



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

**Завідувач кафедри**

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

«01» березня 2023 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ІВАНЕЦЬ Ольги Андріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез коензиму Q<sub>10</sub> *Rhodobacter sphaeroides*»

керівник роботи \_\_\_\_\_,  
( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28 березня 2023 року № 193-к

2. Строк подання здобувачем роботи 05.06.2023

3. Вихідні дані до роботи *Rhodobacter sphaeroides*; цільовий продукт:  
коензим Q<sub>10</sub>; геометричний об'єм ферментера: 1м<sup>3</sup>; коефіцієнт заповнення:  
0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)  
Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та  
характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування;  
біосинтез цільового продукту; обґрунтування вибору технологічної схеми;  
специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого  
біосинтезу; опис технологічної схеми; контроль виробництва; аналіз  
перспектив впровадження системи екологізації виробництва; нормативно-  
технічна документація, використана під час проектування виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу ергостерину - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема біосинтезу ергостерину - 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 березня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика цільового продукту</i>	01.03.2023 – 05.03.2023	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	06.03.2023 – 08.03.2023	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	09.03.2023 – 23.03.2023	
4.	<i><u>Біосинтез цільового продукту</u></i>	24.03.2023 – 31.03.2023	
5.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва</i>	01.04.2023 – 12.04.2023	
6.	<i>Специфікація обладнання</i>	13.04.2023 – 20.04.2023	
7.	<i>Опис технологічної схеми</i>	21.04.2023 – 25.04.2023	
8.	<i>Контроль виробництва</i>	26.04.2023 – 2.05.2023	
9.	<i><u>Аналіз перспектив випровадження системи екологізації виробництва</u></i>	03.05.2023 – 06.05.2023	
10.	<i><u>Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва</u></i>	07.05.2023 – 08.05.2023	
11.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	09.05.2023 – 15.05.2023	
12.	<i>Оформлення графічної частини</i>	16.05.2023 – 31.05.2023	

**Здобувач**

(підпис)

**Ольга ІВАНЕЦЬ**

(ім'я та прізвище)

**Керівник роботи**

(підпис)

**Оксана СКРОЦЬКА**

(ім'я та прізвище)

# ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	
ВСТУП	
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	9
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	15
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	20
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	24
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	26
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	27
3.1. Потреба у цільовому продукті	27
3.2. Розрахунок потужності виробництва	38
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	38
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	39
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	41
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	41
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	43
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	45
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	45
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	45
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	46
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	48
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	54
5.2. Основні етапи післяферментаційного виділення, концентрування та очищення цільового продукту	61
5.3. Пропозиції щодо підбору обладнання для реалізації післяферментаційних процесів	61
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	65
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	68
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	81
8.1. Мікробіологічний контроль	81
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	82
8.2.1. Концентрація біомаси	82
8.2.2. Концентрація цільового продукту	82
8.2.3. Концентрація джерела Карбону і Нітрогену	82
8.3. Показники якості готового продукту	85

8.3.1	Методи ідентифікації цільової речовини .....	85
8.3.2	Тест на фотостабільність .....	86
8.3.3	Антиоксидантна активність, визначена за допомогою відновлення заліза (FRAP) .....	86
8.3.4	Антиоксидантний потенціал, визначений через 2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозил (DPPH) радикальне відновлення.....	86
8.3.5.	Зниження МТТ .....	87
8.3.6.	Alamar Blue ® Reduction.....	87
РОЗДІЛ 9 АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА .....		89
9.1.	Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	89
9.2.	Системи знешкодження рідких відходів.....	91
9.3	Системи знешкодження газоподібних відходів .....	94
9.4	Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	95
РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА .....		97
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ		
ДОДАТКИ		

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічної та апаратурної схем біосинтезу коензиму Q10 *Rhodobacter sphaeroides* NY01. Під час культивування даний мікроорганізм синтезує 1,95 г/л коензиму. Пропонується використовувати коензим в якості допоміжного засобу при лікуванні статинами, на ранніх стадіях хвороби Альцгеймера, раку молочної залози. Проаналізувавши ринок України, статистику щодо захворювань та загальну тенденцію, була розрахована річна потужність виробництва – 10,7 т на рік.

Технологія виробництва коензиму включає ряд допоміжних та основних робіт. Допоміжними роботами є етапи підготовки персоналу, обладнання, повітря (культивування проводиться в аеробних умовах), підготовки допоміжних розчинів, а саме: титрувальних розчинів, запасних розчинів вітамінів, та запасного 40%-го розчину глюкози, стерилізації поживних середовищ для одержання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу. Етапи основного технологічного процесу складаються з підготовки посівного матеріалу, 3 стадій вирощування посівного матеріалу ( у колбах на качалках, в посівних апаратах на 10 та 100 л), а також виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1м<sup>3</sup>. Коефіцієнт становить 0,6.

Дипломна робота викладена на 116 сторінках, містить 16 таблиць, 12 рисунків, складається зі вступу, 10 розділів, списку використаної літератури (135 найменувань), технологічної (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем.

Ключові слова: коензим Q10, убіхінон, антиоксидант, *Rhodobacter sphaeroides* NY01, статини, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона.

## ВСТУП

В останні десятиліття біотехнології відіграють важливу роль у покращенні якості людського життя. Досить перспективними вважаються дослідження стосовно можливості використання коензиму в різних сферах. Оскільки він є незамінним для нормальної життєдіяльності людського організму і відповідає за постачання енергії, з'являється все більше досліджень стосовно нових можливостей Q10. Багато хто чув, що даний коензим володіє чудодійними властивостями, дарує вічну молодість, продовжує наше життя і здатний вирішити купу проблем зі здоров'ям. В цьому є частка істини. Дійсно, коензим може покращити загальний стан людини, особливо це стосується серцево-судинної системи, а також, може покращити стан шкіри і волосся. Але, коензим не є панацеєю від усіх хвороб, поки що. Проте, він все таки може врятувати людині життя. І це легко продемонструвати на прикладі України. Значна частина наших громадян щороку вмирає через проблеми з серцево-судинною системою, а результати досліджень кількості людей, що мають підвищений холестерин, дійсно лякає. Так, виникає запитання, яким чином БАД зможе їх врятувати, якщо лікарі знають про цю проблему, намагаються лікувати хворих новітніми ліками, але кількість смертей лише зростає з року в рік? Все просто. Розглянемо проблему з підвищеним холестерином, що пов'язаний з вищим ризиком розвитку серцевих захворювань. Здавалося б, вчені знайшли вирішення цієї проблеми – лікування статинами. Але, є нюанс. Статини здатні знижувати рівень коензиму в організмі більше, ніж на 50 %, що в свою чергу впливає на переносимість цих же ліків. Досить часто пацієнти не можуть продовжити терапію через нестерпний біль у м'язах, проблеми з ШКТ, стомлюваністю і взагалі, прочитавши в Інтернеті, боятимуться розвитку хвороби Паркінсона чи діабету. Чи зможе цьому всьому запобігти звичайний коензим? Так, зможе.

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.38 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Іванець О. А.			<b>ВСТУП</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Скροцька О. І.					7	116
Реценз.						7 <b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабнікоа В П.						

Пройшовши курс профілактики протягом 1 місяця, ви зможете ліквідувати, або ж попередити нестачу Q10 в організмі, що знизить ймовірність побічних реакцій до мінімуму. Чи буде коштувати це золотих гір? Ні, це буде коштувати близько 300 грн за курс і забезпечить вам більш здорове майбутнє. Чи можна користуватися коензимом лише для профілактики? Так, звичайно. Це буде гарним подарунком своєму організму.

**Мета кваліфікаційної роботи:** проєктування ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу (технологічна та апаратурна схеми) коензиму Q10 (убіхінону) *Rhodobacter sphaeroides* NY01.

**Новизна даної роботи:** дослідження можливостей коензиму нині набирають обертів. Вчені намагаються знайти можливість коензимотерапії при ширшому спектрі захворювань, для цього необхідно забезпечити виробництво відносно недорогою та якісною сировиною. *Rhodobacter sphaeroides* NY01 здатний продукувати 1,95 г/л коензиму, що є значно вищим показником, ніж у інших мікроорганізмів.

# РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

## Характеристика убіхінону

Q10 (МНН: Ubidecarenone, Убідекаренон, кофермент Q, CoQ10, CoQ, Q «всюдисущий хінон») – вітаміноподібний жиророзчинний хінон, обов'язковий компонент мембран і мітохондрій, оскільки одна з його основних функцій – участь в процесі синтезу АТФ через дихальний ланцюг [1-3].

За хімічною природою Q10 – 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохінон (Рис 1.1), що має ізопреновий ланцюг в 6-ому положенні. Оскільки речовина «коензим», значить вона має органічну, небілкову структуру, літера Q відносить до хіноїдної хімічної групи, а індекс «10» вказує на кількість ізопренових одиниць, що входять до бокового ланцюга. Їх число може змінюватися від 6 до 10. В мітохондріях тварин зустрічається лише Q10 [3,4].

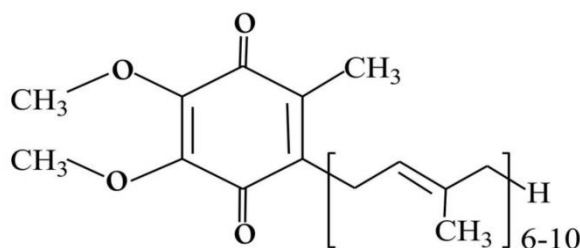


Рис 1.1 Хімічна структура убіхінону [5]

Убіхінон містить 82,08% карбону, 10,51% водню, 7,41% - оксигену. Загальна молярна маса становить 863,37 г/моль [3].

Кофермент – жовтий або оранжевий кристалічний порошок, розчиняється в ацетоні, малорозчинний в етанолі, майже нерозчинний у воді. Максимум поглинання в ультрафіолетовому спектрі спостерігається при 275нм. Q10 поступово розкладається і темніє на світлі. Температура плавлення

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.38 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Іванець О. А.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Скороцька О. І.					9	116
Реценз.						9 Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабнікоа В. П.						

48-52°. Убіхінон здатний існувати у трьох фізичних станах: розчинений у ліпідному бішарі, зв'язаний з білками (більше 84% з білком не зв'язані) або утворюючи міцелярні агрегати. Також може бути повністю окисленим, повністю відновленим (забезпечує антиоксидантні властивості) (Рис 1.2) або ж семіхіноном [1, 2, 4].

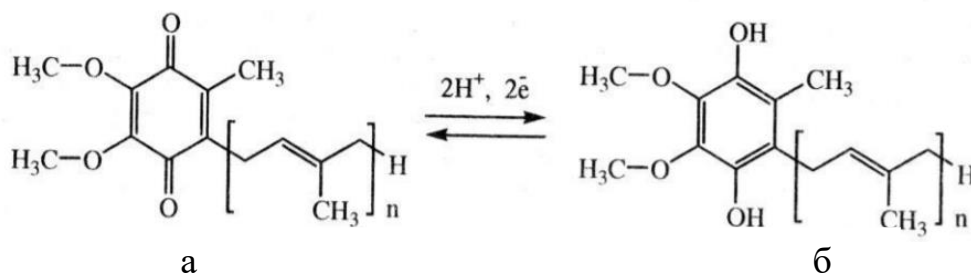


Рис 1.2 Окиснена (а) і відновлена (б) форми Q10 [6]

Коензим здатний ефективно захищати ліпіди, що знаходяться в біологічних мембранах та фосфоліпіди, ліпопротеїдні частинки крові від руйнівних процесів перекисного окиснення, а також захищає ДНК і білки від окисної модифікації активними формами кисню [4].

### Синтез убіхінону

Q10 може синтезуватися в організмі людини з мелаванової кислоти, а також продуктів обміну фенілаланіну і тирозину, проте в такий спосіб не завжди синтезується достатня кількість убіхінону [3].

Основними продуцентами коензиму вважаються бактерії родів *Rhodospirillum*, *Pseudomonas*, *Gluconobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Escherichia coli*, *Sphingomonas sp*, а також дріжджі *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Trichosporon* ATCC 20566 [7-15].

### Оптимальні значення температури і рН

Термо-, фотостабільність Q10 визначали у комплексі коензиму з  $\beta$ - та  $\gamma$ -циклодекстрином. Утворення такого комплексу призвело до збільшення розчинності Q10 у воді (сам по собі коензим практично у воді не розчиняється). Ступінь розчинення лінійно збільшувався з підвищенням

температури і рН. Також на стабільність Q10 впливає ультрафіолетове випромінювання. Так, після 120 хвилин витримки за температури в 80 °С, спостерігається розкладання 72,3% чистого Q10, проте у комплексі його стійкість значно зросла і 64% коензиму залишилися непошкодженими [16].

### **Механізм біологічної дії**

Коензим Q10 локалізується не лише в мітохондріях, а й у цитоплазмі, органелах. Так, концентрація убіхінону в апараті Гольджі може бути більшою, ніж в мітохондріях. В плазматичній мембрані Q10 бере участь в роботі дегідрогеназ, таких як, наприклад, NADH-цитохром-b5-редуктаза або NADPH-хінон-редуктаза. Також коензим може регенерувати інші антиоксиданти та стабілізувати плазматичні мембрани, регулює керамід-залежний шлях, який задіяний у розвитку апоптозу. CoQ10 здатний інгібувати Mg<sup>2+</sup>-залежну нейтральну сфінгомієліназу (n-SMазу) на етапі ініціюванні апоптозу, запобігаючи таким чином активації каспази [17].

### **Убіхінон як переносник електронів у дихальному ланцюзі**

Активність компонентів дихального ланцюга досить чутлива до змін співвідношення коензиму у пулі [18].

Комплекс I окислює NADH<sup>+</sup> в мітохондріях і в той же час відновлює убіхінон у ліпідному бішарі мітохондріальної мембрани [19]. Комплекс II здатний передавати електрони на убіхінон без утворення трансмембранного протонного градієнта [20]. Комплекс III каталізує перенесення від CoQ10 електронів на цитохроми, продукуючи транслокацію протонів [2].

Використовуючи жирні кислоти в якості основного субстрату можна спостерігати додаткове використання та окислення Q10, що призводить до додаткового утворення АТФ. Насичення ж коензимом мітохондрій веде до зворотного транспорту електронів на комплекс I, а це в свою чергу призводить до генерації супероксиду [2].

Встановлено також, що Q10 є обов'язковим кофактором для функціонування роз'єднуючих білків (UCPs). Убіхінон транспортує Н<sup>+</sup> від жирних кислот до акцепторних груп, впливаючи на протонний градієнт і

сприяючи утворенню тепла [21].

### **Убіхінон як антиоксидант**

Q10 є унікальним антиоксидантом за наявності практично в усіх мембранах та якісного і кількісного перевершення над іншими антиоксидантами. Коензим здатний захищати ДНК, білки та ліпіди, а також він може регенерувати інші антиоксиданти, наприклад альфа-токоферол, аскорбінову кислоту. Q10 може виступати і прооксидантом. Убіхінол виступає інгібітором процесів ПОЛ, дія коензиму спрямована на запобігання виробництву ліпідних пероксидних радикалів під час ініціації. Також відновлений убіхінон ефективно бореться з білковим окисненням, обриваючи окислювальні ланцюги, і цим самим запобігає розповсюдженню оксидативного пошкодження. Ще даний коензим захищає ліпопротеїни низької густини від окиснення [2].

### **Убіхінон як регулятор генетичної експресії**

Q10 – модулятор експресії генів у клітинах HeLa, CaCo-2 клітинах, моноцитах THP-1, у серці C57BL/6 мишей та деяких тканинах SAMP1 мишей [22]. Коензим бере участь у придушенні апоптозу на його початкових стадіях, пов'язаних з активністю каспази-3. Q10 впливає на гени гуаніннуклеотид-зв'язуючого білка, які відіграють значну роль у розвитку хвороби Альцгеймера, а білок mgs3358, синтезований убіхіноном пов'язаний з хворобою Хаттінгтона. Також Q10 уповільнює втрату дофамінових нейронів при хворобі Паркінсона [2].

Убіхінон має подавляючі можливості щодо експресії гена iNOS, що впливає на NO-опосередкований сигнальний шлях. Q10 чинить вплив на транскрипційний фактор NF-κB і подавляє активність ІκB kinase-2 [2].

Q10 здатний інгібувати процес старіння стовбурових клітин, що пов'язано з діяльністю D-галактози. Q10 впливає на Akt/mTOR сигнальний шлях через послаблення експресії генів [23].

Коензим впливає на метаболізм ліпопротеїдів, протидіє накопиченню холестерину в макрофагах, проявляє протизапальну і антипроліферативну дію [2].

Також спостерігається збільшення життя лабораторних тварин завдяки CoQ10, що пригнічує надлишкове напрацювання супероксидних радикалів [2].

### **Убіхінон і регуляція активності ферментів**

Q10 впливає на активність великої кількості ферментів. Так, застосування коензиму людьми з пошкодженим ішемією серцем показало індукцію активності супер-оксиддисмутази та глутатіонпероксидази. Убіхінони знижують вміст ендогенних перекисних ліпідів у мітохондріях серця [24].

Активність антиоксидантних ферментів Q10 підвищує за рахунок зменшення витоку електронів із дихального ланцюга, редукції процесів утворення АФК [2].

Q10 виступає кофактором дигідрооротатдегідрогенази, вважається, що збільшення концентрації убіхінону підсилює синтез піримідинів [25].

Дослідження з сироваткою крові показують, застосування убіхінолу зумовлює зниження активності ГГТ, фермента, що бере участь в обміні амінокислот і метаболізмі медіаторів запалення [2].

Також, згідно з дослідженнями, Q10 є перспективним засобом для боротьби з атеросклерозом, він не лише гальмує розвиток, а й може сприяти регресу [2].

### **Сфери застосування убіхінону**

Убіхінон має широкий спектр промислового застосування в різних галузях, таких як харчова, фармацевтична, косметична. Коензим застосовують у ролі харчової добавки як антиоксидант, стабілізатор. Q10 використовують в ліках, адже він сприятливо впливає на роботу мозку, серця, ясен, підтримує

імунну систему, покращує фертильність і допомагає у випадках мігрені. Також він необхідний для тих людей, що приймають препарати статинової групи.

Q10 користується попитом в косметології, адже зберігає молодість шкіри. Він здатний прискорювати синтез колагену, сприяє загоєнню ушкоджень, підвищує еластичність шкіри та скорочує глибину і кількість зморшок.

## РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Коензим Q10 здатні синтезувати ряд мікроорганізмів. Задля нашого дослідження було обрано: *Corynebacterium glutamicum*, *Rhizobium radiobacter* T6102, *Rhodobacter sphaeroides* HY01, *Sphingomonas* sp ZUTE03, *Rhodotorula glutin*.

Проаналізувавши дані з таблиці 2.1, робимо висновки, що найбільшу кількість убіхінону синтезує модифікований *Rhodobacter sphaeroides* HY01 (1,95 г/л), вирощений за допомогою періодичного підживлення, значно менше синтезують коензим *Sphingomonas* sp ZUTE03 та *Rhodotorula glutin*. (0,07 та 0,078 г/л).

