольнить у мови проведення процесу. Тому, для визначення умов біосинтезу, звертаємо увагу на фізіолого-біохімічні особливості продуцента.

Спосіб культивування *T. oleaginosus* обираємо на основі фізіолого-біохімічних ознак продуцента. Так як *T. oleaginosus* є факультативним анаеробом, виробниче культивування і вирощування даного продуценту відбувається за постійної аерації через барботер.

Виробниче культивування і вирощування посівного матеріалу відбувається за температури 28⁰С і рН 6,5. Для запобігання контамінації проводиться стерилізація обладнання (інокулятори, збірники, ферментери), комунікацій, поживних середовищ для культивування, розчину титрувального агента.

В якості ферментаційного обладнання використовуємо ферментер з лопатевою мішалкою відкритого типу, в якості перемішуючого пристрою, та відбійниками. Ферментери такого типу, використовуються найчастіше, так як вони дозволяють легко змінювати технологічні умови та ефективно забезпечувати інтенсифікацію масообміну, що визначає характер росту продуцента і його біосинтетичну активність[19].

					НУХТ БТЕК 04. 01. 09 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Літ.	Арк.	Акрюшів
Розроб.		Вергун.Ю.В				23	
Перевір.		Резніченко Ю.М.			РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ		
Реценз.					Кафедра БТМ 23		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

Використовують тихохідну лопатеву мішалку (рис.3.1.), оскільки вона створює коловий потік рідини, що забезпечує оптимальні умови для культивування мікроорганізму. Найбільш простою і одночасно високоефективною є мішалка з прямими лопатями, що розташовані радіально. Плaskі лопатки можуть також бути нахилені під певним кутом відносно площини обертання мішалки, що зменшить витрати енергії і вигідно виділяє цей тип мішалки з –поміж інших [20].



Рис.3.1. Лопатєва мішалка

З точки зору характеру процесу культивування мікроорганізмів-продуцентів усі технологічні процеси біотехнологічного виробництва поділяються на дві принципово різні групи : в першому випадку ферментація ведеться глибинним методом у рідкому поживному середовищі , а в другому-використовується поверхнева культура, яка росте на спеціально підготовленому пухному і зволоженому поживному середовщі [21].

При поверхневому методі культура росте на поверхні твердого зволоженого поживного середовища. Міцелій повністю обволікує і доволі міцно скріплює тверді частинки. Клітини живляться за рахунок поживних речовин середовища і використовують для дихання кисень повітря, тому для нормального забезпечення киснем потрібно проводити рихлення по всій структурі середовища з невеликою висотою шару. Це призводить до

необхідності мати велику поверхню контакту рихлого середовища з повітрям, тобто значних виробничих площ, а за відсутності механізації вимагає і великих витрат ручної праці [12].

Для накопичення біомаси культури обираємо саме культивування глибинно-періодичним способом. Безперервне культивування є недоцільним, оскільки активний поділ клітин відбувається експоненційній фазі росту.

Отже, культивування дріжджів *T. oleaginosus*, під час виробничого біосинтезу, будемо здійснювати за постійної аерації, глибинно-періодичним способом, за температури 28⁰С, при рН 6.5.

Вибір типу ферментера

Враховуючи всі фізіологічні – біохімічні особливості *T. oleaginosus* та спосіб його культивування, обираємо ферментер, в якому основним конструктивним елементом є перемішувач (лопатева мішалка), що забезпечує високу інтенсифікацію процесу.

Для зберігання та регуляції сталої температури культивування у системі, ферментер оснащується сорочкою та датчиком для контролю температури, сорочка повинна мати термозахист, щоб перешкоджати вивільненню тепла за межі ферментера.

За даними наукової статті [22], культивування *T. Oleaginosus* здійснюють контроль оптимального значення рН середовища, а саме рН 6,5. Тому, використовуємо автоматичні системи рН-стабілізації (рН-метри).

Таблиця 4.1

Результати розрахунку об'ємів ферментаційного обладнання для підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу

Об'єм ферментера, м3	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, м3	Об'єм посівного матеріалу (10%), м3	Конденсат (10%), м3	Об'єм поживного середовища, м3
10	0,6	6	0,6	0,6	5,4
1	0,6	0,6	0,06	0,06	0,54
0,1	0,6	0,06	0,006	0,006	0,054
0,01	0,6	0,006	0,0006	-	0,0054

4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.

Підготовку аераційного повітря обираємо на основі фізіолого-біохімічних ознак продуцента. Так як *T. oleaginosus* є факультативним анаеробом, виробниче культивування і вирощування даного продуценту відбувається за постійної аерації через барботер.

Для стерилізації повітря в боксах та лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом, використовують УФ-лампи (опромінення ультрафіолетовими променями).

Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізують за допомогою фільтрів грубої очистки (головні фільтри) та індивідуальних фільтрів (фільтрів високої ефективності). Для надтонкого очищення повітря використовують фільтри типу HEPA або ULPA. Фільтруючим матеріалом у них виступає скловолокно, викладене в гофру для збільшення площі фільтрації. Такі фільтри здатні вловлювати частинки, менші 10 мкм. При цьому вони мають клас фільтрації H10-H14 [15].

У фармацевтичній промисловості для надтонкого очищення, а також для створення антибактеріальної повітряного середовища використовують фільтри типу HEPA, які є аерозольними фільтрами. Такий вид фільтрів використовується для очищення повітря від сухих твердих аерозолів в чистих приміщеннях, а також для очищення викидів в атмосферу (фільтри встановлюються безпосередньо перед кожним ферментером) [Ошибка! Закладка не определена.].

Технологічна схема стиснення й очищення повітря

- Атмосферне повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту на висоті 20-30 м.
- Повітря потрапляє у фільтри попереднього очищення (фільтри грубого очищення).
- Далі повітря потрапляє до компресора, для подальшого його стискання (при цьому повітря нагрівається до температури 120–200 °С).

- Щоб забезпечити випадання вологи в краплевловлювачі, повітря «переохолоджують до температури 25-40 °С в теплообмінному апараті.
- Потім повітря потрапляє до ресиверу – де стабілізується та врівноважується тиск у системі.
- Після ресиверу повітря, для забезпечення надійної роботи фільтрів другого і третього рівнів, нагрівають до температури 70-90 с. При таких температурах не відбувається конденсація пари і на волокнах фільтра.
- Далі повітря потрапляє на систему з двох фільтрів другого і третього рівнів і очищення. Фільтр другого рівня, або головний фільтр, зазвичай розміщений на території заводу поруч із цехом(ступінь очистки E=95%). На головному фільтрі очищають повітря для усіх ферментаторів цеху. З головного фільтра повітря колектором подається в індивідуальні фільтри третього рівня (ступінь очистки E 99,99%), встановлені на кожному ферментаторі незалежно від його місткості[16].

4.1.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Дезінфекція і Очищення в промисловості є важливими процесами будь-якого виробничого процесу. Потрібно знати і пам'ятати , що очищення і дезінфекція – це два різних між собою процеси.

Дезинфекція— система заходів знезаражування об'єктів зовнішнього середовища, спрямована на повне, часткове або селективне знищення потенціально патогенних для людини мікроорганізмів. Очищення – це повне видалення пилу і залишків з поверхонь, після чого вони є візуально чистими [23].

Процес та порядок виконання миття і дезінфекції:

Миючі засоби (детергенти) – це група засобів побутової хімії, призначених для очищення різних поверхонь і матеріалів від всякого роду забруднень або поверхнево-активна речовина зі очисними властивостями.