Для *Corynebacterium glutamicum* не наведено концентрацію продукту, тому вважаю розглядати далі цей мікроорганізм є недоцільним.

Далі аналізуємо дані з таблиці 2.2, як бачимо, вартість компонентів на 1 л середовища найменша для культивування *Sphingomonas* sp ZUTE03 (0,4 грн/л), також недорогим є середовище для *Rhodobacter sphaeroides* HY01 (1,92 грн/л).

Для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розраховуємо умовну вартість 1 мг цільового продукту (дані зазначено в таблиці 2.3). Найнижчою є вартість *Rhodobacter sphaeroides* HY01 – 3,1 грн/мл. Вартість *Sphingomonas* sp ZUTE03 становить – 0,9 грн/мл.

Враховавши отримані дані, найактивнішим агентом було обрано *Rhodobacter sphaeroides* HY01.

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.38 КР ПЗ</b>		
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>			
Розроб.		Іванець О. А.			<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Акрушіє</b>
Перевір.		Скροцька О. І.				15	116
Реценз.					15		
Н. Контр.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Затверд.		Стабнікоа В. П.					
<b>РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</b>							

## Особливості одержання коензиму на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год.	Концентрація продукту, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Глюкоза	40	75	-	Культивування у колбах з перегородками на роторному шейкері при 30° і 120 об/хв., оптична густина 600 нм	Burgardt A., Moustafa A., Persicke M., Spro J., Patschkowski T., Risse J., Peters-Wendisch P., Lee J., Wendisch V. Coenzyme Q <sub>10</sub> Biosynthesis Established in the Non-Ubiquinone Containing <i>Corynebacterium glutamicum</i> by Metabolic Engineering. <i>Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.</i> , 2021, 9, 1-18. doi: 10.3389/fbioe.2021.650961. [26]
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20				
	Сечовина	5				
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1				
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1				
	MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,25				
	CaCl <sub>2</sub>	0,000068				
	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> , ZnSO <sub>4</sub>	0,000003 0,000003				

Продовження таблиці 2.1.1

<i>Rhizobium radiobacter</i> T6102	Глюкоза Пептон Дріжджовий екстракт Мальтозний екстракт	20 5 3 3	24	0,028	Культивування в колбах об'ємом 500 мл з 100 мл середовища при 30° і 200 об/хв.	Seo, Myung-Ji, Soon-Ok Kim. Effect of Limited Oxygen Supply on Coenzyme Q <sub>10</sub> Production and Its Relation to Limited Electro Transfer and Oxidative Stress in <i>Rhizobium radiobacter</i> T6102. <i>J. Microbiol. Biotechnol.</i> , 2010, 20(2), 346-349. doi: 10.4014/jmb.0909.09021. [27]
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> HY01	Глюкоза Кукурудзяний екстракт Глутамат натрію (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> NaCl KCl MgSO <sub>4</sub> CaCO <sub>3</sub> Тіамін гідрохлорид Нікотинова кислота Біотин	140 4 3 3 2,8 3 6,3 2 0,001 0,001 0,000015	75	0,27	Періодичне підживлення в біореакторі з мішалкою на 100 л, 32° і 600 об/хв., аерація 1 VVM	Lu ZhangLeshi LiuKe-Feng WangLan XuLiming ZhouWeishan WangChuan LiZheng XuTong ShiHaihong ChenYuanhang LiHui XuXiuLiang YangZhichun ZhuBiqin ChenDan LiGuanghuang ZhanSi-Liang ZhangLi-Xin ZhangGao-Yi Phosphate limitation increases coenzyme Q <sub>10</sub> production in industrial <i>Rhodobacter sphaeroides</i> HY01 <i>Synthetic and Systems Biotechnology</i> Volume 4, Issue 4, December 2019, Pages 212-219 doi.org/10.1016/j.synbio.2019.11.001 [28]

Закінчення Таблиці 2.1.1

<i>Sphingomonas</i> sp ZUTE03	Глюкоза Дріжджовий екстракт KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15 1 0,5 1,5 0,5	48	0,07	Культивування в колбах об'ємом 250 мл з 100 мл середовища при 28° і 180 об/хв. Подальше культивування 5 мл культури в 150 мл середовища у колбі на 500 мл	Qiu, Lequan, Wang W., Zhong W., Zhong L., Fang J. Li X., Wu S., Chen J. Coenzyme Q10 Production by <i>Sphingomonas</i> sp. ZUTE03 with Novel Precursors Isolated from Tobacco Waste in a Two-Phase Conversion System. <i>J. Microbiol. Biotechnol.</i> , 2011, 21(5), 494-502. doi: 10.4014/jmb.1012.12017 [29]
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Глюкоза (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Дріжджовий екстракт K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub>	40 10 10 0,6 0,6 0,3	84	0,078	Культивування в біореакторі на 3,1 л з вмістом середовища – 1,7	P. A. Balakumaran and S. Meenakshisundaram Modeling of Process Parameters for Enhanced Production of Coenzyme Q10 From <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Preparative Biochemistry &amp; Biotechnology</i> , 45:398–410, 2015 doi: 10.1080/10826068.2014.923447 [30]

Таблиця 2.1.2

## Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів убіхінону

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Глюкоза	40	10	0,4	1
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	0,001	2×10 <sup>-5</sup>	1
	Сечовина	5	24,7	1,235×10 <sup>-1</sup>	1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	43,5	4,35×10 <sup>-2</sup>	1
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	156	1,56×10 <sup>-1</sup>	1
	MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,25	7,65	1,9125×10 <sup>-3</sup>	2
	CaCl <sub>2</sub>	0,000068	13	8,84×10 <sup>-7</sup>	1
	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,000003	75	2,25×10 <sup>-7</sup>	2
	ZnSO <sub>4</sub>	0,000003	25	7,5×10 <sup>-8</sup>	1
Вартість 1 л середовища – 0,6 грн					
<i>Rhizobium radiobacter T6102</i>	Глюкоза	20	10	0,2	1
	Пептон	5	1059	5,295	1
	Дріжджовий екстракт	3	65	0,195	2
	Мальтозний екстракт	3	28	0,084	2
Вартість 1 л середовища – 5,774 грн					
<i>Rhodobacter sphaeroides NY01</i>	Глюкоза	140	10	1,4	1
	Кукурудзяний лікер	4	60	0,24	2
	Глутамат натрію	3	10	0,03	1
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	0,001	3×10 <sup>-6</sup>	1
	NaCl	2,8	1,5	4,2×10 <sup>-3</sup>	1
	KCl	3	25	0,075	1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	43,5	0,13	1
	MgSO <sub>4</sub>	6,3	6,4	4,032×10 <sup>-2</sup>	1
	CaCO <sub>3</sub>	2	0,001	2×10 <sup>-6</sup>	1
	Тіамін гідрохлорид	0,01	700	0,007	2
	Нікотинова кислота	0,01	100	0,001	1
	Біотин	0,000015	625	9,375×10 <sup>-6</sup>	4
Вартість 1 л середовища – 1,92 грн					
<i>Sphingomonas sp ZUTE03</i>	Глюкоза	15	10	0,15	1
	Дріжджовий екстракт	1	65	0,065	2
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	43,5	2,175×10 <sup>-2</sup>	1
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5	120	0,18	1
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	7,65	3,825×10 <sup>-3</sup>	2
Вартість 1 л середовища – 0,4 грн					

## Закінчення Таблиці 2.1.2

<i>Rhodotorula glutinis</i>	Глюкоза	40	10	0,4	1
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	0,001	10 <sup>-5</sup>	1
	Дріжджовий екстракт	10	65	0,65	2
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6	156	9,36×10 <sup>-2</sup>	1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6	43,5	2,61×10 <sup>-2</sup>	1
	MgSO <sub>4</sub>	0,3	6,4	1,92×10 <sup>-3</sup>	1
	Вартість 1 л середовища – 1,17 грн				

Примітка. \* – Ціни наведено станом на квітень 2022 р. 1 - <https://flagma.ua/>, 2 - <https://prom.ua/>, 3 - <https://www.alibaba.com/>, 4 - <https://runainter.com/>

## Таблиця 2.1.3

**Умовна вартість 1г коензиму, синтезованого на суміші ростових субстратів**

Біологічний агент	Концентрація коензиму, мг/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного коензиму за годину, мг/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 мг цільового продукту, грн/мг
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	-	75	-	0,6	-
<i>Rhizobium radiobacter</i> T6102	0,028	24	1,16×10 <sup>-3</sup>	5,774	206,21
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> HY01	1,95	75	0,026	1,92	0,9
<i>Sphingomonas</i> sp ZUTE03	0,07	48	1,45×10 <sup>-3</sup>	0,4	5,71
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0,078	84	9,29×10 <sup>-4</sup>	1,17	15

## 2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування – 75 год, концентрація коензиму в культуральній рідині 0,27 г/л, а концентрація біомаси – 1,95 г/л.

### *Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення.*

*Потреби для синтезу убіхінону.* Як основне джерело вуглецю для одержання убіхінону використовується глюкоза.

Згідно даних [28] концентрація біомаси становить 80 г/л, враховуючи,

що убіхінон міститься у цитоплазматичній мембрані клітини, розрахуємо необхідну кількість карбону.

Оскільки у біомасі міститься 50% Карбону, тому вміст його у 80 г/л становитиме  $80 \cdot 0,5 = 40$  г. Ця кількість Карбону міститься в  $(40 \cdot 100)/72 = 100$  г вуглеводів. Врахуємо холосте окиснення, воно становить 40%, тобто  $100 + 40 = 140$  г глюкози. Тоді загальний вміст глюкози в середовищі, що є необхідним для синтезу біомаси (1,95), а також убіхінону (0,27) буде становити  $140 + 5,6 = 145,6$  г/л = 1,45%.

***Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення.***

*Потреби для синтезу біомаси.* У біомасі міститься близько 10% азоту, тоді у 80 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить  $(80 \cdot 0,10) = 8$  г. Продуцент убіхінону асимілює амонійний Нітроген в якості джерела азотного живлення, а саме  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Розраховуємо кількість амоній сульфату, що необхідна для одержання 80 г/л біомаси. Молекулярна маса  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  становить 132. Отже, у 132 г сульфату амонію міститься 28 г Нітрогену (N), тоді 8 г Нітрогену міститиметься у  $(132 \cdot 8)/28 = 37,7$  г солі.

*Розрахунок вмісту органічного азоту в кукурудзяному лікері.*

Кукурудзяний екстракт виступає джерелом органічного Нітрогену, який засвоюється продуцентом убіхінону. Таким органічним Нітрогеном є амінний Нітроген. Концентрація доступного для бактерій органічного Нітрогену (за елементом N) у кукурудзяному екстракті становить 1,9 %. Отже, у 4 г лікеру міститься  $(1,9 \cdot 4)/100 = 0,076$  г Нітрогену. Також джерелом Нітрогену є глютамат натрію. Концентрація органічного Нітрогену (за елементом N) у глютаматі становить 8%, тоді в 4 г його міститься  $(8 \cdot 4)/100 = 0,32$  г.

Оскільки *Rhodobacter sphaeroides* NY01 є ауксотрофом і не може самостійно синтезувати ряд вітамінів, у середовище вносять тіамін, біотин і нікотинову кислоту. Розрахуємо їх вміст:

- Концентрація N у тіаміні становить 21%, тоді у 0,01 г його міститься  $(21 \cdot 0,01)/100 = 2,1 \cdot 10^{-3}$  г

- Концентрація N у нікотиновій кислоті становить 11%, у 0,01 г кислоти вміст Нітрогену становить  $(11 \cdot 0,01)/100 = 1,1 \cdot 10^{-3}$  г
- Концентрація N у біотину складає 11%, тоді вміст Нітрогену у 0,000015 г буде складати  $(11 \cdot 0,000015)/100 = 1,65 \cdot 10^{-6}$  г

Сумарний вміст Нітрогену в органічних речовинах, що входять до складу нашого поживного виробництва  $0,076 + 0,32 + 2,1 \cdot 10^{-3} + 1,1 \cdot 10^{-3} + 1,65 \cdot 10^{-6} = 0,4$ . З врахуванням Нітрогену, що міститься у кукурудзяному лікері, у середовище повинно бути внесено  $37,7 - 0,4 = 37,3$  г/л

*Розрахунок вмісту у середовищі джерел мінерального Нітрогену.* Якщо джерелом мінерального Нітрогену в середовищі культивування продуцента буде лише сульфат амонію, то для забезпечення бактерій Нітрогеном (0,834 г/л), концентрація цієї солі повинна становити  $(132 \cdot 37,4) / 28 = 176,3$  г/л.

*Розрахунок складу глюкозо-сольового підживлювального розчину.* У вигляді підживлювального розчину в середовище вносять у процесі культивування 120 г глюкози. Тривалість культивування становить 75 год. Врахуємо, що підживлення почали через 15 годин після початку культивування, також приймемо, що підживлення додається у середовище кожні 5 год. Тоді кількість порцій підживлення – 8. Тоді з кожною порцією підживлення у середовище повинно вноситись  $120 / 8 = 15$  г глюкози

*Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі.* У біомасі міститься близько 3 % Фосфору (за елементом P). Отже, для синтезу 80 г/л біомаси вміст Фосфору у середовищі повинен становити  $80 \cdot 0,03 = 2,4$  г/л. Джерелом Фосфору у виробництві коензиму є однозаміщений Калій ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Так, 2,4 г фосфору міститься у  $(136 \cdot 2,4)/31 = 10,5$  г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

*Розрахунок вмісту Кальцію у середовищі.* У біомасі міститься близько 0,5 % Кальцію (за елементом Ca). Для синтезу 80 г/л біомаси вміст Кальцію у середовищі повинен становити  $80 \cdot 0,005 = 0,4$  г/л. Кальцій в середовищі міститься у вигляді кальцій карбонату, молекулярна маса якого становить 100. У 100 г міститься 40 г Кальцію. Розрахуємо концентрацію солі в середовищі, вона становить  $(0,4 \cdot 100)/40 = 1$  г/л.

**Розрахунок вмісту Магнію у середовищі.** У біомасі міститься близько 0,5 % Магнію (за елементом Mg). Для синтезу 80 г/л біомаси вміст Кальцію у середовищі повинен становити  $80 \cdot 0,005 = 0,4$  г/л. Магній в середовищі міститься у вигляді магній сульфату, молекулярна маса становить 120, вміст Магнію – 24г, тоді концентрація солі в середовищі  $(0,4 \cdot 120)/24 = 2$  г/л.

**Розрахунок кількості аміачної води для нейтралізації культуральної рідини.** Споживання бактеріями амонійного джерела Нітрогену –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  супроводжується підкисленням культуральної рідини, а споживання органічного Нітрогену – її підлужненням. Вміст органічного Нітрогену у середовищі 0,3 г/л.

Приймемо, що підлужнення в результаті споживання 0,3 г/л органічного Нітрогену буде компенсуватись підкисленням в результаті споживання 0,3 г/л амонійного Нітрогену. 0,3 г амонійного Нітрогену міститься у  $(132 \cdot 0,3) / 28 = 1,41$  г сульфату амонію. Отже, аміачна вода буде витрачатись на нейтралізацію кислоти, що утвориться в результаті споживання  $3 - 1,41 = 1,59$  г, або  $1,59/132 = 0,01$  моль сульфату амонію. Тому амоній сульфат буде витрачатись на нейтралізацію лугу, що утвориться в результаті споживання 0,3 г кукурудзяного лікеру та вітамінів.

Таблиця 2.2.1

**Склад поживного середовища для культивування продуцента убіхінону**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л			
	Сумарний	Початковий	У підживлювальному розчині глюкози	В одній порції підживлення
Глюкоза	140	20	120	15
Кукурудзяний екстракт	0,24	-	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	37,7	-	-	-
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	10,5	-	-	-
$\text{CaCO}_3$	1	-	-	-
$\text{MgSO}_4$	2	-	-	-

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

### Морфолого-культуральні властивості

*Rhodobacter sphaeroides* NY01 [31-33] – паличкоподібна грамнегативна бактерія. Бактерії мають полярний джгутик. За несприятливих умов *R. sphaeroides* NY01 може утворювати цисти, які є сферичними структурами з більш товстою клітинною стінкою, ніж вегетативні клітини. Цисти зазвичай утворюються у відповідь на обмеження поживних речовин або окислювальний стрес. Ці структури можуть допомогти бактерії вижити в суворих умовах, оскільки вони більш стійкі до висихання та інших стресів, ніж вегетативні клітини.

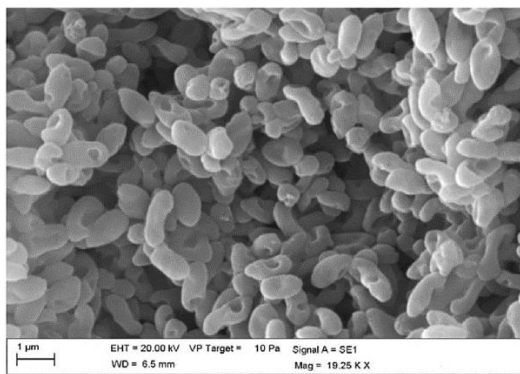


Рис. 3.1 Електро мікрофотографія *Rhodobacter sphaeroides* NY01 [34]

*R. sphaeroides* NY01 може рости в широкому діапазоні умов середовища, а також як при аеробному, так і анаеробному культивуванні. Колонії *R. sphaeroides* NY01 зазвичай круглі, гладкі та злегка підняті. Вони мають кремовий або оранжево-жовтий колір і зазвичай 1-2 мм в діаметрі. При вирощуванні на середовищах, що містять пептон і дріжджовий екстракт, колонії часто мають чіткий вигляд «смаженого яйця» з жовтим (скоріше рудим) центром, оточеним напівпрозорим білуватим зовнішнім кільцем. *R. sphaeroides* NY01 здатний здійснювати фотосинтез, для якого в якості джерела енергії потрібне світло. Тому при вирощуванні на світлі колонії часто мають темніший, більш пігментований центр через накопичення фотосинтетичних пігментів. У деяких випадках через пігменти колонії можуть виглядати фіолетовими або червонувато-коричневими. Однією з важливих

характеристик *R. sphaeroides* HY01 є їхня здатність флуоресцювати під УФ-світлом. Це пов'язано з наявністю пігментів, званих бактеріохлорофілами, які мають флуоресцентні властивості.

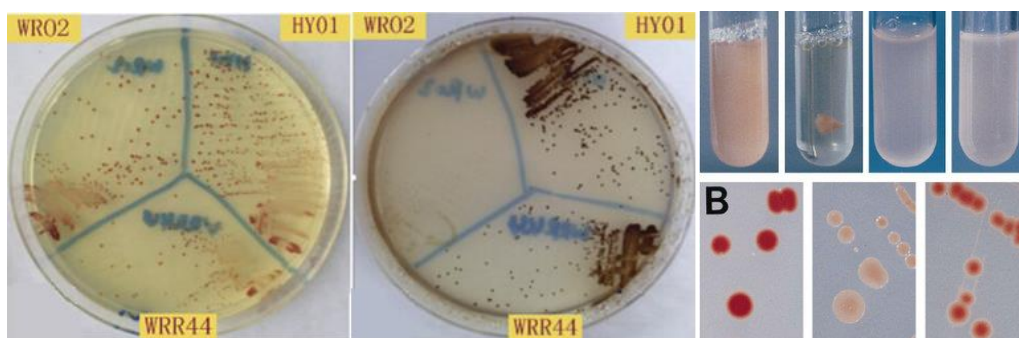


Рис. 3.2 Ізольовані колонії *R. sphaeroides* HY01[35-36]

### Фізіолого-біохімічні властивості

*R. sphaeroides* HY01 є метаболічно різноманітною бактерією, яка здатна використовувати широкий спектр вуглецю та джерел енергії. Розглянемо основні фізіологічні та біохімічні властивості даного організму:

**Енергетичний метаболізм:** *R. sphaeroides* HY01 може генерувати енергію за допомогою як аеробного, так і анаеробного дихання, а також фотосинтезу. *R. sphaeroides* HY01 також здатний до бродіння, хоча це менш ефективно, ніж дихання або фотосинтез. Бактерія може використовувати різні акцептори електронів, включаючи кисень, нітрат і сульфат.

**Фіксація азоту:** *R. sphaeroides* HY01 може фіксувати атмосферний азот в аміак, який потім можна використовувати як джерело азоту для бактерії або для інших організмів у навколишньому середовищі [31].

**Фотосинтез:** *R. sphaeroides* HY01 може здійснювати фотосинтез, використовуючи бактеріохлорофіл а та різні каротиноїди як пігменти. Це дозволяє йому використовувати енергію світла для генерації АТФ і відновлення NADP<sup>+</sup> до NADPH. На відміну від рослин і водоростей, які використовують воду як донор електронів у фотосинтезі, *R. sphaeroides* HY01 використовує різні органічні сполуки або навіть водень як донори електронів [31-37].

**Вуглецевий метаболізм:** *R. sphaeroides* HY01 може використовувати

широкий спектр джерел вуглецю, включаючи глюкозу, фруктозу, сахарозу та різні органічні кислоти. [31].

Виробництво пігменту: *R. sphaeroides* NY01 виробляє різні пігменти, включаючи бактеріохлорофіл а та різні каротиноїди. Ці пігменти не тільки відіграють важливу роль у фотосинтезі, але й забезпечують захист від окислювального стресу та УФ-випромінювання [31, 37].

Розпізнавання кворуму: *R. sphaeroides* NY01 використовує розпізнавання кворуму для регулювання експресії генів і координації поведінки з іншими бактеріями в своєму середовищі. Відчуття кворуму передбачає виробництво та виявлення сигнальних молекул, які називаються аутоіндукторами, які накопичуються в міру зростання популяції бактерій [36]

#### **2.4. Таксономічний статус біологічного агента**

Положення *R. sphaeroides* NY01 у філогенетичній систематиці наведено згідно Taxonometry Browser для синонімічного організму *Cereibacter sphaeroides* NY01 [38]:

Домен – *Bacteria*

Тип – *Pseudomonadota*

Клас – *Alphaproteobacteria*

Порядок – *Rhodobacterales*

Родина – *Paracoccaceae*

Рід – *Cereibacter*

Вид – *Cereibacter sphaeroides*

Штам – *Cereibacter sphaeroides* NY01

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

### 3.1 Потреба у цільовому продукті

Коензим Q10 - це натуральний антиоксидант, що виробляється в організмі людини та відіграє важливу роль у багатьох функціях. Він є ключовим фактором у процесі утворення енергії в клітинах і потрібний для нормального функціонування мітохондрій, які є «енергетичними центрами» клітин. Також коензим має потужну антиоксидантну дію, здатний захищати клітини від шкідливого впливу вільних радикалів.

Проте, з віком рівень синтезованого організмом коензиму може зменшуватися, тому доцільним є використання препаратів або ж засобів, що містять у своєму складі Q10.

Розглянемо основні причини, чому слід підтримувати достатній рівень коензиму в організмі. Коензим здатний:

- Знижувати артеріальний тиск, рівень холестерину підтримувати нормальний кровообіг та зменшувати ризик розвитку серцевих захворювань, таких, наприклад, як аритмія або ж інфаркт;
- Забезпечувати повноцінну функціональність м'язів, а також зменшувати ризик розвитку міопатії;
- Захищати клітини мозку від пошкоджень вільними радикалами, підтримує нормальну функціональність мозку. Прийом коензиму Q10 може зменшувати ризик розвитку захворювань, пов'язаних зі старінням мозку, таких як хвороба Паркінсона;
- Зменшувати ризик захворювання на застуду та грип, підтримуючи імунну систему;
- Зменшувати ризик розвитку захворювань очей, таких як катаракта та дегенеративні захворювання сітківки;

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.38 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Іванець О. А.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Скροцька О. І.					27	116
Реценз.						27 Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабнікоа В. П.						

- Зменшувати ризик розвитку печінкових захворювань, таких як жирова дистрофія печінки;
- Зменшувати ризик розвитку захворювань яєчників, таких як ендометріоз та полікістоз;
- Боротися зі старінням шкіри, покращує її регенерацію, тим самим зменшуючи зовнішні ознаки старіння, такі як, наприклад, сухість або зморшки;
- Брати участь у процесі виробництва енергії в клітинах, допомагаючи перетворювати харчові речовини на енергію. Таким чином, він може допомагати підтримувати енергію та витривалість під час фізичних навантажень.

Втім, не лише людям похилого віку потрібно вживати коензим Q10 через його зменшений синтез. Існують лікарські препарати, вживання яких призводить до передчасного виведення коензиму, або зменшення його синтезу. В таких випадках рекомендується вживати вітамінні комплекси, що містять коензим. Також існують хвороби, попередити які в певній мірі можливо за рахунок достатнього рівня коензиму в організмі, терапії за участі Q10. Розглянемо основні напрямки, де можливо застосовувати Q10 задля покращення фізичного стану людини, та випадки, де необхідним є додаткове вживання коензимів задля уникнення патологій.

**Статини та їх вплив на рівень коензиму.** Ці ліки на сьогоднішній день є найефективнішими засобами для зниження рівня холестерину в крові, таким чином, запобігаючи виникненню захворювань серцево-судинної системи. Але часто статинотерапія припиняється через розвиток міопатії, що пов'язана зі зменшеним синтезом коензиму в організмі на 19-54%, і може призвести не лише до больових відчуттів у м'язах, а й часом до розпаду м'язів через підвищений рівень креатинкінази (фермент, що міститься в скелетних м'язах) [39-40].

Згідно з дослідженнями, за останні 30 років в Україні неупинно зростає показник серцево-судинних захворювань (зріс в 3,5 рази), тягнучи за собою

досить високий показник смертності, який нині виріс на 46 %. Тому не дивно, що в нашій країні поширена гіперхолестеринемія. 46% чоловіків і 61% жінок потребують профілактичного лікування, тоді як 30% чоловіків і 43% жінок вже мають підвищений рівень загального холестерину в крові (5,2 – 6,2 ммоль/л), а у кожного шостого громадянина, незалежно від статі, рівень холестерину перевищує 6,2 ммоль/л. Також слід зазначити, що з віком частота гіперхолестеринемії поступово зростає, і у віці 55-64 роки показник ризику в тричі вище, ніж у людей, віком від 18 до 24 років [41].

При цьому, слід зазначити, що вживання добавок, що містять коензим, здатні мінімізувати побічні реакції при вживанні статинів і забезпечити більшу ймовірність, що пацієнт проп'є 3-місячний курс лікування статинами [40].

Найчастіше для лікування гіперхолестеринемії призначаються «Розувастатин» і «Аторвастатин» [42]. Обидва препарати є доступними, ціна для засобів, що мають дозування 5-10 г (початкові дози при проходженні курсу лікування), становить до 100 грн за упаковку (28-30 таблеток), що відповідає 1 місяцю лікування. Але серед побічних реакцій обидва перпарати мають порушення опорно-рухової системи, включаючи міопатію та міалгію [43-44], тому доречним є приймання БАДів, що міститимуть коензим. Наприклад, препарат «Коензим Q10 таблетки №40» (ТОВ «Еліт-фарм» Україна) коштує 75 грн, містить 40 капсул в упаковці, при цьому курс становить 4-6 тижнів, що відповідатиме 2 – 3 упаковкам.

Також, для подолання побічних реакцій при лікуванні статинами можна використати вітамін D [40], але залишиться дефіцит коензиму в організмі, що може впливати не лише на опорну систему, а й на інші, тому це не буде якісним вирішенням проблеми. Тому пропоную розглянути кількість людей, які потребуватимуть коензиму при лікуванні статинами. Як зазначалося вище, профілактичного лікування потребує 46% чоловіків і 61% жінок.

Станом на 1 січня 2022 року, в Україні налічувалося 19 006 979 чоловіків та 21 990 719 жінок [45].

Тоді, кількість чоловіків, що потребують лікування статинами:

$$19\,006\,979 \div 100 \times 46 = 8\,743\,211 \text{ осіб}$$

А кількість жінок становитиме:

$$21\,990\,719 \div 100 \times 61 = 13\,414\,339 \text{ осіб}$$

Якщо принаймні 10 відсотків з них зацікавиться додатковим прийомом коензиму, матимемо:

$(8\,743\,211 \div 100 \times 10) + (13\,414\,339 \div 100 \times 10) = 2\,215\,755$  осіб, для яких необхідно забезпечити 90 мг на добу для молодих людей, та 180 мг для людей похилого віку. Курс може тривати до 6 тижнів, тому розрахуємо кількість коензиму, що потрібна буде молодим людям і людям похилого віку (24,6% від загальної кількості). Отримаємо:

$2\,215\,755 \div 100 \times 24,6 = 545\,076$  людей похилого віку, і відповідно, 1 670 679 молодих людей.

Візьмемо середню тривалість курсу - 4 тижні (28 днів), для даного лікування необхідно прийняти 84 таблетки (тричі на добу по одній таблетці) для молодих людей та 168 таблеток для людей похилого віку (тричі на добу по дві таблетці). Одна таблетка в середньому містить 30 мг коензиму, тому молода людина прийме 2 520 мг протягом курсу, а людина похилого віку – 5 040 мг.

Всього ж необхідно забезпечити:  $2\,520 \times 1\,670\,679 + 5\,040 \times 545\,076 = 6\,957\,294\,120$  мг Q10.

**Бета-блокатори і їх здатність знижувати рівень коензиму.** На даний момент все ще немає чіткої відповіді: знижують бета-блокатори рівень коензиму в організмі людини, чи ні, але все більше з'являється досліджень з приводу того, що вживання коензиму здатне запобігти розвитку серцево-судинних захворювань, таким чином усунувши бета-блокатори з ринку. CoQ10 відіграє потенційну роль у профілактиці та лікуванні серцевих захворювань, оскільки покращує клітинну біоенергетику, здатний поглинати вільні радикали та має судинорозширювальний ефект. Також він пригнічує окислення LDL і, відповідно, прогресування атеросклерозу. Коензим здатний зменшувати в'язкість крові, що корисно для пацієнтів із серцевою

недостатністю та ішемічною хворобою серця. У різних дослідженнях, проведених за участю пацієнтів із серцевою недостатністю, гіпертонією, ішемічною хворобою серця та іншими серцевими захворюваннями, спостерігалось значне покращення клінічних і гемодинамічних параметрів, а також переносимості фізичних навантажень у пацієнтів, які додатково отримували коензим Q10 у дозах від 60 до 200 мг на день [46].

Проте ефективність блокаторів  $\beta$ -адренорецепторів, щодо клінічних проявів ішемічної хвороби серця і впливу на прогнози у пацієнтів була доведена багатьма дослідженнями. Основний механізм їх полягає в перешкоджанні впливу на них медіатора – норадреналіну та катехоламінів. В Україні найбільш популярними є такі бета-блокатори: «Бісопролол», «Небіволол» і «Карведилол».

«Карведилол» – неселективний блокатор з судинорозширювальними властивостями та вторинною антиоксидантною активністю. Він здатний знижувати периферичний опір, виконуючи функції судинорозширювального засобу, а як безпосередньо блокатор  $\beta$ -адренорецепторів пригнічує симпатoadреналову та ренін-ангіотензин-альдостеронову системи. Даний препарат має певні обмеження і не застосовується при терапії гострого нападу стенокардії.

«Небіволол» - селективний антагоніст  $\beta$ -адренорецепторів, має м'які вазодилатуючі властивості (взаємодія з L-аргініном/оксидом азоту), але важливим уточненням є те, що ні сам «Небіволол», ні його оригінал «Bystolic» не мають прямого показання для лікування ІХС і призначалися спочатку для лікування артеріальної гіпертензії.

«Бісопролол» - високоселективний блокатор  $\beta_1$ -адренорецепторів. Він не має внутрішньої симпатоміметичної активності та мембраностабілізуючих властивостей. Оскільки препарат високоселективний, забезпечує високу гарантію безпеки і хорошу переносимість препарату навіть тими пацієнтами, що мають складну коморбідну патологію. Вибіркова блокада  $\beta_1$ -адренорецепторів захищає від впливу препарату гладку мускулатуру бронхів,

периферичних артерій, вуглеводневий і ліпідний обмін, а подвійний шлях виведення забезпечує можливість використання людьми з порушенням ниркової або печінкової функцій. «Бісопросол» також можна використовувати з іншими серцево-судинними препаратами. Препарат має тривалий період напіввиведення, тому 1 таблетки на добу цілком достатньо, аби досягнути бажаного ефекту.

Так, звичайно, через легкодоступність бета-блокаторів, частими є випадки передозування, що можуть призвести до тяжких наслідків, але все ж таки, при дотриманні всіх норм, це один з найефективніших засобів, і тому, я вважаю, замінювати блокатори на коензим є недоречним, оскільки було проведено недостатньо досліджень, стосовно його можливостей лікувати ІХС. Він може значно покращити стан серцево-судинної системи, може використовуватися додатково як профілактичний засіб, але не зможе на даний момент замінити бета-блокатори [47].

**Запобігання розвитку ЦД.** Цукровий діабет на сьогоднішній день стає все поширенішим захворюванням на ряду з захворюваннями серцево-судинної системи. Вже ні в кого не виникає сумнівів, що ендотеліальна дисфункція, спричинена окисним стресом та запаленнями в результаті гіперклікемії є ключовими факторами розвитку судинних ускладнень цукрового діабету 2 типу, а він, в свою чергу, призводить до серцево-судинних захворювань [48]. В останні роки з'являються докази, що статинотерапія може призвести до розвитку діабету, хоча це, звичайно, залежатиме від віку людини, належності її до групи ризику, а також від виду статину і його сили. В мета-аналізі WOSCOPS (91 140 учасників), в ході досліджень було з'ясовано, що ризик розвитку діабету був на 9 % вищий у тих людей, що приймали протягом 4-річного лікування статини, у порівнянні з людьми, що обрали стандартне лікування. Проте, не всі статини можуть однаково сприяти розвитку діабету, також слід зважати на дози. Нині вважається, що високоефективним для лікування серцево-судинних захворювань є приймання високих доз статинів, що в свою чергу може призвести до розвитку ЦД. Потенційним діабетогенним

ефектом володіють «Аторвастин», «Симвастатин» та «Розувастин». Нагадаємо, перший і третій препарати найчастіше призначаються в Україні. Слід зазначити, що є препарат «Пітавастатин», він легше переноситься організмом, але не уступає силою «Аторвастину», а також є нейтральним по впливу на рівень глюкози у крові, що зменшує ризик розвитку ЦД. Повернемося до коензиму: досліджено, що «Аторвастин» знижує рівень коензиму у плазмі крові на 40%, що призводить до зниження секреції інсуліну, оскільки відбувається пряме пригнічення синтезу АТФ. Також знижується рівень мітохондріальної гліцерол-3-фосфатдегідрогенази, що досить критично для функціональності мітохондрій. Дисфункція мітохондрій здатна призвести до інсулінорезистентності скелетних м'язів. Тому дуже важливо при лікуванні статинами приймати добавки коензиму, оскільки вони також можуть покращувати функції бета-клітин підшлункової залози та підвищувати чутливість до інсуліну [49]. На рівні з прийомом коензиму аби знизити ризик розвитку ЦД під дією статинів, також є досить багато досліджень, що вивчають можливість застосування Q10 задля зниження біомаркерів цукрового діабету, але поки що немає чіткої відповіді: допомагає вживання коензимів чи ні. В ході аналізу вченими Ісфаханського університету медичних наук було досліджено 16 статей, в яких описувалися клінічні дослідження, націлені на виявлення користі коензиму при наявному діабеті. Згідно з їх даними, на сьогоднішній день, немає прямих доказів, що Q10 можна використовувати задля поліпшення стану пацієнтів, хоча, безперечно, він може покращити загальний стан людини, а іноді і вплинути на рівень інсуліну [50].

**Терапія хвороби Гентінгтона.** Це спадковий розлад, що спричиняє поступове руйнування та відмирання нейронів мозку. Хвороба Гентінгтона вражає від 3 до 7 на 100 000 людей білої раси (1200 – 2800 людей в Україні). Проявляється в 35-50 років. Після перших проявів людина може прожити 10-15 років. Хвороба вражає ділянки мозку, що відповідають за контроль рухів. При прогресуванні хвороби розвиваються танцювальні рухи і

ненормальні пози тіла, також поступово з'являються проблеми з поведінкою, мисленням [51-53]. Зазначається, що однією із стратегій лікування цієї хвороби є використання коензиму Q10. Вважається, що хоча механізм дії коензиму у хворобі Гантінгтона не повністю зрозумілий, показано, що він може знизити рівень окислювального стресу в клітинах мозку та покращити енергетичний метаболізм, а також допомогти загальмувати процес зменшення нейронів і зберегти їх функції якомога швидше. Але із доступних до ознайомлення статей відомо лише те, що дослідження охоплювали малу кількість людей і показали лише незначне зниження рівня окислювального стресу в клітинах мозку, при цьому не було відмічено ніяких змін у моториці та когнітивних здібностях [54-56]. Тому на даний момент не має особливої необхідності приймати коензим у разі такої недуги, його можна приймати як допоміжний засіб, що покращить загальний стан хворого, але, на жаль, поки що немає даних стосовно можливості загальмувати прогресування хвороби або ж полегшити її симптоми.

**Терапія хвороби Паркінсона** Дана хвороба є другим за поширеністю нейродегенеративним розладом після хвороби Альцгеймер. У всьому світі спостерігається зростання поширеності захворювань через збільшення віку населення. В Україні кількість хворих людей перевищує 23 000 осіб [57]. Розглянемо роль коензиму під час терапії даного недугу. Він допомагає переносити електрони та виконує роль антиоксиданта, захищаючи клітини від пошкоджень, що можуть виникнути в результаті окислювального стресу. Оскільки окислювальний стрес є однією з головних причин пошкодження нейронів у хворобі Паркінсона, то коензим Q10 може допомогти зменшити пошкодження та покращити функціонування мозку. Крім того, деякі дослідження показали, що коензим Q10 може допомагати збільшувати рівень допаміну в мозку, який є головним нейромедіатором, що відповідає за координацію рухів. Хвороба Паркінсона пов'язана зі зниженням рівня допаміну в мозку, тому збільшення його рівня може допомогти зменшити симптоми хвороби. Вплив Q10 був досліджений в рамках декількох клінічних

досліджень. Одним з найбільш відомих досліджень проводилося в 2002 році. У цьому дослідженні взяли участь 80 пацієнтів з ранніми стадіями хвороби Паркінсона, які були розподілені на дві групи. Одна група отримувала коензим Q10 у дозі 300 мг на день, а інша група отримувала плацебо. Тривалість дослідження становила 16 місяців.