Миючі засоби розділяються за призначенням, консистенцією, видами миючої речовини, вмісту миючої речовини і іншими ознаками.

Документація повинна містити- результати випробувань біологічного

розкладу поверхнево-активних речовин, що входять до складу мийного засобу; результати випробувань мийного засобу щодо вмісту в ньому фосфатів та інших сполук фосфору; технічний опис інгредієнтів [24].

За призначенням миючі засоби поділяються:

- на господарські;
- туалетні;
- спеціальні (медичні, технічні й ін.).

За консистенцією розрізняють миючі засоби:

- тверді (кускові, гранульовані, порошкові);
- мазеподібні (пасти); [25]

Миючі засоби повинні бути:

- Добре розчинні у воді;
- Володіти високими миючими властивостями;
- Біологічно руйнуватися у воді (більше 80%) тому що вони негативно впливають на процеси природного самоочищення ;
- Легко і швидко змиватися з посуду, інвентарю тощо;

Не повинні бути:

- Накопичуватися в організмі людини;
- Мати різкий і стійкий запах;
- Впливати на якість продуктів;
- Надавати шкідливої дії на миючі об'єкти [26].

Ефективність миючих засобів залежить від ступеня і роду забруднень, а також від поверхні, на якій вони застосовуються. Щоб правильно вибрати концентрат для очищення, потрібно знати на якій поверхні він буде застосовуватися, з яким типом забруднення зіткнеться, при цьому, не забуваючи уважно читати інструкцію перед використанням.

Жирове або білкове забруднення (наприклад, масло, жир, нагар або кіптява), найбільш ефективними будуть лужні концентрати, рівень рН яких коливається від 8 до 14. Від більш складних плям позбуваються за

допомогою середньолужних складів Найбільш агресивними для слизової оболонки і шкіри рук є сильнолужні засоби

Мінеральні забруднення (іржа, вапняковий наліт, винний, молочний, пивний камені), найбільш оптимальними будуть кислотовмісні концентрати з рівнем рН від 1 до 6. Кислотні миючі засоби використовуються на поверхнях, стійких до дії агресивного середовища. Для усунення мінеральних відкладень підвищеного ступеня складності потрібно застосовувати кислотні засоби з підвищеним ступенем концентрації Як правило, їх використовують для очищення обладнання в харчовій промисловості – бойлерів, генераторів пара тощо [27].

Дезінфекція – це процес знищення або видалення з об'єктів навколишнього середовища збудників інфекційних хвороб, вегетативних форм збудників бактеріальних інфекційних хвороб, а також вірусів, рикетсій, токсинів, найпростіших, грибів

Основна мета дезінфекції – це запобігання чи ліквідація процесу накопичення, розмноження і поширення збудників інфекційних захворювань на об'єктах навколишнього середовища.

Розрізняють такі дезінфекційні заходи:

- власне дезінфекція – знищення патогенних мікроорганізмів на об'єктах навколишнього середовища;
- дезінсекція – знищення членистоногих-переносників;
- дератизація – винищування гризунів;
- стерилізація – повне знищення на об'єктах навколишнього середовища мікроорганізмів та їх спор.

Розрізняють два види дезінфекції:

- профілактичну
- осередкову

Методи дезінфекції

Дезінфекцію проводять за допомогою:

- механічного;

- фізичного;
- хімічного;
- біологічного;
- комбінованого методів.

Механічний метод- забезпечує видалення патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів з об'єктів зовнішнього середовища шляхом струшування, вологого протирання, провітрювання, вентиляції, прання, вологого прибирання, чищення предметів.. Механічний метод не призводить до повного звільнення від мікроорганізмів.

Фізичний метод - забезпечує видалення мікроорганізмів з об'єктів шляхом дії таких фізичних чинників:

- висушування;
- високої температури;
- гарячого повітря;
- пари;
- ультрафіолетових променів;
- ультразвуку.

Хімічний метод - заснований на вживанні різноманітних хімічних речовин, що викликають загибель мікроорганізмів. Його використовують з метою знезараження різних об'єктів зовнішнього середовища, повітря, біологічних субстратів. Цей метод є найбільш поширеним та загальноприйнятий у лікувально-профілактичних закладах.

Біологічний метод- знищення збудників інфекційних хвороб у зовнішньому середовищі біологічними засобами має суто специфічне призначення. Цей метод використовується при знезараженні стічних вод на полях зрошування і фільтрації, при компостуванні сміття і відходів, при дезінвазії побутового сміття у біотермічних камерах.

Комбінований метод -дезінфекції ґрунтується на поєднанні декількох вказаних вище методів.

Організація проведення дезінфекції

Профілактична дезінфекція. Показаннями до проведення профілактичної дезінфекції є висока вірогідність накопичення мікроорганізмів і загроза поширення інфекції. Основними об'єктами проведення профілактичної дезінфекції є наступні:

- організації харчової промисловості, торгівлі й громадського харчування, ринки;
- підприємства з переробки і зберігання сировини тваринного походження;
- водозабірні і водопровідні споруди [28].

4.1.4 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Метою стерилізації є звільнення поживного середовища від живих мікроорганізмів або їх форм спокою. Стерилізація поживного середовища залежить від фізико-хімічних властивостей його компонентів.

Середовище для виробничого біосинтезу має такий склад, г/л [12]:

- Гліцерин 40;
- Na_2HPO_4 – 0,95;
- NH_4Cl – 1,616;
- ЕДТА – 0,1;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2;
- Пептон - 0,4;
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,04;
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0055;
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001;
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,00076.

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Trichosporon oleaginosus* оскільки біотехнологічний процес проходить в асептичних умовах, формування композицій здійснюємо залежно від режиму

стерилізації компонентів.

Згідно розрахунків, виробничий біосинтез буде здійснюється у ферментері об'ємом 80м^3 , що містить 46740 л середовища. Одержання інокуляту відбувається у п'ять етапів (у колбах на качалці та інокуляторі об'ємом 8л, 80л, 800л та 8000л).

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

Проаналізувавши склад поживного середовища, для культивування, ділимо його на такі композиції:

Гліцерин стерилізації не потребує.

Композиція А: Пептон (режим стерилізації: 112°C , 30 хв).

Композиція Б: Na_2HPO_4 , (режим стерилізації: 131°C , 60хв).

Композиція В: NH_4Cl , ЕДТА, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131°C , 60хв).

Окремо готуємо запасний розчин для : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131°C , 60хв). Для трьох стадій підготовки (колби на качалках, 8л, 800л). Після приготування запасного розчину солей його додають до композиції В.

Об'єм поживного середовища для культивування в колбах на качалках становить 440 мл, тому його доцільно стерилізувати в автоклаві.

Пептон (композицію А) готують і стерилізують в автоклаві, у колбі об'ємом 200мл за наступних режимів: 112°C , 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Солі композиції Б та В стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати (композиція Б) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію.

Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 8 л

Гліцерин стерилізації не потребує.

Композиція А: Пептон (режим стерилізації: 112°C , 30 хв).

Композиція Б: Na_2HPO_4 ,

Композиція В: NH_4Cl , ЕДТА, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131°C , 60хв).

Для культивування в інокуляторі об'ємом 8 л необхідно приготувати 4л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 0,44 л, загальний об'єм композиції 4,44 л.

Пептон (композицію А) готують і стерилізують в автоклаві, у колбі об'ємом 200 мл за наступних режимів: 112°C , 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Солі композиції Б та В стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати (композиція Б) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію.

Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 80 л

Гліцерин стерилізації не потребує.

Композиція А: Пептон (режим стерилізації: 112°C , 30 хв).

Композиція Б: Na_2HPO_4 ,

Композиція В: NH_4Cl , ЕДТА, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131°C , 60хв).

Для культивування в інокуляторі об'ємом 80 л необхідно приготувати 44л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 4 л, загальний об'єм композиції 48 л.

Пептон (композицію А) готують і стерилізують в автоклаві, у колбі об'ємом 200 мл за наступних режимів: 112°C , 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Солі композиції Б та В стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати (композиція Б) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію.

***Приготування і стерилізація поживного середовища для
культивування в інокуляторі об'ємом 800 л***

Гліцерин стерилізації не потребує.

Композиція А: Пептон (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: Na₂HPO₄, NH₄Cl, ЕДТА, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, FeSO₄·7H₂O, ZnSO₄·7H₂O та MnSO₄·H₂O (режим стерилізації: 131°C, 60хв).

Для культивування в інокуляторі об'ємом 800 л необхідно приготувати 434 л поживного середовища. Враховуючи те, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 43 л, то загальний об'єм композицій 477 л.

Пептон (композицію А) готують і стерилізують в автоклаві, у колбі об'ємом 2 л за наступних режимів: 112°C, 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Солі композиції Б стерилізують при стандартній для солей температурі. . Перед стерилізацією солей композицію доводять до рН 4, розчином НСl, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію.

***Приготування і стерилізація поживного середовища для
культивування у ферментері об'ємом 8000 л***

Гліцерин стерилізації не потребує.

Композиція А: Пептон (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: Na₂HPO₄, NH₄Cl, ЕДТА, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, FeSO₄·7H₂O, ZnSO₄·7H₂O та MnSO₄·H₂O (режим стерилізації: 131°C, 60хв).

Для культивування в інокуляторі об'ємом 8000 л необхідно приготувати 4292 л поживного середовища. Враховуючи те, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 429 л, то загальний об'єм композицій 4721 л.

Пептон (композицію А) готують і стерилізують у реакторі – змішувачі, об'ємом 40 л за наступних режимів: 112°C, 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Солі композиції Б стерилізують при стандартній для солей температурі. .

Перед стерилізацією солей композицію доводять до рН 4, розчином НСІ, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію.

***Приготування і стерилізація поживного середовища для
культивування у виробничому ферментері 80 м³***

Гліцерин стерилізації не потребує.

Композиція А: Пептон, Na₂HPO₄, NH₄Cl, ЕДТА, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, FeSO₄·7H₂O, ZnSO₄·7H₂O та MnSO₄·H₂O (режим стерилізації: 131 °С, 60хв).

Для цієї стадії необхідно приготувати 46740л поживного середовища. Даний об'єм поживного середовища економічно доцільніше стерилізувати в установці безперервної стерилізації. Це дозволить зменшити витрати води, пари та скоротити час обробки поживного середовища. Обираємо УБС-20 з продуктивністю 20 м³/год (час стерилізації становитиме 2,0 год). Температура стерилізації – 130 °С. Всі компоненти, будуть готуватися в одному реакторі-змішувачі.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в *табл. 5.1.*

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрозабірник	2	Пристрій забірний, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень. Фірма: ООО «НПЦ Вектор-Кондвент». Виробник: Україна
ФГО – 2	Фільтр грубої очистки повітря	2	Фільтруючий матеріал – поліестер, швидкість фільтрування 1,5 м/с, Е = 80 %[1].
К – 3	Компресор	1	Компресор серії «ВКП F Industrial». Виробник «Лідер» (Україна), потужність від 8 кВт до 15 кВт, продуктивність 1,2-2,2 м ³ /хв[2].
ТО – 4	Теплообмінник-охолоджувач	2	Витрати до 640 м ³ /год Робочий тиск: 140 атм. Температура: -195°C- +200°C Нержавіюча сталь: AISI 316 Виробник: Швеція [3]
Р – 5	Ресивер	1	Ресивер повітряний 900л. РВ 900.800-04, ресивер повітряний Харків [4]
ТН – 6	Теплообмінник-нагрівач	2	Теплообмінник-нагрівач серії BRW130 фірми ВАОТІ (Китай), потужність 2,2 кВт, приток повітря 1500 м ³ /год
Ф – 7	Фільтр тонкої очистки	1	Модель фільтра FMW. Ступінь очищення повітря 99%. Фільтр складає
			3400 м ³ /год[5].

НУХПБТЕК/04-01.09.КІР/ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Вергун.Ю.В						36	
Перевір.	Резніченко Ю.М.							
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Кафедра БТМ 36

Продовження табл. 5.1

РЗ-8 РЗ-10 РЗ-12 РЗ-14 РЗ-16 РЗ-19	Реактор – змішувач	6	Реактор-змішувач об'ємом 20 л, 80л, 40л та 200л оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (250-500 об/хв), виготовлений зі сталі AISI 360L. Виробник: Україна. [6].
ОВД-17 ОВД-20	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Об'єм бункера: 0,6 м ³ Мінімальна межа дозування: 1 кг Максимальна межа дозування: 50 кг Дискретність: 0,005 г Продуктивність: 800-1200 кг/год Напруга: 220 В Вага: 60 кг Розміри: 870 * 870 * 2100 мм [7].
НВ-9 НВ-11 НВ-13 НВ-15 НВ-18 НВ-21 НВ-31 НВ-34	Насос відцентровий	8	Висота: 400мм Ширина: 400мм Довжина: 750мм Максимальна температура: 40град Мінімальна температура: 1 град Клас захисту корпусів електронного устаткування: IP44 Матеріал робочого колеса: Чавун Матеріал корпусу: Чавун Напруга мережі: 380-400В Виробник: Osean Частота струму: 50Гц Пропускна здатність: 150куб.м/год Максимальний напір: 29м Вага: 90кг [8].
ІН-22 ІН-24 ІН-26 ІН-28	Інокулятор	4	Біореактор, геометричний об'єм 8 л 80л, 800л, 8000л швидкість перемішування 20–1500об/хв, потужність 800Вт [9].
Ф-23 Ф-25 Ф-27 Ф-29 Ф-33	Індивідуальний фільтр очистки повітря	5	Фільтр НЕРАFIL ТАМ-141212, КЛАСУ Н14 компанії «General filter». Вогнетривкий. Фільтруючий матеріал- мікроскловолокно або боросилікат з анодовими алюмінієвими розділювачами. Продуктивність: 7 м ³ /хв Ефективність: E=99,999% Перепад тиску: 140-600 Па Виробник: Італія [10].

Закінчення табл. 5.1

УБС-20	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації, продуктивність 20 м ³ /год. Складається з колонки швидкісного нагріву до 125°C; витримувача, де підтримують дану температуру протягом , хв; теплообмінника-рекуператора та теплообмінника-охолоджувача
ФР-32	Ферментер		Ферментер, геометричний об'єм 80000л, максимальна робоча температура + 150 0С, потужність двигуна від 3 до 15 кВт[9].