Результати дослідження показали, що пацієнти, які отримували коензим Q10, мали меншу швидкість погіршення рухової функції порівняно з пацієнтами, які отримували плацебо. Крім того, в групі, яка отримувала коензим Q10, було менше випадків відмови від лікування через непереносимість [58-61]. Однак, важливо зазначити, що хоча результати досліджень щодо ефективності коензиму Q10 у лікуванні хвороби Паркінсона досить обнадійливі, це не є достатньою підставою для самостійного застосування добавок, тому в кожному окремому випадку необхідно проконсультуватися з лікарем.

Максимальна доза для отримання найбільш позитивних результатів – 1200 мг на добу, але на даний момент, немає впевненості, що це безпечна доза, тому приймемо максимально безпечну, 600 мг/доба [62]. На ринку БАДи з таким дозуванням коштують приблизно 1600 грн, основними виробниками їх є «Doctor's Best» і «Healthy Origins».

Припустимо, що принаймні 2 відсотки хворих на Паркінсона віком від 65 років зацікавляться можливістю позитивної підтримки, за рахунок вживання коензиму. Ці люди зможуть прожити приблизно 10 років. Кількість цих людей становитиме:

$23\ 000 \div 100 \times 2 = 460$  людей, які щодня прийматимуть по 600 мг протягом 16 тижнів, тоді кількість коензиму, що буде необхідна, складе:  
 $460 \times 600 \times 112 = 30\ 912\ 000$  мг на рік

**Полегшення перенесення ліків, під час лікування раку.** На даний момент не доведено, що кількісні зміни рівню коензиму здатні впливати на розвиток раку, але було встановлено, що додавання добавок з коензимом може захистити від кардіотоксичності або токсичності ліків для печінки [63]. При

цьому слід додати, що підвищений рівень коензиму в крові під час менопаузи може бути пов'язаний із підвищеним ризиком раку молочної залози [64]. Також, в цілому відмічається, що при ракових захворюваннях дещо знижується кількість коензиму в організмі, його можна поповнити, використовуючи різні БАДи

Рівень коензиму в організмі може зменшуватися і через тiazидні діуретики («Гідрохлоротiazид», «Хлорталідон», «Індпамід»), трициклічні антидепресанти («Амітриптилін», «Амоксапін» («Асендін»), «Кломіпрамін» («Анафраніл»), «Дезипрамін» («Норпрамін»), «Доксепін» («Sinequan» для перорального застосування та місцевий крем «Zonalon»), «Іміпрамін» («Тофраніл-ПМ» і «Тофраніл»), «Нортриптилін» («Авентил» і «Памелор»), «Протриптилін» («Вівактил»), «Триміпрамін» («Сурмонтіл»). Але в цілому, рівень коензиму не надто знижується при вживанні даних препаратів, тому невідкладної необхідності у поповненні коензиму немає. Звичайно, можна пропити курс коензиму, або ж змінити препарат, але, зазвичай, не виникає такої необхідності [65].

Щодо ліків, які містять коензим, в основному це стосується БАДів та вітамінних комплексів, що є повністю імпортною продукцією, і тому їх ціна становить від 200-300 грн за мінімальне дозування, слід зазначити, ці комплекси є досить якісними і гарно себе зарекомендували, але, якщо людині потрібно приймати високі дози коензиму щодня, її чекатиме досить дорогий курс лікування. Можна використати більш дешеві українські аналоги. Це препарати, виготовлені українськими невеликими підприємствами, що самостійно закупають сировину з інших країн. Але невідомо яку сировину вони закупають і чи якісними є ці комплекси/препарати.

Загалом, на українському ринку можна знайти досить широкий асортимент добавок як у комплексі з іншими речовинами (зазвичай вітамін Е), так і лишень з коензимом. Ціна варіюється від 75 грн до 4500 грн, в залежності від складу та виробника. Основні виробники: «Doctor's Best», «Healthy Origins», «Bluebonnet Nutrition», «Now Foods», «Solgar», «Еліт-фарм».

Зазвичай коензим продається у формі капсул, в залежності від кількості мг встановлюється доза. Дані добавки позиціонуються як засоби, використання яких доцільне при:

- Порушеннях пам'яті
- Головному болі
- Захворюваннях шкіри
- Запаленні слизових оболонок організму
- Захворюваннях серцево-судинних систем

Не рекомендуються при вагітності, годуванні грудьми, гастритах, виразках.

У якості аналогів можна скористатися Куркумінами та добавками, що містять Селен. Вони мають схожі властивості, але комплекси з коензимом більш доступні для пересічного громадянина, оскільки цілком можливо придбати БАД за 75 грн (щоправда невідомо, наскільки якісний, але українськи комплекси з куркумой і селеном коштують все одно більше).

Згідно з даними, 72 % українців купують БАДи [66], це:

$$36\,825\,925 \div 100 \times 72 = 26\,514\,666$$

Припустимо, що 5 % з цих людей зацікавиться нашою продукцією, тоді, кількість цих людей буде становити:

$$26\,514\,666 \div 100 \times 5 = 1\,325\,734 \text{ особи}$$

Для проходження одного курсу протягом 4 тижнів, необхідно забезпечити одну людину 2800 мг коензиму, тоді загальна кількість коензиму буде становити:

$$1\,325\,734 \times 2800 = 3\,712\,055\,200$$

Оскільки коензим не виробляється в Україні, а ввозиться з країн ЄС, США, Японії, неможливою є детальна оцінка конкурентоздатності нового виробництва. Було досліджено кількість імпортованого коензиму до України. Згідно з отриманими даними, за останні 10 років було ввезено 23064 упаковки коензиму, загальний вміст Q10 в них становив 2 304 324 240 мг [67]. При цьому також на даному сайті було зазначено, що в останні 3 роки збільшилася

поставка безпосередньо сировини з вмістом Q10 318 000 000 мг

На мою думку, враховуючи ситуацію з рівнем холестерину в нашій країні, необхідно проінформувати якомога ширше коло потенційних споживачів коензиму, оскільки середній показник рівня холестерину по країні становить від 5 ммоль/л, що вже перевищує європейські показники і може нести загрозу для здоров'я людини. При цьому, як вже зазначалося вище, значний відсоток населення має рівень холестерину вище 6,2 ммоль/л, що цілком може призвести до захворювань серцево-судинної системи. А як відомо, в Україні досить висока смертність саме через серцево-судинні захворювання. До цього ж, як ми вже визначили, лікування найбільш поширеними в країні статинами може призвести до розвитку діабету, якщо паралельно не пропити курс коензиму. Також необхідно звернути увагу на можливість гальмування прогресування хвороби Паркенсона. Хоча в Україні не так багато хворих на цей недуг, всім цим людям також необхідна допомога, а коензим показав, що здатний покращити не лише загальний стан хворих, а й допомогти загальмувати розвиток хвороби, допомагаючи людям зберегти свої когнітивні здібності, що в свою чергу дозволить їм залишатися членами нашого суспільства і полегшить їх життя.

### **3.2. Розрахунок потужності виробництва**

Ми вже підраховали, що для людей з підвищеним холестерином необхідно 6 957 294 120 мг, хворим на Паркінсона 30 912 000 мг, тоді як для людей, що просто турбуються про своє здоров'я потрібно 3 712 055 200 мг.

Загальна кількість коензиму становитиме:

$$6\,957\,294\,120 + 3\,712\,055\,200 + 30\,912\,000 = 10\,700\,261\,320 \text{ мг}$$

**Отже, для забезпечення фармацевтичного ринку для початку необхідно отримувати 10,7 т коензиму.**

### **3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів**

Потужність нашого виробництва має складати 10,7 т/р Q10. Продукент коензиму - *Rhodobacter sphaeroides* NY01, синтезує 1,95 г/л [28].

Плануємо, що вибрану кількість субстанції будемо виробляти за  $T_{рд} = 60$  робочих трудоднів. Кількість циклів на рік становить:

$$N_{цк} = 24 \times T_{рд} \div T_{цф} = 24 \times 60 \div 81,5 = 18 \text{ циклів,}$$

де  $T_{цф}$  – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (75 год) та час підготовки ферментера до роботи (6,5 год): миття та огляд апарата (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів (0,5 год), стерилізація апарату (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища

Кількість продукту за цикл складає:

$$G_{цк} = G_{рп} \div N_{цк} = 10\,700 \div 18 = 594 \text{ кг/цикл.}$$

При отриманні КР втрати, пов'язані з краплевиносом через колектор відпрацьованого повітря, становлять 10%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом:

$$V_p = V_{кр} \div (1 - E_f) = 594 \div (1 - 0,1) = 660 \text{ л}$$

Таку кількість КР можна буде отримати у ферментері з геометричним об'ємом :  $V_{г} = 660 \div 0,6 = 1\,100$  л найближчий доступний ферментер з геометричним об'ємом 1 000 л

### **3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу**

Виробничий біосинтез буде здійснюватись у ферментері об'ємом  $1 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Робочий об'єм ферментера визначають:

$$V_{роб} = V_{г.ф} \times K_{зап},$$

де:  $V_{г.ф}$  – геометричний об'єм ферментера;  $K_{зап}$  – коефіцієнт заповнення

$$V_{роб} = 1 \times 0,6 = 0,6 \text{ м}^3 .$$

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища. Тому, для одержання  $0,06 \text{ м}^3$  культуральної рідини потрібно:

$$V_{роб.1} = 0,6 \times 0,1 = 60 \text{ дм}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту (60 літрів) можна одержати під час культивування в інокуляторі на  $100 \text{ дм}^3$

Для одержання  $60 \text{ дм}^3$  культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб.2}} = 60 \times 0,1 = 6 \text{ дм}^3 \text{ посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту (6 літрів) можна одержати під час культивування в інокуляторі на  $10 \text{ дм}^3$

$$V_{\text{роб.3}} = 6 \times 0,1 = 0,6 \text{ дм}^3 \text{ посівного матеріалу}$$

600 мл посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування в колбах на качалці.

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

### 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Для синтезу коензиму Q10 за допомогою *Rhodobacter sphaeroides* NY01 в якості ростового субстрату виступає глюкоза [28]. Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes катаболізм глюкози у даного мікроорганізму відбувається за шляхом Ентнера-Дудорова, в якому глюкоза спочатку перетворюється на глюкозо-6-фосфат завдяки гексокіназі, а потім під дією ферменту глюкозо-6-фосфат-1-дегідрогенази (КФ: 1.1.1.49) перетворюється на глюконо- $\delta$ -лактон-6-фосфат. Далі під дією 6-фосфоглюконолактази (КФ: 3.1.1.31) відбувається перетворення на 6-фосфоглюконат. Він під дією ферменту 6-фосфоглюконатдегідратази (КФ: 4.2.1.12) перетворюється на 2-кетоглюкозо-3-дезоксиглюкозо-6-фосфат, який потім завдяки 2-кетоглюкозо-3-дезоксиглюкозо-6-фосфатальдолазі (КФ: 4.1.2.14) утворює гліцеральдегід-3-фосфат, далі під дією гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази утворюється 1,3-дифосфогліцерат, який перетворюється на 3-фосфогліцерат завдяки фосфогліцераткіназі. Він під дією гліцератфосфомутази, фосфогліцератфосфомутази та фосфогліцератфосфомутази утворює фосфоенолпіруват, а той в свою чергу перетворюється на піруват під дією піруваткінази.

Схема катаболізму глюкози наведена на Рис. 4.1 [68]

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.38 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Іванець О. А.			РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.		Скороцька О. І.					41	116
Реценз.						41 Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабнікоа В. П.						

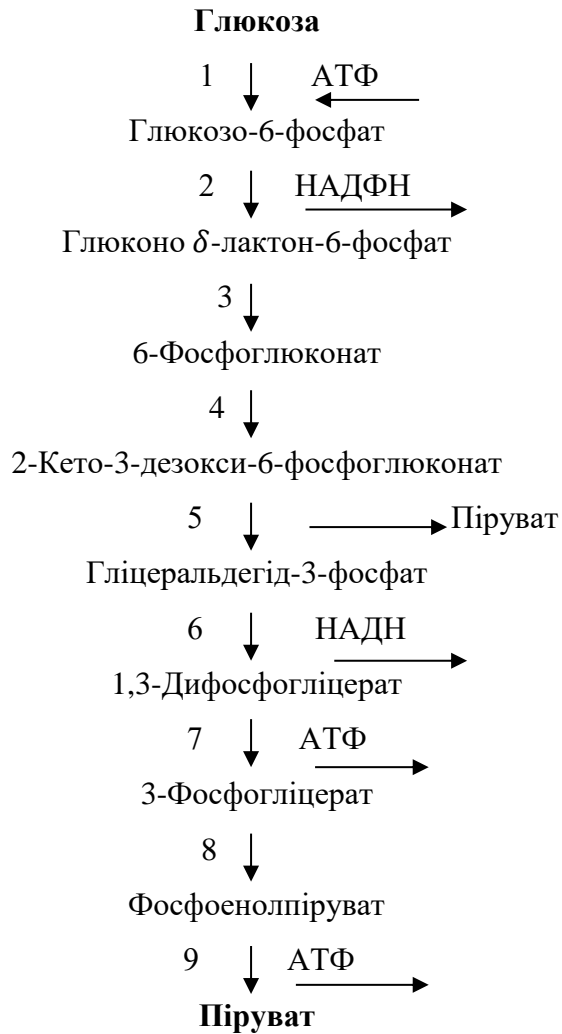


Рис. 4.1 Шлях катаболізму *Rhodobacter sphaeroides* NY01 на глюкозі:  
 Ферменти: 1. гексокіназа, 2. глюкозо-6-фосфат-1-дегідрогеназа (КФ: 1.1.1.49),  
 3. 6-фосфоглюконолактаза (КФ: 3.1.1.31), 4. 6-фосфоглюконатдегідротаза  
 (КФ: 4.2.1.12), 5. 2-кетоглюконо-3-дезоксифосфоглюконоальдолаза (КФ: 4.1.2.14), 6.  
 гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа    7.    фосфогліцераткіназа,    8.  
 гліцератфосфомутаза,    фосфогліцератфосфомутаза    та  
 фосфогліцератфосфомутаза, 9. піруваткіназа

## 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

За умов росту *Rhodobacter sphaeroides* NY01 з використанням глюкози і якості джерела вуглецю, утворюються ацетил-КоА, за рахунок катаболізму жирних кислот. Ацетил-КоА потім залучається до ЦТК. Аби поповнити втрати проміжних продуктів циклу три карбонових кислот необхідна наявність анаплеротичних реакцій, в даному випадку, оскільки субстратом є вуглевод, основними анаплеротичними реакціями будуть карбоксилювання ФЕП з утворенням оксалоацетату, пірувату з утворенням оксалоацетату, а також утворення малату в ході карбоксилювання пірувату.

Глюкозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу, в якому утворюються попередники необхідної нам ароматичної амінокислоти, тирозину (попередник еритрозо-4-фосфат).

Ацетил-КоА під дією ферменту 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА-синтази-1 перетворюється на 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА. Ця сполука піддається впливу 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктази з послідуєчим перетворенням на мевалонат, який в свою чергу під дією мевалонаткінази утворює мевалонат-5-фосфат. До метаболізму залучається фермент фосфомевалонаткіназа, що призводить до появи мевалонат-5-пірофосфату. Під дією ферменту MVD дана сполука перетворюється на D-3-ізопентинілпірофосфат, а він в свою чергу на, за рахунок впливу на попередника ізопентинілпірофосфат- $\delta$ -ізомеразаю. Диметилалілпірофосфат піддається впливу наступних ферментів фернисилдифосфатсинтази і геранілгеранілпірофосфатсинтази з утворенням геранілпірофосфату, а потім, під впливом цих же ферментів утворюється фернесілпірофосфат. Залучаємо знову фермент геранілгеранілпірофосфатсинтазу, утворюється геранілгеранілпірофосфат. Потім декапринілдифосфаткіназа зумовлює перетворення на декапринілпірофосфат і врешті-решт утворюється коензим Q10 [69].



## РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Для *Rhodobacter sphaeroides* НУ01 оптимальною є температура в 30 °С та значення рН 6,5, отже, можливим є розвиток контамінації сторонніми мезофільними або ж термофільними мікроорганізмами [28, 70]. Це зумовлює необхідність забезпечення асептичних умов під час біосинтезу, чого не можливо досягти при поверхневому (твердо-фазному) культивуванні. Асептичні умови забезпечуються стерилізацією обладнання і комунікацій, поживного середовища, аераційного повітря, необхідного для забезпечення росту *R. sphaeroides* та синтезу ним убіхінону.

Організм є скоріше анаеробом, проте задля синтезу коензиму культивують аеробно, без світла, також необхідно використовувати піногасники [71]. Для запобігання контамінації в ферментері створюється надлишковий тиск подачею стерильного аераційного повітря. Культивування здійснюють глибинним способом.

Культивували даний мікроорганізм, щоб отримати максимальну кількість продукту періодично [28]. Безперервне культивування вважаю недоцільним, адже в цьому разі спостерігається зниження концентрації коензиму в культуральній рідині.

#### 5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

В залежності від умов культивування біологічного агента конструкція і оснащення ферментера може значно різнитися. Визначившись зі способом культивування та фізіолого-біохімічними особливостями, необхідно обрати

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.38 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Іванець О. А.			РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Скороцька О. І.					45	116
Реценз.						45 Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабнікоа В. П.						

тип ферментера, згідно необхідного нам оснащення.

У процесі культивування задля отримання убіхінону, необхідно створити аеробні умови, це означає, що ферментер повинен бути оснащений системою подачі кисню, яка включатиме компресор, вхідний та вихідний повітряні фільтри, розпилювач повітря.

Щоб збільшити масообмін, необхідна наявність перемішуючого пристрою: мішалки і перегородок.

Необхідно підтримувати сталу температуру, для цього потрібні температурні датчики та система теплопередачі, сорочка для передачі тепла. Також є необхідними рН датчики.

При культивуванні можливим є піноутворення, щоб його подолати використовують піногасники на рослинній основі або силіконові.

Враховуючи необхідні складові, вирішено взяти реактор з постійним перемішуванням, який відповідає всім необхідним умовам, є ефективним та недорогим [72].

### **5.1.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря**

*Rhodobacter sphaeroides* NY01 задля отримання убіхінону слід культивувати аеробно, для цього необхідно забезпечити безперервну подачу стерильного аераційного повітря через барботер, адже найважливішим завданням буде забезпечення достатньої кількості стерильного повітря, аби здійснювати аерацію [73].

З посівною культурою працюватимуть у боксах, де стерилізацію повітря здійснюють за допомогою опромінення ультрафіолетовими лампами [74].

Аби підготувати стерильне аераційне повітря для культивування у виробничому ферментері, необхідно здійснити насамперед забір атмосферного повітря. Повітря забирають за допомогою турбокомпресора через забірну шахту. Вона знаходиться на висоті близько 20-30 м, адже на цій висоті концентрація мікроорганізмів вважається стабільною. Після забору,

необхідно очистити повітря від пилу і механічних часточок. Це досягається завдяки використанню фільтрів попереднього очищення. Далі необхідно стиснути повітря у турбокомпресорі до 0,35-0,5 МПа. Тиск за компресором можна визначити по розрахунку тиску на подолання опору в системі підготовки повітря. У процесі стиснення повітря, підвищується його температура (120-250°C) і вологість. Високий показник вологості становитиме загрозу контамінації, оскільки може відбутися злипання каналів, що погіршить осадження частинок, або, взагалі, мікроорганізми, що осіли, зможуть розмножуватися на зволжених волокнах фільтру. Аби цього не відбулося, слід забезпечити випадання вологи, охолодивши повітря в теплообміннику до 25-40°C. Потім здійснюється підігрів повітря у теплообміннику до температури в 70-90°C, забезпечить надійну роботу головного та індивідуального фільтрів і разом з цим конденсація пари води не відбуватиметься, а показник вологості не повинен перебільшувати 40% [74]. Далі повітря фільтрується у головному фільтрі, діаметр пор якого становить 0,5-1 мкм, а фільтрувальним матеріалом є базальтові волокна. Встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі. Ступінь очищення головного фільтра становить 95% [74,75]. Від головного фільтру через колектори повітря надходить до індивідуальних фільтрів, що дають змогу отримати ступінь чистоти 99,99%, оскільки вони складаються з ультратонких полімерних волокон [74].

Найпростішим і водночас економічно та технологічно доцільним є очищення повітря за допомогою пористих та волокнистих матеріалів. Фільтрування забезпечує ступінь очищення в 99,99%. Завислі в повітрі частинки затримуються волокнистим матеріалом за рахунок інерційного і дифузійного механізму осадження. Не слід забувати про стерилізацію фільтрів у процесі стерилізації. Ефективним є нагрівання вологою парою впродовж певного часу за температури 125-130 °C. Після стерилізації фільтрувальний матеріал висушують гарячим повітрям

### 5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Виробництво коензиму Q10 для *Rhodobacter sphaeroides* NY01 здійснюється протягом 60 робочих днів і передбачає підготовку виробничого ферментера об'ємом 1 м<sup>3</sup>, реактор об'ємом 75 л та ще два реактори об'ємом 250 л, два збірники об'ємом 25 та 250 л, два інокулятори з об'ємом 10 та 100 л.

Для виробництва коензиму використовується не лише цехове приміщення, де будуть знаходитися реактори, змішувачі, інокулятори та ферментер. Також необхідне приміщення з качалками та лабораторне приміщення (бокси, автоклави, термостати, холодильники та устаткування для проведення контролю).

Пропоную розглянути ескіз плану приміщення з приблизним розташуванням основного обладнання, зображеного на Рис 5.1.3.1. Даний план враховує розміри апаратів, відстань між ними (не менше 1 м) та від стін (1...1,5 м). Важливим є те, що інокулятор на 10 л, збірники, та реактор на 250 мл для підживлюючого розчину глюкози стоять на підставках, а не на підлозі, тому вони не зображуються на ескізі.

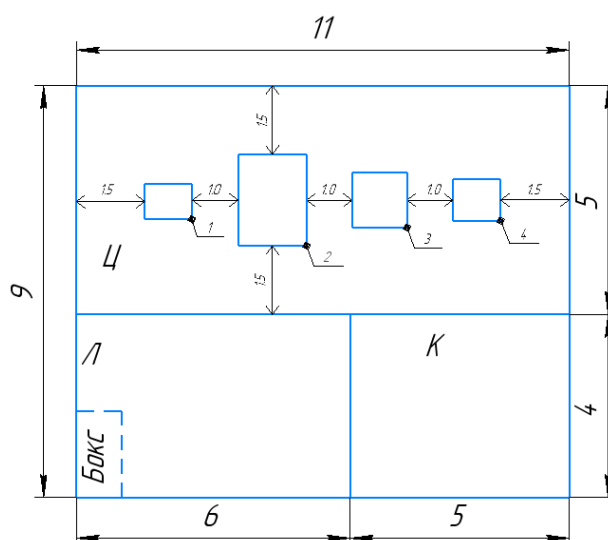


Рис 5.1.3.1 Ескіз плану виробничого приміщення для виробництва коензиму Q10 *Rhodobacter sphaeroides* NY01: Ц – виробничий цех (1 – реактор об'ємом 75 л для приготування композиції А поживного середовища –

отримання посівного матеріалу; 2 – інокулятор об’ємом 100 л для отримання посівного матеріалу; 3 – виробничий ферментер об’ємом 1м<sup>3</sup> для виробничого біосинтезу; 4 - реактор об’ємом 250 л для приготування композиції А поживного середовища – виробничий біосинтез); Л – мікробіологічна лабораторія; К – приміщення з качалками

Далі в Таблиці 5.1.3.1 наведені габаритні розміри основного обладнання, що використовується для даного виробництва.

Таблиця 5.1.3.1

**Габаритні розміри основного обладнання для виробництва Q10**

***Rhodobacter sphaeroides* NY01**

<b>Обладнання</b>	<b>Геометричний об’єм, л</b>	<b>Довжина, м</b>	<b>Ширина, м</b>	<b>Висота, м</b>
Інокулятор для отримання посівного матеріалу	10	0,6	0,57	2,05
Реактор для приготування композиції А - отримання посівного матеріалу	75	1,03	0,8	1,6
Збірник для композиції В – отримання посівного матеріалу	25	0,3	0,3	0,4
Інокулятор для отримання посівного матеріалу	100	2	1,5	2,8
Реактор для приготування композиції А – виробничий біосинтез	250	0,9	1,05	2,05
Реактор для приготування підживлюючого розчину глюкози – виробничий біосинтез	250	0,9	1,05	2,05
Збірник для композиції В – виробничий біосинтез	250	0,9	1,05	2,05
Ферментер для виробничого біосинтезу	1000	1,2	1,2	2,9

*Розрахунок довжини підлоги виробничого цеху.* Враховуючи довжини обладнання, відстань між ним і від стін:

$$1,5 + 1,03 + 1 + 1,5 + 1 + 0,9 + 1 + 1,2 + 1,5 = 10,63 \text{ м (11 м)}$$

*Розрахунок ширини підлоги виробничого цеху.* Враховується максимальна ширина обладнання і відстань від стін отримаємо:

$$1,5 + 2 + 1,5 = 5 \text{ м}$$

Згідно з даними Таблиця 5.1.3.1, загальний об'єм ємнісного обладнання становить:  $10 + 75 + 25 + 100 + 250 + 250 + 250 + 1000 = 1960$  л

Генеральне прибирання, що включає обробку не лише підлоги, а й стін, стелі, вікон, дверей, необхідно проводити принаймні раз на місяць, тоді, це щонайменше двічі за період виробництва коензиму. При цьому, щоденне прибирання підлоги необхідно проводити щодня, в результаті це 60 разів. Тому, для того, щоб розрахувати кількість мийно-дезінфікуючих засобів, для початку треба розрахувати приблизну площу оброблення.

*Висота виробничого цеху становить:* 3,5 м (висота, на якій розміщено «другий поверх» обладнання) + 2,05 м (максимальна висота обладнання «другого поверху») + 1,5 м (відступ до стелі). Отже, висота цеха - 7,05 м (7 м).

Площа підлоги виробничого цеху:

$$S_{\text{підл А}} = 5 \text{ м} \times 11 \text{ м} = 55 \text{ м}^2;$$

Площа стін виробничого цеху:

$$S_{\text{стін А}} = (5 \text{ м} \times 7 \text{ м} + 11 \text{ м} \times 7 \text{ м}) \times 2 = 224 \text{ м}^2.$$

Площа підлоги мікробіологічної лабораторії:

$$S_{\text{підл Л}} = 6 \text{ м} \times 4 \text{ м} = 24 \text{ м}^2;$$

Площа стін мікробіологічної лабораторії:

$$S_{\text{стін Л}} = (4 \text{ м} \times 7 \text{ м} + 6 \text{ м} \times 7 \text{ м}) \times 2 = 140 \text{ м}^2.$$

Площа підлоги приміщення з качалками:

$$S_{\text{підл К}} = 4 \text{ м} \times 5 \text{ м} = 20 \text{ м}^2;$$

Площа стін приміщення з качалками:

$$S_{\text{стін К}} = (4 \text{ м} \times 7 \text{ м} + 5 \text{ м} \times 7 \text{ м}) \times 2 = 126 \text{ м}^2.$$

Площа стель дорівнює відповідним площам підлог.

Загальна площа поверхні обробки мийно-дезінфікуючими засобами наведена у Таблиці 5.1.3.2.

Таблиця 5.1.3.2

**Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень**

Приміщення	Площа підлоги, м <sup>2</sup>	Площа стелі, м <sup>2</sup>	Площа стін, м <sup>2</sup>	Загальна площа, м <sup>2</sup>
Виробничий цех	55	55	224	334
Мікробіологічна лабораторія	24	24	140	188
Приміщення з качалками	20	20	126	166
<b>Загальна площа</b>	99	99	490	688

Розрахована кількість виробничих циклів для синтезу коензиму Q10 *Rhodobacter sphaeroides* NY01 становить 18. Мити та дезінфікувати обладнання треба щоразу перед запуском нового циклу, а також після останнього, тому загальна кількість процесів миття та дезінфекції – 19. Загальним об'ємом використовуваних засобів буде:

$$1960 \times 21 = 37\,240$$

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та дезінфекції за весь період виробництва наведено в Таблиці 5.1.3.3

Таблиця 5.1.3.3

**Розрахунок загальної площі миття та дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва Q10 *Rhodobacter sphaeroides* NY01**

Об'єкт миття та дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )	Кількість процесів миття та дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )
Обладнання	1960	21	37240
Підлога	99	60	5940
Стеля	99	2	198
Стіни, двері, вікна	490	2	980

Загальна площа миття та дезінфекції приміщення за весь період виробництва становить:  $5940 \text{ м}^2 + 198 \text{ м}^2 + 980 \text{ м}^2 = 7118 \text{ м}^2$ .

Для миття та дезінфекції підлоги, стін, вікон і дверей пропоную використовувати такі засоби як «Біолонг» та «Дезактин», оскільки вони широко використовувані, безпечні у використанні та діють за низьких концентрацій.

Для миття обладнання можна скористатися засобами «Біомой», «Полідез» та досить дешевим засобом «Бланідас-А Форте».

Узагальнені дані щодо витрат перерахованих вище засобів знаходяться у Таблиці 5.1.3.4

**Біолонг** – це миючий засіб, що здатний знищувати бактерії, віруси та гриби, а також тривалий час захищати від контамінації, видаляти бруд і запахи. До складу засобу входять: четвертинні амонієві сполуки (ЧАС), спиртова суміш, кремнійорганічні сполуки, очищена вода. ЧАС руйнує мембрани бактерій, клітинні стінки грибів і білі клітини вірусів. Завдяки даному препарату можна проводити щоденне миття та дезінфекцію приміщення. Слід зазначити, що Біолонг не викликає алергії, не містить хлору, фосфатів, кислот, не пошкоджує оброблювальні поверхні і матеріали [76].

**Дезактин** – володіє антимікробними властивостями щодо широкого спектру бактерій (збудники туберкульозу, кишкових інфекцій), вірусів (збудники гепатитів, ВІЛ-інфекції, герпесу), грибів (включаючи кандидози, дерматомікози, плісняві гриби). Дезактин видаляє механічні, білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів та порожнин виробів медичного призначення. Слід зазначити, що згідно з вимогами ГОСТ 12.1.007 належить до мало небезпечних речовин при потраплянні на шкіру, але все ж таки вимагає обережності у застосуванні, оскільки все ж таки подразнює слизові оболонки [77].

Таблиця 5.1.3.4

**Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва Q10 *Rhodobacter sphaeroides* NY01**

Примітки: ціни на 2.04.2023: <http://surl.li/fzsbcc>, <http://surl.li/fzsii>, <http://surl.li/fzsmu>, <http://surl.li/fzsox>, <http://surl.li/fzsrd>

Назва засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття/дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття/дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup> (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного/дезінфікувального засобу, грн**	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття/дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, грн
Біолонг	Підлога, стіни, стеля, вікна, двері	0,5	7118	711,8	281	1,4	996,52
Дезактин	Підлога, стіни, стеля, вікна, двері	0,2	7118	711,8	398	0,796	566
Біомой	Обладнання	0,3	37 240	18 620	267	0,8	14 896
Полідез	Обладнання	0,3	37 240	18 620	210	0,6	11 172
Бланідас-А-Форте	Обладнання	0,15	37 240	18 620	180	0,27	5 027

**Біомой** – підходить для передстерилізаційного очищення обладнання, виготовленого з металу, скла, полімерів і гуми. Даний засіб має змочувальні, мийні, емульгуючі властивості. Здатний видаляти білкові, жирові забруднення та біологічні виділення, а також залишки лікарських та дезінфекційних засобів із зовнішніх та внутрішніх поверхонь. Легко змивається і не залишає слідів [78].

**Полідез** – даний препарат також має бактерицидні властивості (збудники туберкульозу), віруліцидні (збудники гепатиту, ВІЛ), фунгіцидні (збудники дерматофіту, плісняві гриби). Даний препарат є малонебезпечним зі слабкою подразнюючою дією [79].

**Бланідас-А Форте** - також має бактерицидні властивості (збудники туберкульозу), віруліцидні (збудники гепатиту, ВІЛ), фунгіцидні (збудники дерматофіту, плісняві гриби). Даний препарат є малонебезпечним зі слабкою подразнюючою дією [80].

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

Для біосинтезу *Rhodobacter sphaeroides* NY01 убіхінону використовується середовище такого складу (г/л):

Глюкоза – 140	KCl – 3
Кукурудзяний екстракт – 4	MgSO <sub>4</sub> – 6,3
Глутамат натрію – 3	CaCO <sub>3</sub> – 2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 3	Тіамін гідрохлорид – 0,001
NaCl – 2,8	Нікотинова кислота – 0,001
	Біотин – 0,000015

Стерилізації підлягають усі компоненти. Слід зазначити, що для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці, посівних апаратах та ферментері необхідно приготувати запасний розчин вітамінів, з розрахунку 1 л середовища – 0,1 мл розчину. Далі цей розчин простерилізують фільтруванням. При біосинтезі у ферментері, замість KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> використовується KCl. Також необхідно внести 140 г глюкози, але оскільки не

можна внести одразу таку кількість глюкози, необхідно визначити умови її дробного внесення. Готується титрувальний розчин соляної кислоти, Розрахуємо кількість цих компонентів, необхідну для приготування поживного середовища на кожен зі стадій виробництва (Таблиця 5.1.4.1 та Таблиця 5.1.4.2)

Розглянемо спосіб реалізації дробного внесення глюкози (Таблиця 5.1.4.3). Загалом необхідно внести 120 г глюкози. Процес культивування складає 75 годин, дробне внесення розпочали після 15 год. Отже, можна реалізувати процес підживлення кожні 8 годин. Одна порція складатиме 15 г глюкози.

*Таблиця 5.1.4.3*

**Схема реалізації дробного внесення глюкози при здійсненні виробничого біосинтезу у ферментері на 1м<sup>3</sup>**

Години внесення глюкози, год.	20	25	30	35	40	45	55	60
Кількість внесеної глюкози, г	15	30	45	60	75	90	105	120

*Таблиця 5.1.4.1*

**Розрахунок вмісту вітамінів в різних об'ємах поживного середовища**

Об'єм середовища, л	Тіамін гідрохлорид		Нікотинова кислота		Біотин	
	Об'єм розчину, мл	Особливість приготування	Об'єм розчину, мл	Особливість приготування	Об'єм розчину, мл	Особливість приготування
0,6	60 мкл	піпетка	60 мкл	піпетка	60 мкл	піпетка
6	600 мкл	піпетка	600 мкл	піпетка	600 мкл	піпетка
60	6 мл	Колба на 50 мл	6 мл	Колба на 50 мл	6 мл	Колба на 50 мл
600	60 мл	Колба на 250 мл	60 мл	Колба на 250 мл	60 мл	Колба на 250 мл

**Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких  
компонентів поживного середовища**

Об'єм середовища, л	Глюкоза		Кукурудзяний екстракт		HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Вміст, г	Особливість приготування	Вміст, мл	Особливість приготування	Вміст, мл	Особливість приготування	Вміст, мл	Особливість приготування
0,6	12	Колба на 50 мл	2,4	піпетка	-	-	-	-
6	120	Колба на 500 мл	24	Колба на 50 мл	-	-	-	-
60	1200	Реактор на 5 л	240	Колба на 500 мл	120	Колба на 250 мл	120	Колба на 250 мл
600	12000	Реактор на 50 л	2400	Реактор на 5 л	-	-	-	-

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

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (600 мл). Проаналізувавши склад поживного середовища, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

**Композиція А:** глюкоза, кукурудзяний екстракт, глютамат натрію (режим стерилізації: 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв).

**Композиція Б:** MgSO<sub>4</sub>, NaCl, CaCO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (режим стерилізації: 131°С, 0,15 МПа, 40 хв).

**Композиція В:** КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> (режим стерилізації: 131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

Глюкоза, кукурудзяний екстракт, глютамат натрію є термолабільними і потребують м'яких режимів для стерилізації. Задля попередження контамінації готують 40% розчин глюкози (Композиція А). Цю композицію стерилізуємо двічі, щоб одержати 100% стерильності. В композиції Б стерилізуємо солі, окрім фосфату. Композиція В – КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>.

Вітаміни будемо стерилізувати окремо, оскільки вони містяться в дуже малих кількостях, для них слід підготувати запасний розчин та здійснюють холодну стерилізацію фільтруванням.