1. ФИЛЬТР ГРУБОЙ ОЧИСТКИ (G1-G4) [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://shop.alterair.ua/ru/ventiljacija/komplektujushhie-ventiljicii/filtry/g1-g4-filter/>
2. Компрессор [Електронний ресурс] //Режим доступу: <http://kompressor.kiev.ua/katalog/porshnevye-kompressory/vkp-f-seriya-industrial76.html>
3. Паяные теплообменники Swep [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://termoprom.com.ua/produkt/heat-exchangers/swep.php?gclid=cjwkcaia78anbhaleiwa7b76p4phx1_vluisowtuzsxn6nmoifxogg9frekvxufc5s5zb8ddburlkbocczkqavd_bwe
4. Ресивер [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://harpromteh.all.biz/uk/resyver-povitryanyj-9001-rv-900800-04-resyver-g632669>
5. Фильтр тонкой очистки воздуха [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://tehnofilter.ub.ua/ru/goods/view/6364274/all/filtr-tonkoy-ochistki-vozduha-ftov-hepa-hepa/>
6. Машины по приготовлению [Електронний ресурс] //Режим доступу: https://promvit.com.ua/category/mashiny-po-prigotovleniyu/?gclid=CjwKCAiAksyNBhAPEiwAIDBeLKkJQzLh9pRRVJJNIamUIK6-3aOoMzpPDLJzONn0ci61Bde30-KkvxoCpwwQAvD_BwE

7. Вагові дозатори [Електронний ресурс] //Режим доступу:
https://artmash.ua/category/dozatory?utm_source=google&utm_medium=cpc&keyword=%D0%B2%D0%B0%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%B9%20%D0%B4%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80&utm_campaign=%D0%B4%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80_%D1%83%D0%BA%D1%80&gclid=CjwKCAiAhreNBhAYEiwAFGGKPIMpgVqvS8tX8HBIr0Wpsmch_REwK4LWM-CaPenOrHW_PvRXRGggwBoCuxgQAvD_BwE
8. НАСОС ПРОМИСЛОВИЙ ЗОВНІШНІЙ "ЕТА" 80-65-125-11 [Електронний ресурс] //Режим доступу:
<https://nasosocean.com.ua/ua/p46057772-nasos-promyshlennyj-naruzhnyj.html>
9. Оборудование для ферментирования [Електронний ресурс] //Режим доступу: https://russian.alibaba.com/product-detail/6000l-jacketed-scoby-fermenting-kombucha-brew-fermenter-tanks-micro-brewing-system-1600208290834.html?spm=a2700.7735675.normal_offer.d_title.b4232c6dQnZoF9&s=p
10. GENERAL FILTER [Електронний ресурс] //Режим доступу:
<https://www.generalfilter.com/database/scheda.php?id=1855&lang=ru>

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка повітря

ДР 1.1. Підготовка аераційного повітря

Повітря, яке використовується для аерації у процесі культивування посівного матеріалу в інокуляторі та в процесі біосинтезу в ферментері, повинно бути стерильним та мати температуру 30–35°C.

Перед тим, як повітря потрапляє до ферментеру, воно проходить повну очистку та стерилізацію, в результаті якої звільняється від мікроорганізмів. В ферментер очищене повітря подається через барботер.

ДР 1.1.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря здійснюється повітрозбірником (ПЗ-1) Повітря збирають з висоти приблизно 20-30 м.

Потім повітря через повітрозабірну шахту під дією вентилятора потрапляє до фільтру попереднього очищення (Ф-2).

ДР 1.1.2. Очищення від пилу і механічних часток.

На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром 150-300 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення використовують фільтри грубої очистки – ФЯП. Який складається з рамки, виготовленої з оцинкованої сталі, усередині якої покладений об'ємний фільтруючий матеріал (поліуретан).

Ефективність очищення повітряними фільтрами ФЯП становить 80 %.

ДР 1.1.3. Стиснення повітря

Стиснення повітря здійснюється у компресорі (К-3) при тиску 0,35–0,5 МПа, при цьому температура може підніматися до 200°C.

					НУХТ БТЕК 04. 01. 09 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ					
Розроб.	Вергун.Ю.В							Літ.	Арк.	Акрівів
Перевір.	Резніченко Ю.М.								40	
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.	Стабніков В.П.				40					

ДР 1.4. Охолодження та видалення вологи

Повітря «переохолоджують» до температури 25–40 °С в теплообміннику-охолоджувачі (ТО-4). При охолодженні стисненого повітря випадає 50 – 70 % вихідної вологи, яка відділяється вологовідділювачами.

ДР 1.5 Стабілізація та нагрівання повітря

Для забезпечення надійної роботи головного і індивідуального фільтрів, повітря нагрівають до температури до 60°С в теплообміннику-нагрівачі (ТН-6).

ДР 1.6. Очищення в головному фільтрі

Подальше очищення повітря відбувається у головному фільтрі (Ф-2). Для головних фільтрів використовується фільтр з ефективністю $E = 99,92$ %. З головного фільтра (Ф-7) повітря подається в індивідуальні фільтр, які встановлені на кожному ферментері.

ДР 1.7. Очищення в індивідуальному фільтрі

Для індивідуального очищення повітря використовується індивідуальний мембранний фільтр. Стерилізацію фільтруючого матеріалу проводять парою при температурі 145 °С. Отримуємо стерильне аераційне повітря зі ступенем очищення – 99,9999 %.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1 Підготовка стерильного титрувального агента НСІ для інокулятора 800л.

Стерильний розчин НСІ готують змішуванням концентрованої НСІ з стерильною дистильованою водою в асептичних умовах.

Розрахунок кількості 36 % НСІ необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 6 %, об'ємом 120мл):

$$0,36x = 0,06 \times 120$$

$$0,36x = 7,2$$

$$x = 20 \text{ мл (36\% – і НСІ)}$$

Розрахунок кількості стерильної води необхідної для приготування 120 мл

6 % HCl:

120 – 20 = 100 мл (стерильної дистильованої H₂O)

Приготування кислоти відбувається у стерильній колбі об'ємом 200мл.

В асептичних умовах відміряють 20 мл концентрованої 36% розчину HCl, та поміщають в стерильну колбу об'ємом 200 мл, і додають 100 мл стерильної дистильованої води, ретельно перемішують.

ДР 2.2 Підготовка стерильного титрувального агенту HCl для інокулятора 8000л.

Стерильний розчин HCl готують змішуванням концентрованої HCl з стерильною дистильованою водою в асептичних умовах.

Розрахунок кількості 36 % HCl необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 6 %, об'ємом 1200мл):

$$0,36x = 0,06 \times 1200$$

$$0,36x = 72$$

$$x = 200 \text{ мл (36\% – і HCl)}$$

Розрахунок кількості стерильної води необхідної для приготування 1200 мл 6 % HCl:

1200 – 200 = 1000 мл (стерильної дистильованої H₂O)

Приготування кислоти відбувається у стерильній колбі об'ємом 200мл.

В асептичних умовах відміряють 200 мл концентрованої 36% розчину HCl, та поміщають в стерильну колбу об'ємом 2000 мл, і додають 1000 мл стерильної дистильованої води, ретельно перемішують.

ДР 2.3 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH для інокулятора 800л.

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

$$m(\text{NaOH}) = \frac{120 \times 6}{100} = 7,2\text{г (потрібно для приготування 6 \% NaOH об'ємом$$

120мл)

На технічних вагах зважують 7,2 г NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 200 мл, і додають 120 мл водопровідної води, перемішують. Закривають

колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 2.4 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH для інокулятора 8000л.

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

$$m(\text{NaOH}) = \frac{1200 \times 6}{100} = 72\text{г (потрібно для приготування 6 \% NaOH об'ємом 1200мл)}$$

На технічних вагах зважують 72 г NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 2000 мл, і додають 1200 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

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

Розрахунок кількостей компонентів для приготування середовища об'ємом 0,44 л для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках (*табл.6.1.*).

Таблиця 6.1.

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

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 0,44 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Пептон	0,4	0,176	А	0,11
Вода		0,11л		
Na ₂ HPO ₄	2	0,88	Б	0,11
Вода		0,11л		
NH ₄ Cl	1,616	0,7	В	0,22
ЕДТА	0,1	0,044		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	0,088		
Вода		0,22л		
Разом:		0,44		0,44

ДР 3.1.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 0,18 г пептону. Наважку поміщають у колбу об'ємом 200мл, і додають 110мл води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C, 30 хв.

ДР 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,88 г Na₂HPO₄. Наважку поміщають у колбу об'ємом 200мл, і додають 110мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

ДР 3.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0,7 г NH₄Cl, 0,04 г ЕДТА, 0,09 г MgSO₄·7H₂O. Наважку поміщають у колбу об'ємом 400мл, і додають 220мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 8л.

Для культивування в посівному апараті об'ємом 8 л, з робочим об'ємом 4,4

л необхідно приготувати 4 л поживного середовища.

Вміст компонентів для приготування 4 л середовища наведено у *табл. 6.2*.

Таблиця 6.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 4 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Пептон	0,4	1,6	А	1
Вода		1 л		
Na ₂ HPO ₄	2	8	Б	1
Вода		1 л		
NH ₄ Cl	1,616	6,464	В	2
ЕДТА	0,1	0,4		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	0,8		
Вода		2 л		
Разом:		4		4

ДР 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1,6 г пептону. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2л, і додають 1л води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C, 30 хв.

ДР 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 8 г Na₂HPO₄. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2л, і додають 1л водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

ДР 3.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 6,46 г NH₄Cl, 0,4 г ЕДТА, 0,8 г MgSO₄·7H₂O. Наважку поміщають у колбу об'ємом 4л, і додають 2л водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 80 л.

Для культивування в посівному апараті об'ємом 80 л, з робочим об'ємом

48 л необхідно приготувати 44 л поживного середовища (з урахуванням конденсату)). Вміст компонентів для приготування 44 л середовища наведено у *табл. 6.3*.

Таблиця 6.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 44л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 44л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Пептон	0,4	17,6	А	1
Вода		1		
Na ₂ HPO ₄	2	88	Б	1
Вода		1		
NH ₄ Cl	1,616	71,104	В	42
ЕДТА	0,1	4,4		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	8,8		
Вода		37,8		
Конденсат		4,2		
Разом:		44		
				44

ДР 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 17,6 г пептону. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2 л, і додають 1 л води, перемішують. Закривають бутль ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C, 30 хв.

ДР 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 88 г Na₂HPO₄. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2 л, і додають 1 л водопровідної води, перемішують. Закривають бутль ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

ДР 3.3.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 71 г NH₄Cl, 4,4 г ЕДТА, 8,8 г MgSO₄·7H₂O. Наважку поміщають у збірник – змішувач об'ємом 80 л, і додають 38 л водопровідної води, перемішують. Тоді, готовий розчин солей за допомогою насоса перекачують до інокулятора. Стерилізація *композиції В* буде відбуватися безпосередньо в інокуляторі. подача пари відбувається через барботер апарату. Одночасно в сорочку апарату подають глуху пару. Температура стерилізації –

131°C, тривалість – 60 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 800 л.

Для культивування в посівному апараті об'ємом 800 л, з робочим об'ємом 477 л необхідно приготувати 434 л поживного середовища (з урахуванням конденсату)). Вміст компонентів для приготування 434 л середовища наведено у табл. 6.4.

Таблиця 6.4.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 434 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 434л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Пептон	0,4	173,6	А	1
Вода		2		
Na ₂ HPO ₄	2	868	Б	433
NH ₄ Cl	1,616	701,344		
ЕДТА	0,1	43,4		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	86,8		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,04	17,36		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0055	2,387		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,001	0,434		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,00076	0,33		
Вода		389,7		
Конденсат		43,3		
Разом:		434		434

ДР 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 174 г пептону. Наважку композиції завантажують до колби об'ємом 2 л та додають 1 л води, перемішують. Закривають бутль ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C, 30 хв.

ДР 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 868 г Na₂HPO₄, 701 г NH₄Cl, 43 г ЕДТА, 87 г MgSO₄·7H₂O, 17 г CaCl₂·2H₂O, 2,4 г FeSO₄·7H₂O, 0,4 г ZnSO₄·7H₂O та 0,3 г MnSO₄·H₂O. Наважку поміщають до збірника-змішувача 20л, і додають 10 л водопровідної води, перемішують (весь інший залишок води, з врахуванням

конденсату, а саме 380л води наливаємо в інокулятор). Тоді, готовий розчин солей за допомогою насоса перекачують до інокулятора. Перед стерилізацією солей композицію доводять до рН 4, розчином НСІ. Стерилізація композиції Б буде відбуватися безпосередньо в інокуляторі. Подача пари відбувається через барботер апарату. Одночасно в сорочку апарату подають глуху пару. Температура стерилізації – 131°C, тривалість – 60 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 8000 л.

Для культивування в посівному апараті об'ємом 8000 л, з робочим об'ємом 4721 л необхідно приготувати 4292 л поживного середовища (з урахуванням конденсату)). Вміст компонентів для приготування 4292 л середовища наведено у табл. 6.5.

Таблиця 6.5.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4292л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 4292 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Пептон	0,4	1717	А	20
Вода		18		
Конденсат		2		
Na ₂ HPO ₄	2	8584	Б	4272
NH ₄ Cl	1,616	6936		
ЕДТА	0,1	429		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	858		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,04	172		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0055	24		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,001	4,3		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,00076	3,3		
Вода		3844,8		
Конденсат		427,2		
Разом:		4292		

ДР 3.5.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1717 г пептону. Наважку композиції завантажують до реактора-змішувача об'ємом 40 л та додають 18л води.

Стерилізацію композиції здійснюють гострою парою. Подача пари відбувається через нижній спуск апарату. Температура стерилізації – 112°C, тривалість – 30 хв з моменту досягнення температури стерилізації. Тоді, за допомогою насоса стерильна композиція А перекачується до інокулятора.

ДР 3.5.2 Приготування та стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора зважують 8584 г Na_2HPO_4 , 6936 г NH_4Cl . На технічних вагах зважують 429 г ЕДТА, 858 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 172 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 24 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,3 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 3,3 г $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Наважку поміщають до збірника-змішувача 200л, і додають 100 л водопровідної води, перемішують (весь інший залишок води, з врахуванням конденсату, а саме 3745л води наливаємо в інокулятор). Тоді, готовий розчин солей за допомогою насоса перекачують до інокулятора. Перед стерилізацією солей композицію доводять до рН 4, розчином HCl . Стерилізація композиції Б буде відбуватися безпосередньо в інокуляторі. Подача пари відбувається через барботер апарату. Одночасно в сорочку апарату подають глуху пару. Температура стерилізації – 131°C, тривалість – 60 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ДР 3.6. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера 80м³.

Для культивування в посівному апараті об'ємом 80000 л, з робочим об'ємом 46740 л необхідно приготувати 42491 л поживного середовища (з урахуванням конденсату)). Вміст компонентів для приготування 42491 л середовища наведено у *табл. 4.6*.