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

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 600 мл середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	20	12 г	А	250 мл
Кукурудзяний екстракт	4	2,4 г		
Глутамат натрію	3	1,8 г		
Вода	250 мл			
CaCO <sub>3</sub>	2	1,2 г	Б	250 мл
MgSO <sub>4</sub>	6,3	3,78 г		
NaCl	2,8	1,68 г		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	1,8 г		
Вода	250 мл			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	1,8 г	В	250 мл
Вода	250 мл			
Розчин вітамінів	-	60 мкл	-	60 мкл

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

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

На даній стадії нам необхідно 6 л поживного середовища та аналогічні до попереднього пункту склад композиції та умови стерилізації. Композицію А готують та окремо стерилізують в автоклаві. Композицію Б також готують окремо, стерилізація відбувається в автоклаві. Запасний розчин вітамінів додається в інокулятор окремо після стерилізації усіх компонентів.. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 10 л наведений у Таблиці 5.1.4.1.2

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування інокуляту в посівному апараті на 10 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6 л	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	20	120 г	А	3 л
Кукурудзяний екстракт	4	24 г		
Глутамат натрію	3	18 г		
Вода	3 л			
CaCO <sub>3</sub>	2	12 г	Б	3 л
MgSO <sub>4</sub>	6,3	37,8 г		
NaCl	2,8	16,8 г		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	18 г		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	18 г		
Вода	3 л			
Розчин вітамінів	-	600 мкл	-	600 мкл

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

На даній стадії нам необхідно 60 л поживного середовища та аналогічні до попереднього пункту склад композиції та умови стерилізації. Композицію А окремо стерилізують в реакторі-змішувачі. Композицію Б готують у збірнику, а стерилізація відбувається в інокуляторі, аби зменшити ймовірність контамінації. Запасний розчин вітамінів додається в інокулятор окремо після стерилізації усіх компонентів. Необхідним є підкислення рН до рівня 4,0-4,5 хлоридною кислотою, щоб уникнути утворення фосфатних осадів. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 100 л наведений у Таблиці 5.1.4.1.3

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування інокуляту в посівному апараті на 100 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 60 л	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	20	1200 г	А	20 л
Кукурудзяний екстракт	4	240 г		
Глутамат натрію	3	180 г		
Вода	20 л			
CaCO <sub>3</sub>	2	120 г	Б	28 л
MgSO <sub>4</sub>	6,3	378 г		
NaCl	2,8	168 г		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	180 г		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	180 г		
Вода	28 л			
Розчин вітамінів	-	6 мл	-	6 мл

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>

Для цієї стадії необхідно 600 л поживного середовища. Композицію А готують і стерилізують в реакторі-змішувачі. Композицію Б готують і стерилізують в ферментері, слід зазначити, що калій фосфат замінюється на калій хлорид. Необхідним є підкислення рН до рівня 4,0-4,5 хлоридною кислотою, щоб уникнути утворення фосфатних осадів. В кінці додають розчин вітамінів і здійснюють дробне внесення глюкози. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у ферментері наведений у Таблиці 5.1.4.1.3

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування інокуляту в посівному апараті на 1 м<sup>3</sup>**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 600 л	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	20	12000 г	А	200 л
Кукурудзяний екстракт	4	2400 г		
Глутамат натрію	3	1800 г		
Вода	200 л			
CaCO <sub>3</sub>	2	1200 г	Б	280 л
MgSO <sub>4</sub>	6,3	3780 г		
NaCl	2,8	1680 г		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	1800 г		
KCl	3	1800 г		
Вода	280 л			
Розчин вітамінів	-	60 мл	-	60 мл
Запасний розчин глюкози	-	120 г	-	120 г

**Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника**

Для регуляції рН перед початком культивування необхідно використовувати 6%-і розчини HCl і NaOH. Додавати хлоридну кислоту перед стерилізацією необхідно, щоб унеможливити випадіння осадів фосфорних солей Магнію, Феруму та Мангану під час нагрівання розчину солей в апараті. Оскільки оптимальним рН для культури біологічного агента є 7.0, то доведемо його до цього значення розчином NaOH. Також є необхідним підтримання рН на рівні 7.0 під час виробничого біосинтезу, оскільки відхилення рН від нейтрального негативно впливає на убіхінон. Використовуватимемо 6%-ий розчин NaOH.

Також необхідно забезпечити належну аерацію що може призвести до піноутворення, тому нам необхідно використовувати піногасник. Доцільно

використати синтетичний хімічний піногасник.

## **5.2. Основні етапи післяферментаційного виділення, концентрування та очищення цільового продукту**

Після отримання культуральної рідини, необхідно провести відділення біомаси, її концентрування та очищення. Оскільки коензим Q10 є внутрішньоклітинним компонентом, для його отримання необхідно здійснити розрив клітини. Для моєї кваліфікаційної роботи було вирішено скористатися результатами дослідження Кафедри хімічної інженерії та матеріалознавства, Університету Юань Цзе, Тайвань [81], використовуючи методики, зазначені в статті як ті, що дають найвищий вихід коензиму. Біомасу спочатку центрифугують 5 хвилин при 5000 об/хв. Потім необхідно провести розчинення та настоювання в 1000 мл 95% етанолу протягом 30 хв за температури в 40°. Отриманий розчин збирають, а залишок клітин знову екстрагують (200 мл 95% етанолу протягом 5 хвилин при 40 °С). Потім перший і другий розчини змішують і екстрагують в 370 мл гексану протягом 5 хвилин при 30 °С для першої екстракції. Після того, як розчин розділяють на два шари, верхню гексанову фазу, збирають і поміщають в нову пробірку. Нижню фазу (розчин етанолу) знову екстрагують 370 мл гексану протягом 5 хвилин при 30 °С. Обидва екстраговані розчини змішують. Після випарювання фази розчинника з екстракційного розчину очищений зразок розчиняють в 95% етанолі до отримання 0,03% розчину. Цей розчин поступово кристалізують, охолоджуючи від кімнатної температури до 1°C. Чистота такого продукту складає 96%.

## **5.3 Пропозиції щодо підбору обладнання для реалізації післяферментаційних процесів.**

В якості гомогенізатора я обрала прилад мікрофлюїдаїзер LM10 [82]



Рис. 5.3.1 Мікрофлюїдаїзер LM10

- LM-10 відноситься до лабораторних мікрофлюїдних пристроїв, що дозволяє проводити експерименти в мікроскопічному масштабі. Це важливо для біологічних досліджень, де реакції часто відбуваються на мікроскопічних рівнях, а також для економії витрат на реактиви і зразки.
- LM-10 забезпечує високу прецизію та контроль над потоками рідини, дозволяючи точно регулювати об'єм, швидкість і напрямок руху рідини в системі. Це дозволяє проводити точні експерименти та дослідження, контролюючи різні параметри.
- LM-10 може бути налаштований для виконання різноманітних досліджень та експериментів. Він має можливості для зміни конфігурації каналів та потокових шляхів, а також може бути використаний для проведення різних операцій, таких як змішування, розділення та обробка зразків.
- LM-10 є досить компактним та має простий інтерфейс, що робить його зручним у використанні в лабораторному середовищі. Він може бути легко налаштований і експлуатований навіть без значного досвіду з мікрофлюїдикою.

Для центрифугування я пропоную скористатися центрифугою лабораторною на 0 - 4000 об/хв від компанії RCF [83].



Рис. 5.3.2 Центрифуга на 0 – 4000 об/хв

- Центрифуга 800 має можливість налаштування швидкості обертання, що дозволяє вибрати оптимальні умови центрифугування для конкретного дослідження. Це особливо важливо для розділення зразків з різною густиною або для отримання різних фракцій змішаного матеріалу.
- Центрифуга 800 має достатню ємність для одночасного оброблення багатьох зразків. Це зменшує час, необхідний для обробки великої кількості зразків і підвищує продуктивність лабораторії.
- Центрифуга 800 має простий інтерфейс управління, що спрощує роботу з приладом.
- Модель 800 має компактні розміри, що дозволяє економити простір у лабораторії. Це важливо для лабораторій з обмеженим простором.

В якості екстрактора я пропоную використовувати Автоматичну систему Gerhardt SOXTHERM® SOX 412 macro [84].



Рис. 5.3.3 Автоматичну систему Gerhardt SOXTHERM® SOX 412 macro для екстракції

- Система Soxtherm Sox412 призначена для екстракції речовин з твердих зразків шляхом перколяції розчинників. Вона використовує принцип термічної екстракції, що дозволяє значно зменшити час екстракції порівняно з традиційними методами.
- Система Soxtherm Sox412 працює в автоматичному режимі, що дозволяє зменшити зусилля та час, необхідний для виконання екстракції. Вона обладнана програмованим контролером, який керує процесом температурного контролю, часом та іншими параметрами.
- Система Soxtherm Sox412 забезпечує високу точність і відтворюваність результатів екстракції. Це важливо для отримання надійних даних і забезпечення консистентності результатів у різних експериментах.
- Soxtherm Sox412 має два внутрішні пробірники, що дозволяє одночасно обробляти два зразки. Це підвищує продуктивність і дозволяє економити час.

В якості кристалізатора я пропоную використовувати звичайний лабораторний кристалізатор.

## РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник S-Series-Roof Mounted Natural Ventilators («Specifiedby»); габаритні розміри: 500×1000×1000 [85]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр грубої очистки 600MPH 630-AD-5 («MPFILTR1») Пропускна здатність 10 мікрон. Матеріал: мікрофібра, Максимальна швидкість потоку становить 1210 л/хв, E=90%, максимальний робочий тиск 2,5 бар, робоча температура -25 – 110 °C [86]
К-3	Компресор	1	Турбокомпресор TRX («Dalgakiran»). Продуктивність: 2250 м <sup>3</sup> /год; робочий тиск 5,5 – 8,8 бар; габаритні розміри, мм: 2450 ×1640 ×1900 [87]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Промисловий осушувач повітря рефрижераторного типу («Dalgakiran»). Продуктивність: 1700 м <sup>3</sup> /год; габаритні розміри, мм: 390x344x320; потужність: 5,7 кВт [88]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер Galvanized 1000Ltr Vertical Compressed Air Receiver Tank & Fittings – 4101000922 («Air link compressed air systems»). Об'єм, л: 1000; максимальний тиск: 11,5 бар; габаритні розміри, мм: 2345x790 [89]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний нагрівач SWH 100-50/3R («ТЕКО Україна») Максимальний робочий тиск: 1,6 МПа; габаритні розміри, мм: 400x200x420 [90]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Фільтр MAFR302 («Tameson»). Пропускна здатність 5 мікрон. Максимальна швидкість потоку становить 1200 л/хв, максимальний робочий тиск 10 бар, робоча температура -5 – 60 °C [91]
І-8	Інокулятор	1	Інокулятор BLBIO-10SJY об'ємом 10л («Bailun bio») Матеріал корпусу: нержавіюча сталь 316L; тиск: 0,3 МПа; оснащений мішалкою: 70-1000 об/хв; з сорочкою; оснащений датчиком рН, О <sub>2</sub> , піни, наявний ротаметр, витратомір, барботер; манометр та індивідуальний фільтр. [92]
Д-9	Ваговий дозатор для подачі компонентів композиції А	1	Дозатор ваговий Hualian NPF-200 («Цикада») для композиції А в реакторі-змішувачі об'ємом 100 л. Мінімальна межа дозування – 2 гр, максимальна – 200 гр; напруга: 220 В; потужність: 0,15 кВт [93]

<b>НУХТ БТЕК 04.01.38 КР ПЗ</b>				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Іванець О. А.		
Перевір.		Скороцька О. І.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабнікоа В. П.		
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ				
		Літ.	Арк.	Акрушів
			65	116
Кафедра БТМ <sup>65</sup>				

Продовження Таблиці 6.1

P-10	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Вакуумний хімічний реактор на 75 л («ХІММІКС») Матеріал: нержавіюча сталь; максимальний робочий тиск: 4 атм; оснащений сорочкою (нагрівання до 160°) та мішалкою типу HF зверху діаметром DN200 та радіальна турбіна знизу з діаметром DN200; Номінальні оберти 200об/хв(можлива регуляція від 20 до 250 об/хв); потужність двигуна мішалки: 0,55 кВт; оснащений датчиком рН, датчиком O <sub>2</sub> та піни; габаритні розміри: 1030 x 780 x 1580 [94]
Д-11	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Дозатор об'ємний GCG-A напівавтоматичний («Козак») для композиції А в реакторі-змішувачі об'ємом 100 л. Об'єм дозуючої води: 100-1000 мл; продуктивність: 600-1500 порцій/год. [95]
Н-12	Насос мембранний	1	Мембранний насос для рідин BOXER 19K Liquid Diaphragm Pump Series («BOXER»). Максимальна потужність: 9,6 Вт; продуктивність: 0,7 л/хв; максимальний робочий тиск: 2 бар [96]
З-13	Збірник для композиції В	1	Збірник 006061-530 об'ємом 25 л («Berlinpackaging»). Матеріал: нержавіюча сталь. Габаритні розміри, мм:424 x304 [97]
І-14	Інокулятор	1	Ферментер-біореактор BLBIO-100SJY об'ємом 100л («Bailun bio») Матеріал корпусу: нержавіюча сталь 316L; тиск: 0,3 МПа; оснащений мішалкою: 70-1000 об/хв; з сорочкою; датчик рН, піни, ротаметр, витратомір, барботер; манометром, , а також індивідуальний фільтр; габаритні розміри, мм: 2000 x 1500 x 2800 [98, 99]
Д-15	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Дозатор об'ємний GCG-A напівавтоматичний («Козак») для композиції А в реакторі-змішувачі об'ємом 100 л. Об'єм дозуючої води: 100-1000 мл; продуктивність: 600-1500 порцій/год. [95]
ІФ-16	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр для очищення повітря Aventics 652 («Exont»), фільтрувальний матеріал: боросилікатна мікрофібра та поліестер, робоча температура від 1 до 50, максимально допустимий тиск – 16 бар, Пропускна здатність 0,01 мікрон. [100]
Д-17	Ваговий дозатор	1	Дозатор ваговий FZ-1000 Hualian («Цикада») для композиції А об'ємом в 40 л. Межа дозування 10 - 1000 гр; напруга 220 В; потужність 0,2 кВт [101]
P-18	Реактор-змішувач для композиції А	1	Реактор об'ємом 250 л («ХІММІКС») Оснащений сорочкою, якірною мішалкою: 620 об/хв та гомогенізатором з потужністю привода в 2,2 кВт; габаритні розміри, мм: 900x1050x 2050 [102]
Д-19	Об'ємний дозатор	1	Дозатор-змішувач води («AgroTech») для композиції А в ферментері об'ємом 1000 л. Витрата води: 10-70 л/хв; Робочий тиск: 0,5-5 атм [103]

Закінчення Таблиці 6.1

Н-20	Насос мембранний для перекачування композиції А	1	Мембранний насос для рідин Мембранний насос 10 л/хв 13,5 бар («AgroTech»). Максимальна потужність: 180 Вт; продуктивність: 10 л/хв; максимальний робочий тиск: 13,5 бар. [104]
Д-21	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор («AgroTech») для підживлюючого розчину глюкози. Межа дозування 50 - 5000 гр; напруга 220 В; потужність 0,2 кВт [105]
Р-22	Реактор-змішувач для підживлюючого розчину глюкози	1	Реактор об'ємом 250 л («ХІММІКС») Оснащений сорочкою, якірною мішалкою: 620 об/хв та гомогенізатором з потужністю привода в 2,2 кВт; макс. габаритні розміри, мм: 900х 1050 х 2050 [102]
Д-23	Об'ємний дозатор	1	Дозатор-змішувач води («AgroTech») для розчинення підживлюючого розчину глюкози у ферментері об'ємом 1000 л. Витрата води: 10-70 л/хв; Робочий тиск: 0,5-5 атм [103]
Д-24	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор («AgroTech») для Композиції Б. Межа дозування 50 - 5000 гр; напруга 220 В; потужність 0,2 кВт [105]
З-25	Збірник для композиції В	1	Реактор об'ємом 250 л («ХІММІКС») Оснащений сорочкою, якірною мішалкою: 620 об/хв та гомогенізатором з потужністю привода в 2,2 кВт; макс. габаритні розміри, мм: 900х 1050 х 2050 [102]
Д-26	Об'ємний дозатор	1	Дозатор-змішувач води («AgroTech») для розчинення підживлюючого розчину глюкози у ферментері об'ємом 1000 л. Витрата води: 10-70 л/хв; Робочий тиск: 0,5-5 атм [103]
Д-27	Об'ємний дозатор	1	Дозатор-змішувач води («AgroTech») для розчинення підживлюючого розчину глюкози у ферментері об'ємом 1000 л. Витрата води: 10-70 л/хв; Робочий тиск: 0,5-5 атм [103]
Ф-28	Ферментер	1	Ферментер ССТ-SHP3-1000DE об'ємом 1200 літрів («Czech brewery system»); Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 304; максимально допустимий тиск: 3 бар; термометр; барометр; індикатор рівня заповнення; CO2 відсікаючий кран; подвійна сорочка; Габаритні розміри 2856 х 1200 [106]
Н-29	Насос мембранний для перекачування культуральної рідини у збірник	1	Мембранний насос для рідин Насос для перекачування AdBlue 30 л/хв 12 В («AgroTech»). Максимальна потужність: 120 Вт; продуктивність: 30 л/хв; максимальний робочий тиск: 2,8 бар [107]

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Технологічний процес біосинтезу *Rhodobacter sphaeroides* НУ01 складається із допоміжних та основних робіт. До стадій допоміжних робіт (ДР) належать: санітарна підготовка, підготовка стерильного аераційного повітря, приготування титрувального розчину НСІ, приготування та стерилізація запасного розчину вітамінів та підживлюючого 40-% розчину глюкози. підготовка і стерилізація поживного середовища. До стадій основного технологічного процесу (ТП) відносять: приготування посівного матеріалу продуценту та виробничий біосинтез.

Технологічна та апаратурна схеми біосинтезу убіхінону наведені у графічній частині проекту.

### *ДР 1. Санітарна підготовка*

#### *ДР 1.1. Підготовка персоналу*

Персонал, що знаходиться на виробництві при працевлаштуванні а потім щорічно має проходити медичний одяг, проходити систематичне навчання стосовно санітарно-гігієнічних вимог. Також необхідно забезпечити кожного працівника 4 комплектами санітарного одягу (щоденна заміна одягу і в міру забруднення).

#### *ДР 1.1.1 Навчання персоналу*

Навчання на робочому місці включає виробничий інструктаж, ротація, наставництво, стажування, підготовка у проектних групах. Навчання поза межами робочого місця може бути у формі лекцій, ділових ігор, тренінгів, конференцій і семінарів, а також включає самостійне навчання.

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.38 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Іванець О. А.			РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.		Скороцька О. І.					68	116
Реценз.						68		
Н. Контр.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Затверд.		Стабнікоа В. П.						

### *ДР 1.1.2 Санітарний стан персоналу*

При прийнятті на роботу, персонал повинен пройти медичний огляд.

Якщо робота пов'язана з виготовленням, зберіганням та контролем якості лікарських засобів, персонал не повинен мати інфекційних захворювань, відкритих ран на шкірі або бути носієм патогенної мікрофлори, доки їх стан здоров'я не нормалізується. Персонал повинен повідомляти свого керівника про будь-які симптоми захворювання, які можуть негативно вплинути на якість лікарських засобів.

Особам, які курять, мають проблеми зі шкірою, хронічний кашель або алергію на матеріали та предмети, що використовуються у виробництві, не рекомендується працювати у виробництві нестерильних лікарських засобів, оскільки це може призводити до додаткового забруднення робочого середовища. Персонал повинен регулярно приймати душ, мити голову не рідше двох разів на тиждень і особливо дбати про чистоту рук. Заборонено мати довгі нігті, оскільки неможливо належним чином обробляти простір біля нігтів. Також забороняється накладати лак на нігті.

### *ДР 1.2 Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів*

На підприємстві використовують миючі засоби для запобігання контамінації та забезпечення чистоти. Ці засоби використовуються для санітарної обробки приміщень, технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю, санітарно-технічного обладнання та інших поверхонь. Для досягнення оптимальних результатів використання миючих засобів важливо дотримуватись відповідних інструкцій щодо їхнього застосування. Це включає правильне розведення, нанесення, контактний час та спосіб використання засобів.