Для виробничого культивування необхідно приготувати 46740 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 46740 л поживного середовища наведено в (*табл. 6.6*).

Для засіву поживного середовища в інокулятор необхідно внести 4249 л рідкого посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції становить 42491 л (з урахуванням конденсату)).

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 42491 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 42491 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Пептон	0,4	16996	А	42491
Na ₂ HPO ₄	2	84982		
NH ₄ Cl	1,616	68665		
ЕДТА	0,1	4249		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	8498		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,04	1700		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0055	234		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,001	42		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,00076	32		
Вода		38024,1		
Конденсат		4466,9		
Разом:		42491		42491

ДР 3.6.1 Приготування та стерилізація композиції А

Для цієї стадії необхідно приготувати 46740л поживного середовища. Даний об'єм поживного середовища економічно доцільніше стерилізувати в установці безперервної стерилізації. На ваговому дозаторі зважують 16996 г пептону, 84982 г Na₂HPO₄, 68665 г NH₄Cl, 4249 г ЕДТА, 8498 г MgSO₄·7H₂O, на технічних вагах зважують 1700 г CaCl₂·2H₂O, 234 г FeSO₄·7H₂O, 42 г ZnSO₄·7H₂O та 32 г MnSO₄·H₂O. Наважку композиції завантажують до реактора-змішувача об'ємом 80м³ та додають 38000 л води. Обираємо УБС-20 з продуктивністю 20 м³/год (час стерилізації становитиме 2,3 год). Температура стерилізації – 130 °С.

Тоді, за допомогою насосу стерильна композиція А перекачується до ферментеру.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу*ТП 4.1. Підтримання колекційної культури*

Колекційну культуру *Trichosporon oleaginosus* зберігають у пробірках зі

скошеним сусло агаром при температурі 4°C. Пересіви здійснюють кожні 2-3 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

ТП 4.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках зі скошеним СА, розсівають петлею із ізолюваних колоній на чашки Петрі, які також містять СА і вирощують при температурі 28 °С упродовж 48 год.

ТП 4.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі

Отримані ізолювані колонії (від ТП4.2) пересівають в пробірки зі скошеним СА (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). У пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 48год, температура - 28 °С

ТП 4.4. Вирощування культури в колбах на качалках

У пробірку з робочою культурою *T. oleaginosus*, вирощеною на СА, вносятьмл фізіологічного розчину, суспендують клітини(змивають культуру), пі петкою відбирають одержану клітинну суспензію і вносять у колби з розлитим п оживним середовищем(відДР3.1).Для засіву однієї колби використовують кліти нну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Вирощування *T. oleaginosus* ведуть у колбах на круговій качалці (150 об/хв) при температурі 28±2°C впродовж 48год. Після чого посівний матеріал з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 750 мл. З колби відбирають пробу для мікробіологічного та технологічного контролю.

ТП 4.5. Вирощування в інокуляторі 8 л

У попередньо простерилізований інокулятор вносять композицію А(від ДР3.2.1) вносять композицію Б (від ДР3.2.2) та композицію В (від ДР3.2.3). Вносять гліцерин. Після цього вносять посівний матеріал через засівну колбу (від від ТП 4.4.). Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку, температуру 28±2°C підтримують подачею пари або холодної води в сорочку, тривалість культивування 48 год.

ТП 4.6. Вирощування в інокуляторі 80 л

У попередньо простерилізований інокулятор вносять композицію А (від ДРЗ.3.1) вносять композицію Б (від ДРЗ.3.2) та композицію В (від ДРЗ.3.3). Вносять гліцерин. Після цього вносять посівний матеріал через засівну колбу (від від ТП 4.5.). Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку, температуру $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ підтримують подачею пари або холодної води в сорочку, тривалість культивування 48 год.

ТП 4.7. Вирощування в інокуляторі 800 л

У попередньо простерилізований інокулятор з 432 л композиції Б (від ДРЗ.4.2) насосом перекачують стерильну композицію А (від ДРЗ.4.1), та додають гліцерин. Перед початком культивування середовище доводять до рН 6.5 6%-розчином NaOH. Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку, температуру $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ підтримують подачею пари або холодної води в сорочку, тривалість культивування 48 год.

ТП 4.8. Вирощування в інокуляторі 8000 л

У попередньо простерилізований інокулятор з 4272 л композиції Б (від ДРЗ.5.2) насосом перекачують стерильну композицію А (від ДРЗ.5.1) та додають гліцерин. Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку, температуру $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ підтримують подачею пари або холодної води в сорочку, тривалість культивування 48 год.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування

Виробниче культивування здійснюють у ферментері об'ємом 80м^3 (робочий об'єм – 46740 л). Стерилізація композиції А (від ДР 3.6.1) буде відбуватись в УБС. Після стерилізації композиція А буде перекачана за допомогою насоса до виробничого ферментеру. Далі через трубу перетискання подається посівний матеріал (від ТП 4.8). Вмикають мішалку, температура $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, тривалість культивування 48 год.

Культивування припиняють за досягнення в культуральній рідині концентрації ліпиду 17.37 г/л.

Кожні 4 год з ферментера відбирають 20 мл зразку культуральної рідини

для мікробіологічного аналізу.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

У процесі біосинтезу проводять періодичний контроль таких параметрів: концентрація біомаси, ліпідів, джерела вуглецю та азоту. Також проводять постадійний контроль.

7.1. Мікробіологічний контроль

Зважаючи на те, що культивування дріжджів *T. oleaginosus* ATCC 20509 з метою одержання ліпідів (для отримання біодизелю) проводиться в асептичних умовах, необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності контамінації.

Кожні 4 год з ферментера відбирають 20 мл зразку культуральної рідини для аналізу.

Мікробіологічний контроль здійснюється двома шляхами: мікроскопіюванням та висів на агаризовані поживні середовища.

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі. Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю, яка містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Потім на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1-2 краплини імерсійної олії. У полі зору мають спостерігатися лише клітини біологічного агента *T. oleaginosus* ATCC 20509: клітини округлої форми, розміром 3—5 мкм. Розмножуються безстатево за допомогою брунькування. Після роботи ваткою, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки олії з імерсійного об'єктива.

					НУХТ БТЕК 04. 01. 09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Вергун.Ю.В			РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Резніченко Ю.М.					54	
Реценз.						Кафедра БТМ 53		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Для визначення мікробіологічної чистоти культуральну рідину розсівають на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій (інкубують 24-28 год за температури $28 \pm 2^\circ\text{C}$), і на чашки з сусло-агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) для виявлення дріжджів і грибів (інкубують 7 діб за температури $28 \pm 2^\circ\text{C}$). Для цього в асептичних умовах піпеткою відбирають 0,1мл суспензії і вносять в чашку Петрі. Пропалюють шпатель Дригальського і охолоджують проводячи ним по кришці чашки Петрі. Потім обережно розподіляють суспензію шпателем по всій поверхні поживного середовища. Чашку перевертають, загортають у папір і поміщають у термостат. Після інкубації чашки виймають із термостата і оцінюють посіви візуально на наявність сторонньої мікрофлори [29].

7.2. Показники росту і синтезу

Визначення концентрації клітин проводять висівом на чашки Петрі з середовищем СА методом послідовних десятикратних розведень (метод Коха). Культивування триває 48 год. За температури 28°C .

Для аналізу в асептичних умовах відбирають 1 мл культуральної рідини і поміщають у 9 мл фізіологічного розчину, потім послідовно новою піпеткою переносять по 1 мл у ряд пробірок з 9 мл стерильної водопровідної води. З одержаних (попередньо ретельно перемішаних) розведень здійснюють висів на поверхню агаризованого середовища у чашки Петрі. Висів здійснюють по 0,1 мл, починаючи з найбільшого розведення. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні агаризованого середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Для кожного розведення використовують нову стерильну піпетку і новий стерильний шпатель. Чашки Петрі поміщають у термостат. Культивування триває 48 год за температури 28°C . Після закінчення культивування колонії підраховують [30].

7.2.1 Визначення концентрації біомаси

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод), на фотоелектроколориметрі з довжиною хвилі 540 нм в кюветах з товщиною 0,5 см, з наступним перерахунком насуху біомасу за допомогою калібрувального графік [17].

7.2.2 Визначення концентрації джерела вуглецю

У даному середовищі основним джерелом вуглецю – є гліцерин.

Концентрацію гліцерину визначають у супернатанті культуральної рідини методом високоефективної рідини хроматографії (ВЕРХ). Супернатант отримують центрифугуванням впродовж 30 хв. ВЕРХ-аналіз проводять за допомогою насоса і детектора змінної довжини хвилі. Розділення здійснюємо з використанням колонки Chiracel OD (250 мм× 4,6 мм, розмір часток 10 мкм, Daicel) при температурі навколишнього середовища. Як компоненти рухомої фази використовують гексан і 2-пропанол. Умови визначення: швидкість потоку- 0,5мл/хв, об'єм проби 20 мкл. УФ-детектування проводять при 257 нм [31].

Концентрація амінного азоту

У даному середовищі основним джерелом азоту- є NH₄Cl

Метод Несслера- найбільш загальноприйнятий і поширений для визначення вмісту аміаку і амонійних молей. Він заснований на утворенні колоїду, пофарбованого в червоно-бурий колір, при взаємодії аміаку і амонійних солей з реактивом Несслера- лужним розчином йодомеркураукалію (K₂HgI₄).

Принцип визначення азоту аміачних сполук ґрунтується на їх здатності утворювати забарвлені сполуки з реактивом Несслера, який являє собою подвійну сіль йодистої ртуті та йодистого калію, розчинених у їдкому калі. Цей реактив із аміаком дає жовте забарвлення внаслідок утворення йодистого меркурамонію за реакцією.



Хід визначення: 1мл відібраної проби культуральної рідини додають 1-10

крапель реактиву Несслера. Струшуючи пробірку після додавання кожної краплі спостерігають зміну кольору та ступінь забарвлення. Забарвлення, що з'являється поглинає випромінювання в широкому діапазоні довжин хвиль і в певних умовах інтенсивність пропорційна кількості амонію. Дослід проводять при $\lambda = 400 - 425$ нм (для кількостей $< 0,2$ мг NH_3) і при $\lambda = 550 - 580$ нм (для ≈ 1 мг). При вимірюванні на спектрофотометрі межа концентрації може бути розширена до 1,25мг (при $\lambda = 580$ нм). Пробу колориметрують на ФЕКу і за калібрувальним графіком визначають концентрацію азоту [18].

Визначення кількості утвореного ліпиду

Визначення концентрації ліпідів, для цього застосовують метод тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках «Silufol UV-254». Силуфол це хроматографічні пластинки із закріпленим шаром силікагелю марок R або UV-254, при відсутності Силуфол, можна замінити силікагелем марки КСК, наносячи його на скляну пластинку або фольгу. Якісну оцінку ліпідів здійснюють на денситометрі EPJ-65 М фірми Карл Цейс Йена.

Карта постадійного контролю

Таблиця 7.1.

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 1.1.2 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 1.1.3 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 $t=200$ °С

Продовження табл. 7.1

Кт 1.1.4 Охолодження та видалення вологи	Охолоджене повітря	Термометр технічний	Під час проведення операції	$t = 25-40^{\circ}\text{C}$ $W=50-70^{\circ}$
Кт 1.1.5 Стабілізація та нагрівання	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 60^{\circ}\text{C}$
Кт 1.1.6 Очищення в головному фільтрі	Очищене повітря	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на тиждень	$E = 99,92\%$
Кт 1.1.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на місяць	$E = 99,9999\%$
Кх, Км, Кт 2.1 Підготовка стерильного титрувального агенту HCl для інокулятора 800л	Перевірка концентрації	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	$C = 6\%$
Кх, Км, Кт 2.2 Підготовка стерильного титрувального агенту HCl для інокулятора 8000л	Перевірка концентрації	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	$C = 6\%$
Кх, Км, Кт 2.3 Приготування і стерилізація титрувального агенту NaOH для інокулятора 800л	Перевірка концентрації, температура, час	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	$C = 6\%$ $t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 60\text{хв}$ Відсутність мікробіоти
Кх, Км, Кт 2.4 Приготування і стерилізація титрувального агенту NaOH для інокулятора 8000л	Перевірка концентрації, температура, час	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	$C = 6\%$ $t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 60\text{хв}$ Відсутність мікробіоти

Продовження табл. 7.1

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	$P = 0,05$ МПа $t = 112$ °С $\tau = 30$ хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа $t = 131$ °С $\tau = 60$ хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа $t = 131$ °С $\tau = 60$ 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	$P = 0,05$ МПа $t = 112$ °С $\tau = 30$ хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа $t = 131$ °С $\tau = 60$ хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа $t = 131$ °С $\tau = 60$ хв Відсутність мікробіоти

Продовження табл. 7.1

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	$P = 0,05 \text{ МПа}$ $t = 112 \text{ }^\circ\text{C}$ $\tau = 30 \text{ хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$ $t = 131 \text{ }^\circ\text{C}$ $\tau = 60 \text{ хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$ $t = 131 \text{ }^\circ\text{C}$ $\tau = 60 \text{ хв}$ 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	$P = 0,05 \text{ МПа}$ $t = 112 \text{ }^\circ\text{C}$ $\tau = 30 \text{ хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$ $t = 131 \text{ }^\circ\text{C}$ $\tau = 60 \text{ хв}$ 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	$P = 0,05 \text{ МПа}$ $t = 112 \text{ }^\circ\text{C}$ $\tau = 30 \text{ хв}$ Відсутність мікробіоти

Продовження табл. 7.1

Кт, Км 3.5.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$ $t = 131 \text{ }^\circ\text{C}$ $\tau = 60 \text{ хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.6.2 Стерилізація композиції А в УБС	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$ $t = 130 \text{ }^\circ\text{C}$ $\tau = 120 \text{ хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 Підтримка колекційної культури	Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час збереження, мікробіологічний контроль після збереження	$t = 4 \text{ }^\circ\text{C}$ пересів 2-3 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
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	$t = 28^\circ\text{C}$, $\tau = 48 \text{ год}$, 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	$t = 28^\circ\text{C}$, $\tau = 48 \text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 Вирощування в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безпосередньо під час виробничого процесу.	$t = 28^\circ\text{C}$, $\tau = 48 \text{ год}$, Відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл. 7.1