#### *ДР 1.2.1 Приготування робочого розчину «Біолонг»*

Для приготування робочого розчину необхідно розвести концентрат. Для розведення цього рекомендується використовувати питну воду. Для приготування 10 л робочого розчину, необхідно в спеціальному збірнику змішати 9,95 л води з 50 мл концентрату.

Отриманий розчин зберігають у спеціальній ємності (збірнику) протягом певного часу. Це дозволяє зберегти його ефективність і забезпечити його готовність до використання.

#### *ДР 1.2.2 Приготування робочого розчину «Дезактин»*

Для приготування робочого розчину необхідно розвести концентрат Для розведення цього рекомендується використовувати питну воду. Для приготування 10 л робочого розчину, необхідно в спеціальному збірнику змішати 10 л води з 20 г концентрату.

Отриманий розчин зберігають у спеціальній ємності (збірнику) протягом певного часу. Це дозволяє зберегти його ефективність і забезпечити його готовність до використання.

#### *ДР 1.2.3 Приготування робочого розчину «Біомой»*

Для приготування робочого розчину необхідно розвести концентрат Для розведення цього рекомендується використовувати питну воду. Для приготування 10 л робочого розчину, необхідно в спеціальному збірнику змішати 9,97 л води з 30 г концентрату.

Отриманий розчин зберігають у спеціальній ємності (збірнику) протягом певного часу. Це дозволяє зберегти його ефективність і забезпечити його готовність до використання.

#### *ДР 1.3 Підготовка приміщень*

Приміщення виробничого класу чистоти обробляються мийними, дезінфекційними та мийно-дезінфекційними засобами для зниження рівня загального забруднення та мікробної контамінації.

##### *ДР 1.3.1 Генеральне прибирання*

Щоденне прибирання включає протирання дверей, дверних ручок, підвіконня та дрібних предметів розчином дезактину та біолонгу. Таким самим розчином миють підлогу з розрахунку 100 мл/м<sup>2</sup> поверхні підлоги. Перед початком робіт персонал виробничих приміщень протирає поверхні столів та дрібне обладнання 76 % етиловим спиртом. Раз на тиждень повторюють такі ж операції, використовуючи розчини дезактину та біолонгу.

### *ДР 1.3.2 Щотижневе прибирання виробничих приміщень*

Генеральне прибирання приміщень проводять один раз на місяць. Робочі поверхні та невелике за розміром обладнання протирають 76 % розчином етилового спирту. Двері й інші поверхні обробляють поролоною губкою, яка змочена в розчині дезактину з розрахунку 100 мл/м<sup>2</sup> поверхні. Біолонгом миють підлогу.

### *ДР. 1.4 Підготовка обладнань та комунікацій*

Виробниче обладнання повинно бути безпечним для продукції. При проектуванні та установці обладнання та засобів обслуговування слід забезпечити їх таким чином, щоб робочі операції, технічне обслуговування та ремонтні роботи здійснювались поза чистою зоною, у відокремлених приміщеннях або з використанням спеціальних заходів безпеки.

Стерилізація обладнання слід проводити тільки після повного збирання (монтажу) обладнання. Це означає, що перед проведенням технологічного процесу, всі складові частини обладнання повинні бути належним чином зібрані і встановлені.

Також перед проведенням технологічного процесу слід здійснити підготовку технологічного обладнання, що включає необхідну очистку, дезінфекцію або стерилізацію залежно від вимог і характеру виробництва. Після завершення технологічного процесу також потрібно провести очищення, дезінфекцію або стерилізацію обладнання для забезпечення належних гігієнічних умов перед наступним використанням.

#### *ДР. 1.4.1 Миття*

Миття обладнання та комунікацій може здійснюватися розчином каустичної соди контактним способом. Каустичну соду використовують у вигляді 1% розчину підігрітого до температури 50-70°C. Цим розчином промивають обладнання протягом 30-60 хвилин при перемішуванні. З метою очистки лінії зливу готової продукції та пробника, злив миючого розчину ведуть через лінію зливу готової продукції та пробник. Після зливу миючого засобу його направляють у збірник нейтралізації та нейтралізують кислотою.

Нейтралізований розчин направляють в каналізацію. Обполіскування здійснюють водою питною або водою очищеною. Санітарна обробка внутрішніх поверхонь може здійснюватися розчином хлораміну, підігрітого до температури 36°C.

#### *ДР. 1.4.2 Технічний огляд*

Технічний огляд виконується з метою виявлення та виправлення недоліків в процесі технологічного циклу і підготовки обладнання до наступного циклу. Перевіряють стан фільтрів на лінії підготовки повітря, рівномірність подачі повітря барботером. Для цього в апарат наливають воду вище барботера та пропускають повітря протягом 3-5 хвилин в різних режимах швидкості подачі повітря, починаючи з мінімальних і до найшвидших. В разі забиття отворів барботера їх пробивають повітрям або паром під тиском 2-3 атм.

#### *ДР. 1.4.3 Дезинфекція та ополіскування*

Для процедури використовують поролонові губки, серветки з зачепленими краями з безворсової тканини, а в якості дезінфекційних засобів – розчини перекису водню. Матеріали та інвентар після використання знезаражують замочуванням на 2-3 години в 6 % розчині перекису водню.

#### *ДР. 1.4.4 Перевірка герметичності*

Існують сучасні методи для перевірки обладнання на щільність. Один із таких є метод, який оснований на вловленні витоку галогенних газів приладом тече-шукачем, який вловлює мікроконцентрації витоку газу.

Тетрахлорметан закачують в герметично закриті обладнання та комунікації до тиску 0,5 МПа та за допомогою прилада – тече-шукача галогенопохідних, проводять огляд всіх з'єднань обладнання та комунікацій. Особливу увагу приділяють фланцевим з'єднанням та ущільненню кришок місткісного обладнання. У випадку виявлення нещільних з'єднань проводять розбору та профілактичне ущільнення обладнання та комунікації. В якості ущільнюючого матеріалу використовують термостійку гуму, пароніт, фторопласт.

#### *ДР. 1.4.4 Стерилізація*

Стерилізація устаткування здійснюється гострою парою при температурі 130 °С і надлишковому тиску 0,3 МПа. Тривалість операції складає приблизно 40 хвилин. Параметри стерилізації забезпечують знищення мікрофлори.

#### ***ДР 2. Підготовка аераційного повітря***

##### *ДР 2.1. Забір атмосферного повітря*

Атмосферне повітря забирають за допомогою повітрязабірного пристрою (ПЗ-1) у найвищій точці – на висоті 10 м.

##### *ДР 2.2. Очистка повітря від грубих часток*

Попереднє очищення повітря (від ДР 2.1) проводять у фільтрі (Ф-2), який має забезпечувати ступінь очищення до 90%. На даному етапі рівень контамінації повітря знижується за рахунок затримання деякої кількості мікроорганізмів із часточками пилу.

##### *ДР 2.3. Стиснення повітря*

Стискання повітря (від ДР 2.2) здійснюють у компресорі (К-3) до 0,35-0,5 МПа. При стисненні повітря, його температура підвищується до 120-200°С, спостерігається збільшення вологовмісту на одиницю об'єму.

##### *ДР 2.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи*

Стиснене повітря, (від ДР 2.3) надходить до теплообмінника-охолоджувача (Т-4), де воно охолоджується до температури 25-40°С за допомогою охолодженої води, що виступає в ролі теплоносія. Зайва волога видаляється за допомогою ресивера (Р-5). Показник вологості має зменшитися до 60-70%.

##### *ДР 2.5. Нагрівання повітря*

Охолоджене повітря (від ДР 2.4) надходить до теплообмінника-нагрівача (Т-6), де нагрівається до температури 45-50°С за допомогою пари низького тиску. Показник вологості зменшується до 50%.

##### *ДР 2.6. Очищення повітря у головному фільтрі*

Нагріте повітря (від ДР 2.5) надходить до головного фільтра очистки (Ф-

7), який ставиться біля ферментаційних відділень. Ступінь очищення має бути 95%.

#### *ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

Повітря (від ДР 2.6) через подається в індивідуальні фільтри кожного з біореакторів до ТП 7.4, ТП 7.5, ТП 7.6. Ступінь кінцевої очистки повітря складає 99,999%.

### **ДР 3. Приготування титрувального розчину**

*ДР 3.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища для вирощування Rhodobacter sphaeroides NY01 у посівному апараті об'ємом 6, 60 л та виробничому ферментері об'ємом 600 л*

Для приготування 1332 мл 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 2,5 л вносять за допомогою мірного циліндра (2 л) 2л дистильованої води і вносять за допомогою мірного циліндра на 500 мл при постійному перемішуванні 262 мл 31%-ого розчину HCl. Рідини змішують обов'язково лише у такому порядку, щоб уникнути сильної екзотермічної реакції.

### **ДР 3.2. Приготування 6%-го розчину NaOH**

*ДР 3.2.1 Приготування 6%-го розчину NaOH для підлужнення середовища для вирощування Rhodobacter sphaeroides NY01 у посівному апараті об'ємом 6 л.*

Для приготування 12 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 1,2 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 50 мл і за допомогою мірного циліндра на 50 мл додають 11,2 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) протягом 40 хв.

*ДР 3.2.2 Приготування 6%-го розчину NaOH для підлужнення середовища для вирощування Rhodobacter sphaeroides NY01 у посівному апараті об'ємом 60 л.*

Для приготування 120 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 12 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 250 мл і за допомогою мірного циліндра на 250 мл додають 112 мл дистильованої

води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

*ДР 3.2.3 Приготування 6%-го розчину NaOH для підлужнення середовища для вирощування Rhodobacter sphaeroides NY01 у виробничому ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>*

Для приготування 1200 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 120 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 2 л і за допомогою мірного циліндра на 2 л додають 1,95 л дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

*ДР 4. Приготування і стерилізація запасного 40%-ого розчину глюкози*

За допомогою дозатора (Д-20) вносять 72000 г глюкози у реактор (Р-21) на 250 л, додають через лічильник (Д-22) 180 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій та стерилізують при 112 °С (0,05 МПа), 30 хв. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у реакторі на рівні 40 °С. Отриманий розчин подають самоплином у ферментер (Фр-27) об'ємом 1 м<sup>3</sup>.

*ДР 5. Приготування і стерилізація запасного розчину вітамінів*

На технічних терезах зважуємо 1 г тіаміну, 1 г нікотинової кислоти та 15 мг біотину. Наважки поміщають у колбу на 100 мл і за допомогою мірного циліндра на 100 мл додають 100 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення. Проводять холодну стерилізацію фільтруванням.

*ДР 5.1. Приготування запасного розчину вітамінів для вирощування інокуляту R. sphaeroides NY01 в колбах на качалках*

З приготованого запасного розчину вітамінів (ДР 5) саплером на 200 мкл відбирають 60 мкл запасного розчину.

*ДР 5.2. Приготування запасного розчину вітамінів для вирощування інокуляту R. sphaeroides NY01 в інокуляторі об'ємом 10 л*

З приготованого запасного розчину вітамінів (ДР 5) саплером на 1000

мкл відбирають 600 мкл запасного розчину.

*ДР 5.3. Приготування запасного розчину вітамінів для вирощування інокуляту *R. sphaeroides* NY01 в інокуляторі об'ємом 100 л*

З приготованого запасного розчину вітамінів (ДР 5) піпеткою відбирають 6 мл запасного розчину.

*ДР 5.4. Приготування запасного розчину вітамінів для вирощування інокуляту *R. sphaeroides* NY01 у виробничому ферментері на 1 м<sup>3</sup>*

З приготованого запасного розчину вітамінів (ДР 5) мірним циліндром на 100 мл відбирають 60 мл запасного розчину.

### ***ДР 6. Приготування і стерилізація поживних середовищ***

*ДР 6.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту *R. sphaeroides* NY01 в колбах на качалках*

#### *ДР 6.1.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних терезах зважують 12 г глюкози, 2,4 г кукурудзяного екстракту та 1,8 г глютамат натрію. Наважки поміщають у колбу об'ємом 300 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 150 мл дистильовану воду (150 мл), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа), 30 хв.

#### *ДР 6.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних терезах зважують 1,2 г CaCO<sub>3</sub>. Наважку поміщають у колбу об'ємом 150 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 300 мл дистильовану воду (150 мл), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

#### *ДР 6.1.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних терезах зважують 3,78 г MgSO<sub>4</sub>, 1,68 г NaCl та 1,8 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Наважки поміщають у колбу об'ємом 300 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 150 мл дистильовану воду (150 мл), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

#### *ДР 6.1.4. Приготування і стерилізація композиції Г*

На технічних терезах зважують 1,8 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Наважку поміщають у колбу об'ємом 300 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 150 мл дистильовану воду (150 мл), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

*ДР 6.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту *R. sphaeroides* NY01 в інокуляторі об'ємом 10 л*

*ДР 6.2.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних терезах зважують 120 г глюкози, 24 г кукурудзяного екстракту та 18 г глутамат натрію. Наважки поміщають у колбу об'ємом 6 л, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 3 л дистильовану воду (3 л), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа), 30 хв.

*ДР 6.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних терезах зважують 12 г  $\text{CaCO}_3$ , 37,8 г  $\text{MgSO}_4$ , 16,8 г  $\text{NaCl}$ , 18 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 18 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Наважки подають до інокулятора (І-8), об'ємом 10 л, додають за допомогою мірного циліндру об'ємом 2 л дистильовану воду (2 л), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

*ДР 6.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту *R. sphaeroides* NY01 в інокуляторі об'ємом 100 л*

*ДР 6.3.1. Приготування і стерилізація композиції А*

За допомогою дозатора (Д-9) вносять 1200 г глюкози, 240 г кукурудзяного екстракту та 180 г глутамат натрію у реактор (Р-10) на 75 л, додають через лічильник (Д-11) 20 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій та стерилізують при 112 °С (0,05 МПа), 30 хв. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у реакторі на рівні 40 °С. Отриманий розчин перекачують насосом (Н-12) у попередньо простерилізований інокулятор (І-14) об'ємом 100 л.

*ДР 6.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних терезах зважують 120 г  $\text{CaCO}_3$ , 378 г  $\text{MgSO}_4$ , 168 г  $\text{NaCl}$ ,

180 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 18 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Наважки поміщають у збірник об'ємом 25 л (З-13), додають за допомогою лічильника дистильовану воду (20 л), перемішують і подають самоплином до інокулятора (І-14), подають 6%-ий розчин  $\text{HCl}$  (від ДР 2.1) до досягнення рН 4,0-4,5 і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

*ДР 6.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту *R. sphaeroides* NY01 у виробничому ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>*

*ДР 6.4.1. Приготування і стерилізація композиції А*

За допомогою дозатора (Д-17) вносять 12000 г глюкози, 2400 г кукурудзяного екстракту та 1800 г глутамат натрію у реактор (Р-18) на 250 л, додають через лічильник (Д-19) 200 л води питної, вмикають перемішувачий пристрій та стерилізують 112 °С (0,05 МПа), 30 хв. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у реакторі на рівні 40°С. Отриманий розчин перекачують насосом (Н-20) у попередньо простерилізований ферментер (Фр-28) об'ємом 1 м<sup>3</sup>.

*ДР 6.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

За допомогою дозатора (Д-24) у збірник (З-25) вносять 1200 г  $\text{CaCO}_3$ , 3780 г  $\text{MgSO}_4$ , 1680 г  $\text{NaCl}$ , 1800 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 18 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . За допомогою лічильника додають 200 л дистильованої води, перемішують і подають самоплином до ферментера (Фр-28), до досягнення рН 4,0-4,5 і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

**ТП 7. Підготовка посівного матеріалу *Rhodobacter sphaeroides* NY01**

*ТП 7.1. Підтримання колекційної культури *R. sphaeroides* NY01*

Отриману колекційну культуру *R. sphaeroides* NY01 необхідно зберігати у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі. Раз на 3-4 місяці культуру слід пересівати на свіже поживне середовище. При роботі з колекційною культурою дотримуються усіх правил асептики.

*ТП 7.2. Одержання робочої культури *R. sphaeroides* NY01*

Колекційну культуру методом виснажувального штриха пересівають на

чашку Петрі з МПА для одержання ізольованих колоній. Культивують в термостаті при температурі  $30\pm 2$  °С (48-72 год).

*ТП 7.3. Вирощування R. sphaeroides NY01 у пробірках на агаризованих середовищах*

На стерильне скошене м'ясо-пептонне агаризоване середовище (МПА) у пробірках пересівають за допомогою бактеріологічної петлі ізольовані колонії *R. sphaeroides* NY01 (від ТП 7.2) із дотриманням асептичних умов. Тривалість вирощування становить 48 год, температура  $30\pm 2$  °С. Після закінчення культивування відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

*ТП 7.4. Вирощування R. sphaeroides NY01 у пробірках на агаризованих середовищах в колбах на качалках*

В асептичних умовах у колбу об'ємом 750 мл вносять композицію А (від ДР 6.1.1), композицію Б (від ДР 6.1.2) композицію В (від ДР 6.1.3) та Г (від ДР 6.1.4) вносять 60 мкл запасного розчину вітамінів самплером на 200 піпеткою на 0,5 мл (від ДР 5.1), перемішують і розливають по 150 мл у стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *R. sphaeroides* NY01 (від ТП 7.3) необхідно внести 5 мл фізіологічного розчину та суспендувати клітини, далі стерильною піпеткою слід віібрати отриману суспензію бактерій і внести її у качалочні колби із поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовується бактеріальна суспензія, одержана з 1 пробірки.

Культивування на качалках (320 об/хв) відбувається при температурі  $30\pm 2$  °С упродовж 48 год, після цього здійснюють мікробіологічний контроль, визначається концентрацію біомаси. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 250 мл.

*ТП 7.5. Вирощування R. sphaeroides NY01 в інокуляторі об'ємом 10 л*

У колбу на 6 з композицією А (від ДР 6.2.1) та композицію Б (від ДР 6.2.2), вносять самплером на 1000 мкл 600 мкл запасного розчину вітамінів (від ДР 5.2), і вмикають перемішуючий пристрій. Через засівну колбу вносять

посівний матеріал (від *ТП 7.4*). Культивування відбувається при температурі  $30\pm 2$  °С і концентрації розчиненого кисню ( $pO_2 = 20 - 30$  % від насичення повітря) упродовж 24 год. Підтримання  $pO_2$  на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації.

Кожні 4 год з інокулятора необхідно відбирати проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси.

*ТП 6.6. Вирощування R. sphaeroides NY01 в інокуляторі об'ємом 100 л*  
До інокулятора (І-14) подають насосом (Н-12) композицію А (від *ДР 6.3.1.*), та композицію Б (від *ДР 6.3.2.*), а також вносять піпеткою 6 мл запасного розчину вітамінів (від *ДР 5.3*), додають 120 мл 6-% розчину хлоридної кислоти (від *ДР 3*). Культивування відбувається при температурі  $30\pm 2$  °С і концентрації розчиненого кисню ( $pO_2 = 20 - 30$  % від насичення повітря) упродовж год. Підтримання  $pO_2$  на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації.