Кт, Км, 4.5 Вирощування в інокуляторі 8л	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 = 28 ⁰ С, τ = 48 год, рН6.5, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 4.6 Вирощування в інокуляторі 80л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН - метр мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	t = 28 ⁰ С, τ = 48 год, рН6.5, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 4.7 Вирощування в інокуляторі 800 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН - метр мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	t = 28 ⁰ С, τ = 48 год, рН6.5, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 4.8 Вирощування в інокуляторі 8000 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН - метр мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	t = 28 ⁰ С, τ = 48 год, рН6.5, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 6.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація ліпиду	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, непрямий метод визначення біомаси за оптичною густиною	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4 год	t = 28 °С, τ = 48 год, 300 об/хв., рН6.5, Конц. =17г/л Відсутність сторонньої мікробіоти

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА:

1. Marchetti J. M., V. U. Miguel and A. F. Errazu. "Possible methods for biodiesel production." *Renewable and sustainable energy reviews* 11.6. 2007: 1300-1311. doi:10.1016/j.rser.2005.08.006.
2. Anastopoulos, G., Lois, E., Serdari, A., Zankos, F., Stournas, S., & Kalligeros, S. "Lubrication properties of low-sulfur diesel fuels in the presence of specific types of fatty acid derivatives." *Energy & Fuels* 15.1. 2011: 106-112.
3. ВИКОРИСТАННЯ ВІДХОДІВ ВИРОБНИЦТВА БІОДИЗЕЛЮ ДЛЯ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН NOCARDIA VACCINII K-8 ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ ВПЛИВУ НА БІОДЕСТРУКЦІЮ НАФТИ [Електронний ресурс] //Режим доступу: <http://repository.vsau.org/getfile.php/3587.pdf>.
4. Šantek M. I., Lisičar J., Mušak L., Špoljarić I. V., Beluhan S., & Šantek B. "Lipid production by yeast *Trichosporon oleaginosus* on the enzymatic hydrolysate of alkaline pretreated corn cobs for biodiesel production." *Energy & fuels* 32.12. 2018: 12501-12513. doi:10.1021/acs.energyfuels.8b02231.
5. Zinoviev S., Müller-Langer F., Das P., Bertero N., Fornasiero P., Kaltschmitt M. & Miertus S. "Next-generation biofuels: survey of emerging technologies and sustainability issues." *ChemSusChem* 3.10. 2010: 1106-1133.
6. Schober S., Seidl I., & Mittelbach M. "Ester content evaluation in biodiesel from animal fats and lauric oils." *European Journal of Lipid Science and Technology* 108.4. 2006: 309-314.
7. Біодизельне паливо [Електронний ресурс] //Режим доступу: https://pidru4niki.com/72999/ekologiya/biodizelne_palivo.
8. Kim J., Yoo G., Lee H., Lim J., Kim K., Kim C. W., & Yang J. W. "Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae." *Biotechnology advances* 31.6. 2013: 862-876.
9. Darvishi F., Fathi Z., Ariana M., & Moradi H. "Yarrowia lipolytica as a workhorse for biofuel production." *Biochemical Engineering Journal* 127. 2017: 87-96.

10. Enshaeieh M., Abdoli A., Nahvi I., & Madani M. "Bioconversion of different carbon sources in to microbial oil and biodiesel using oleaginous yeasts." *J. Biol. Todays World* 1.2. 2012: 82-92.

11. Vasudevan, P. T., & Briggs, M. "Biodiesel production—current state of the art and challenges." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35.5. 2008: 421.

12. Anastopoulos, G., Lois, E., Serdari, A., Zankos, F., Stournas, S., & Kalligeros, S. "Lubrication properties of low-sulfur diesel fuels in the presence of specific types of fatty acid derivatives." *Energy & Fuels* 15.1. 2011: 106-112.

13. Wang, Y., Yan, R., Tang, L. et al. Dimorphism of *Trichosporon cutaneum* and impact on its lipid production. *Biotechnol Biofuels*. 2019, 12, 203. doi:10.1186/s13068-019-1543-3

14. Bao, R., Wu, X., Liu, S., Xie, T., Yu, C., & Lin, X. Efficient Conversion of Fructose-Based Biomass into Lipids with *Trichosporon fermentans* Under Phosphate-Limited Conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2017, 184(1), 113–123. doi:10.1007/s12010-017-2536-y.

15. Плодородний дизель: як аграрії запасуються топливом для польових работ [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://oilpoint.com.ua/plodorodnyj-dizel-kak-agrarii-zapasayutsya-toplivom-dlya-polevyh-rabot/>

16. Очищення повітря у фармацевтичній промисловості [Електронний ресурс] //Режим доступу: https://7-vz.com/ua/category/ochistka_vozdukha_v_farmatsevticheskoy_promyshlennosti/.

17. Красінько В.О. Основи екобіотехнології: Конспект лекцій для студ. Напрямку 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2011. – 143 с.

18. Bugla, J., I. Wandzik, and W. Szeja. "High-performance liquid chromatography separation of glycerol derivatives on a chiral stationary phase." *Acta Chromatographica* 15. 2005: 173.

19. Установка для культивирования микроорганизмов Biotron LiFlus (установка - Biotron, Корея; реакторные емкости - Fermentec Co, Ltd., Корея) [Электронный ресурс] // Режим

доступу: http://www.gubkin.ru/departaments/scientific_activity/files/Center_RGU.pdf

20. Вибір конструкції апарату з перемішуючим пристроєм [Електронний ресурс] // Режим доступу:

http://www.rusnauka.com/8_NND_2011/Chimia/4_81580.doc.htm.

21. МЕТОДИ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ [Електронний ресурс] // Режим доступу:

https://lifelib.info/microbiology/biotechnology_1/126.html.

22. Zhang, X., Chen, J., Idossou, V., Tyagi, R. D., Li, J., & Wang, H. Lipid accumulation from *Trichosporon oleaginosus* with co-fermentation of washed wastewater sludge and crude glycerol. *Fuel*. 2018, 226, 93–102. doi:10.1016/j.fuel.2018.04.013.

23. Фармацевтична енциклопедія. Дезинфекція [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/9855/dezinfekciya>

24. Кабінет Міністрів України. Постанова Про затвердження Технічного регламенту мийних засобів (Технічний регламент, п.2). [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/717-2008-%D0%BF#Text>.

25. Класифікація миючих засобів. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://studfile.net/preview/7273165/page:105/>

26. Гігієнічні вимоги до мийних засобів: всі миючі засоби повинні вироблятися за рецептурою. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://medbib.in.ua/gigienicheskie-trebovaniya-moyuschim.html>

27. Класифікація миючих засобів/ спеції і технології [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://spicetech.com.ua/klasifikaciya-miyuchix-zasobiv/>

28. ДЕЗІНФЕКЦІЯ Методичні вказівки для самостійної роботи студентів 5-го курсу медичного факультету з дисципліни «Епідеміологія». [Електронний ресурс] – режим доступу:

<http://repo.knmu.edu.ua/bitstream/123456789/28042/1/Чумаченко%20Дезінфекція%20№20-347073.pdf>.

29. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підруч ник. - К.: НУХТ, 2009. - 336 с.

30. *Егоров Н.С.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии — М.: МГУ, 1995. — 224 с.

31. Грегірчак Н.М. Мікробіологія харчових виробництв: Лаборатор. Практикум. – К.: НУХТ, 2009. – 302 с.

32. Characterization of oleaginous yeasts revealed two novel species: *Trichosporon cacaoliposimilis* sp. nov. and *Trichosporon oleaginosus* sp. nov. [Електронний ресурс]- *Режим доступу:* <file:///C:/Users/%D0%90%D0%B4%D0%BC%D0%B8%D0%BD/Downloads/Telegram%20Desktop/Trichosporon%20oleaginosus.pdf>