Кожні 4 год з інокулятора необхідно відбирати проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси.

## ***ТП 8. Виробничий біосинтез***

*ТП 8.1. Вирощування R. sphaeroides NY01 у виробничому ферментері на 1 м<sup>3</sup>*

До виробничого ферменту (Фр-27) подають насосом (Н-19) композицію А (від *ДР 6.4.1.*) та композицію Б (від *ДР 6.4.2.*), також колбою на 100 мл вносять 60 мл запасного розчину вітамінів, дробно подають запасний 40-% розчин глюкози кожні 8 годин по 15 г розчину (від *ДР 5*). Культивування відбувається при температурі  $30\pm 2$  °С і концентрації розчиненого кисню ( $pO_2 = 20 - 30$  % від насичення повітря) упродовж год. Підтримання  $pO_2$  на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації. Кожні 4 год з ферментера необхідно відбирати проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси.

## РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### 8.1. Мікробіологічний контроль

Спочатку відбирають 50 мл простерилізованого поживного середовища, і здійснюють прямий висів на агаризоване середовище. Контроль здійснюватиметься через висів проби простерилізованого середовища на чашки Петрі, що містять відповідне агаризоване середовище, далі необхідно провести інкубацію. Виконаємо посів, для цього з об'єму проби здійснюють відбір 0,1 мл (роблять це стерильною піпеткою), задля нанесення проби на поверхню двох середовищ:

СА – щоб виявити гриби та дріжджі

МПА – для виявлення бактерій [108].

Для виявлення бактерій будемо використовувати ВасТ/ALERT 3D, в основі дії лежить колориметричний метод і здатність барвників міняти колір сенсора з темно-зеленого на жовтий при наявності збудника.

Методом проколювання без розкриття флакону вноситься досліджуваний зразок і флакон вставляються в одну з лунок блоку для інкубації та моніторингу. Допускається внесення флаконів в будь-який час і в будь-яку лунку. Присутні в зразку мікроорганізми під час росту на поживному середовищі виділяють вуглекислий газ, який дифундує через вибірковопроникну мембрану і взаємодіє з сенсором. Зміна рН в ході цієї взаємодії призводить до зміни кольору сенсора з темно-зеленого на жовтий. Найменша зміна кольору вловлюється високочутливими датчиками (вимірювання проводяться кожні 10 хвилин), перетворюється в електричний сигнал, посилюється і передається в комп'ютер для аналізу. До 70% всіх збудників виявляється вже протягом 24 годин [109]

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.38 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Іванець О. А.			<b>РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Скροцька О. І.					81	116
Реценз.						81		
Н. Контр.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Затверд.		Стабнікоа В. П.						

## 8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

Показниками росту і синтезу цільового продукту є концентрація біомаси, концентрація цільового продукту та концентрація джерела Карбону та Нітрогену.

### 8.2.1. Концентрація біомаси

Біомасу визначатимемо завдяки вимірюванню оптичної густини при 700 нм. Для цього спочатку до 0,5 мл культуральної рідини додали 0,2 мл 0,1 N HCl, щоб досягти повного розчинення CaCO<sub>3</sub>. Далі необхідно за допомогою деіонізованої води розбавити культуральну рідину і виміряти оптичну густину спектрофотометром [110].

### 8.2.2. Концентрація цільового продукту

Концентрацію CoQ10 можна виміряти за допомогою ВЕРХ. Принцип методу: розділення компонентів суміші відбувається завдяки відмінності в рівноважному розподілі їх між рухомою і нерухомою фазами, які не змішуються. Особливістю даного методу є використання дрібнозернистих сорбентів і високого тиску, завдяки цьому складні суміші розділяються швидко і повністю [111, 112].

*Приготування досліджуваних зразків.* 10 мл культуральної рідини центрифугують при 5000 g протягом 30 хв, супернатант видаляють. Клітинну масу ретельно змішують з 10 мл екстракційного розчину, що складається з хлороформу та метанолу у співвідношенні 2/1 протягом 2 год. Після цього розчин фільтрували через мембрану фільтра 0,22 лм перед послідуєчим аналізом ВЕРХ.

### 8.2.3. Концентрація джерела Карбону і Нітрогену

При культивуванні *Rhodobacter sphaeroides* NY01 джерелом Карбону є глюкоза, задля визначення її концентрації в поживному середовищі можна використовувати ферментативний глюкозооксидазний метод. Його суть полягає в тому, що в присутності глюкозооксидази глюкоза киснем повітря здатна окиснюватися до перекису водню та глюконової кислоти. Перекис

водню реагує с фенолом та 4-амінофеназоном і в результаті утворюється хінонімін (його кількість прямо пропорційна кількості глюкози, що вступила у реакцію) червоно-фіолетового забарвлення, що визначатиметься фотометрично [113, 114].

Згідно методики, спочатку необхідно оцінити початкову концентрацію клітин, шляхом вимірювання оптичної густини при OD<sub>660</sub>, щоб відділити біомасу. Далі можна проводити вимірювання глюкози, завдяки C-Test Wako [114].

Щоб провести глюкооксидазний метод, необхідно мати:

1. Ензими ( у вигляді розчинів) - 1 флакон з (100 ± 2) мл або 2 флакони по (50 ± 2) мл;
  - пероксидаза (2200 ± 220) U/л;
  - β,D-глюкозооксидаза (18000 ± 1800) U/л;
  - 4-амінофеназон (110 ± 11) мг/л;
  - стабілізатори, активатори.
2. Буферний розчин - 1 флакон з (100 ± 2) мл або 2 флакони по (50 ± 2) мл;
  - фосфатний буфер (рН 7,2 - 7,4) (0,10 ± 0,01) моль/л,
  - фенол (190 ± 19) мг/л;
  - стабілізатори.
3. Антикоагулянт - 1 флакон або пакет;
4. Калібрувальний розчин глюкози ((10,0 ± 0,5) ммоль/л - 1 ампула з (5,0 ± 0,5) мл. або (1802 ± 90) мг/л).

Даний набір слід зберігати при температурі 2-16 °С, він придатний протягом 24 місяців. Застосовується лише *in vitro*.

Також необхідно мати фотометричне обладнання, яке зможе вимірювати оптичну щільність розчинів при довжині хвилі (500-550) нм в діапазоні (0-1,0) од. опт. щільності та довжині оптичного шляху 5 мм або 10 мм, водяний термостат або автоматична водяна баня, що підтримують температуру 37 ± 1 °С (у випадку проведення аналізу при цій температурі), мірна колба на 200 мл, на 500 мл, на 20 мл, а також піпетки місткістю 0,1 та 5 мл [114].

## Визначення концентрації джерела азотного живлення

Визначити концентрацію джерела азоту, в якості якого виступає кукурудзяний екстракт, можливо шляхом зворотнього титрування хлоридною кислотою. Для проведення аналізу необхідні:

- Три конічні колби по 250 см<sup>3</sup>;
- Піпетка по 25 см<sup>3</sup>;
- Дві склянки по 200 см<sup>3</sup>;
- Одна склянка по 100 см<sup>3</sup>;
- Одна склянка по 250 см<sup>3</sup>;
- Лійка для фільтра;
- Бюретка по 50 см<sup>3</sup>;
- Червоний лакмусовий папірець;
- Пальник;
- Щипці;
- Індикатор метиловий червоний,
- 0,1 М розчин амонію хлориду,
- 0,1 М розчин гідроксиду натрію,
- 0,1 М розчин соляної кислоти,
- дистильована вода

Весь скляний посуд слід ретельно вимити. Піпетку об'ємом 25 см<sup>3</sup> двічі промивають невеликою кількістю розчину хлориду амонію. Потім піпеткою вносять 25 см<sup>3</sup> хлориду амонію в три конічні колби по 250 см<sup>3</sup> кожна. Потім у кожен конічну колбу вносять піпеткою 50 см<sup>3</sup> NaOH і ставлять на пальник для кип'ятіння. Як тільки розчин у колбі починає кипіти, об'єм розчину зменшується; додають дистильовану воду. Пари, що виходили з колби, періодично перевіряють смужкою червоного лакмусового паперу, допоки пара не перестає забарвлювати смужку червоного лакмусу в синій колір. Потім колбу знімають з вогню і поміщають під проточний потік води для охолодження. Після охолодження в колбу додають 3 краплі метилового червоного, записують спостереження .

Біла плитку кладуть на основу бюретки під бюреткою. Першу колбу ставлять на білу плитку і розчин у ній поступово титрують HCl з бюретки.

Кран бюретки час від часу закривають, щоб дозволити розчину збоку бюретки стікати до розчину. Ближче до кінцевої точки титрування процес уповільнюють, крапля за краплею, доки крапля з бюретки не викликлече постійну зміну кольору. Використаний об'єм HCl записують у таблицю як кінцевий об'єм для пробного титрування. Об'єм HCl у бюретці поповнюють, а інші два титрування проводять швидше до об'єму приблизно на 2,00 см<sup>3</sup> менше, ніж об'єм, який використовувався для грубого титрування, що подається в колбу для титрування, кран закривають, HCl додають у колбу досить повільно, потім по краплях, до досягнення кінцевої точки. Початковий і кінцевий об'єм HCl, використаний для кожного титрування, записується в таблицю [115].

### **8.3 Показники якості готового продукту**

#### **8.3.1 Методи ідентифікації цільової речовини**

Ідентифікувати цільову речовину ми будемо за допомогою ВЕРХ-УФ. 200 мг коензиму Q10 екстрагується в темному спалаху об'ємом 25 мл 20,0 мл екстракційної суміші, що містить ACN:THF: вода у співвідношенні 40:55:5% об/об, у два етапи, спочатку струшуючи протягом 30 хвилин на струшувальному столі, а потім використовуючи ультразвукову обробку в ультразвуковій бані протягом додаткових 30 хвилин. Розчини складають з екстракційної суміші до 25,0 мл. 1 мл FeCl<sub>3</sub> (1,0 мг мл<sup>-1</sup>. розведений в етанолі) додають до 1,0 мл аліквоти з кожного екстракту, використовуючи темні колби об'ємом 10 мл. Суміші перемішують на вихровій пробірці, залишаючи інкубуватися на 30 хв при кімнатній температурі. Далі розчини доводять до 10,0 мл елюентом для ВЕРХ-УФ (ACN:THF: вода у співвідношенні 60:35:5% об/об). Потім розчини фільтрують через шприцеві фільтри з ПТФЕ 0,45 мкм і вводять в прилад ВЕРХ-УФ. Загальну концентрацію CoQ10 кількісно визначають за допомогою зовнішнього калібрування з інтегруванням площі піку. Точки калібрування були встановлені на 25,0, 50,0, 75,0, 100,0 і 125,0 мкг CoQ10 мл<sup>-1</sup> відповідно [116].

### **8.3.2 Тест на фотостабільність**

Метою тесту на фотостабільність є вивчення деградації матеріалів, чутливих до світла, в умовах прискореного світла. Тест на фотостабільність можна проводити під сонячним світлом або в лабораторії з використанням прозорих контейнерів і системи контролю, обгорнутої алюмінієвою фольгою, щоб оцінити внесок змін, викликаних термічним впливом, у загальну спостережувану зміну. Вивчається період експозиції, поки не відбудеться екстенсивне розкладання речовин.

Наприкінці часу експозиції перевіряють концентрацію аналіту, що залишився, і концентрацію, що залишилася, а також час експозиції будують на графіку, щоб оцінити швидкість фотодеградації, виконаної з використанням порядку реакції [117].

### **8.3.3 Антиоксидантна активність, визначена за допомогою відновлення заліза (FRAP)**

Метод FRAP оцінює відновну здатність зразка на основі його здатності відновлювати двовалентне залізо ( $\text{Fe}^{3+}$ ) у його двовалентній формі ( $\text{Fe}^{2+}$ ), яка відповідає вимогам 2,4,6-три(2-піридил)-s-триазин (TPTZ) з піком поглинання при 595 нм. Для цього визначення було приготовано два вихідних розчини: 0,5 мг/мл коензиму Його розбавляли 1:100 і 50 мкл додавали до 900 мкл розчину FRAP (буфер оцтова кислота-натрій ацетат [рН 3,4], TPTZ і  $\text{FeCl}_3$  у співвідношенні 10:1:1). Після 30 хв реакції визначається абсорбція при 595 нм і ці значення порівнюється зі стандартною кривою, побудованою з аскорбіновою кислотою (0–60 мкг/мл). Результати виражають в міліграм-еквівалентах аскорбінової кислоти/мг антиоксиданту (мг ЕАА/мг).

### **8.3.4 Антиоксидантний потенціал, визначений через 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил (DPPH) радикальне відновлення**

Колориметричний метод заснований на відновленні радикала DPPH, відновлюючи гідразин до поглинання 517 нм у присутності антиоксиданту. Для цього визначення були приготовлені вихідний розчини коензиму Q10 (0,5 мг/мл). Його розводили у співвідношенні 1:10, і 50 мкл кожного розведення

використовували для кожного визначення в дублікаті. Далі додавали 50 мкл 0,625 мМ етанольного розчину (50%) і 0,125 мл 0,8 мМ етанольного розчину DPPH (гомогенізованого за допомогою вортексу на кожному етапі). Кінетику процесу відразу ж вимірювали на спектрофотометрі при 517 нм у кюветі об'ємом 1 мл, а потім будували криву поглинання через 5, 10, 20, 30, 60 і 90 с.

За результатами кінетики процесу порівнювали здатність до відновлення радикала DPPH із такою після 5 с інкубації. Наступне рівняння використовувалося для визначення відсотка інгібування радикалів для кожної обробки протягом 5 с: % інгібування =  $[(AB - AM)/AB] \times 100$ . де (AB) = біле поглинання (реакційна суміш без зразка) і (AM) = поглинання зразка.

### **8.3.5. Зниження МТТ**

Колориметричний метод МТТ [3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію бромід] (Sigma ®) передбачає поглинання клітинами солі МТТ, яка відновлюється в мітохондріях до продукту - формазан. Цей продукт накопичується всередині клітини та екстрагується додаванням відповідного розчинника. Суспензію клітин у концентрації  $3 \times 10^4$  клітин/мл розподіляли в 96-лункові планшети (100 мкл на лунку) та інкубували при 37 °C у 5% CO<sub>2</sub> для адгезії. Далі додавали 90 мкл культурального середовища та 10 мкл різних концентрацій для обробки, і клітини знову інкубували протягом 24 годин. В кінці інкубаційного періоду додавали розчин МТТ і знову інкубували протягом 4 годин. Середовище обережно видаляли та додавали 100 мкл ДМСО для розчинення кристалів формазану. Потім планшети струшували протягом 20 хвилин, і абсорбцію кожного зразка вимірювали при 570 нм за допомогою пристрою для зчитування ELISA.

### **8.3.6. Alamar Blue ® Reduction**

Колориметричний метод Alamar Blue ® використовує окисно-відновний індикатор, який змінює окислену форму (блакитну та нефлуоресцентну) на відновлену (рожеву та флуоресцентну) у присутності метаболічно активних клітин. Для цього клітини ( $3 \times 10^4$  клітин/лунку) висівали в 96-лункові планшети та залишали прилипати протягом 1 години, після чого середовище

викидали та клітини обробляли різними концентраціями протягом 24 годин при 37 ° C і 5% CO<sub>2</sub>. Після обробки додавали Alamar Blue® у кількості, що дорівнює 10% об'єму середовища, що міститься в кожній лунці, і планшет інкубували протягом 4 годин при 37 ° C і 5% CO<sub>2</sub>. Обсяг Аламар Блю® зменшений контролювали шляхом вимірювання абсорбції при 570 і 600 нм за допомогою ELISA [118].

## РОЗДІЛ 9 АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Забезпечення безпеки та охорони здоров'я є невід'ємною складовою сучасної фармацевтичної промисловості. При виробництві лікарських засобів і медичних препаратів пріоритетним завданням є забезпечення якісної продукції, безпеки та ефективності, а також захисту здоров'я споживачів і працівників. У цьому розділі ми розглянемо важливі аспекти охорони здоров'я, пов'язані з діяльністю фармацевтичного виробництва.

Для біотехнологічних виробництв характерними є специфічні відходи у вигляді рідких, твердих або газоподібних викидів з біологічними частками, значною кількістю біомаси або іншими твердими часточками, утвореними в процесі виробництва. Отже, необхідно провести аналіз можливих відходів, включаючи їх класифікацію, утворювану кількість та методи утилізації.

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

Відповідно до складеної технологічної схеми, було досліджено можливість утворення рідких, газоподібних та твердих відходів і приблизно оцінено їх масштаби.

Основні види відходів, які формуються в цьому процесі, включають тверді відходи, стічні води та газоподібні відходи.

Тверді відходи: Тверді відходи у біотехнологічному виробництві головним чином представлені упаковувальним матеріалом, який використовується для доставки сировини для приготування поживних середовищ та компонентів мийних і дезінфікуючих засобів. Крім того, можлива ситуація, коли отримана сировина не відповідає заявленим стандартам і підлягає відбракуванню.

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.38 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Іванець О. А.			<b>РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</b>	<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Акрушіє</b>
Перевір.		Скороцька О. І.					89	116
Реценз.						89		
Н. Контр.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Затверд.		Стабнікоа В. П.						

Також біомаса біологічного агента може стати потенційним джерелом твердих відходів, якщо вона не є цільовим продуктом. Для кількісної оцінки масштабів твердих відходів проведемо аналіз обсягу використаного упаковувального матеріалу, зважаючи на обсяги виробництва за 1 цикл.

Рідкі відходи: На території біотехнологічних підприємств утворюються три категорії стічних вод: виробничі, побутові і атмосферні. Склад стічних вод залежить від технологічного процесу, складу змінюваних компонентів проміжних виробів і продукції, що випускається, складу вихідної свіжої води та місцевих умов. Рідкі відходи (стічні води) утворюються під час підготовки обладнання, продування оборотного водопостачання, промивання устаткування, вологого очищення газоповітряних викидів тощо.

Газоподібні відходи: Газоподібні відходи у біотехнологічному виробництві утворюються на етапі отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу у вигляді відпрацьованого повітря, що містить аерозоль клітин продуцента.

Таблиця 9.1.1

**Місця емісії, об'єми та шкідливість відходів, що утворюються на проєктованому виробництві**

Тип відходів	Назва відходів	Речовини, що входять до складу відходів	Стадія виробництва	Кількість відходів за 1 цикл виробництва	Клас небезпеки
Газопо- дібні	Відпрацьоване повітря з посівного апарату на 10 л	діоксид Карбону, клітини бактерій	Вирощування посівного матеріалу	$12 \times (24 \times 60) = 17,3 \text{ м}^3/\text{хв}$	IV
	Відпрацьоване повітря з посівного апарату на 100 л		Вирощування посівного матеріалу	$120 \times (24 \times 60) = 172,8 \text{ м}^3/\text{хв}$	IV
	Відпрацьоване повітря з ферментера		Виробничий біосинтез	$1200 \times (75 \times 60) = 5\,400 \text{ м}^3/\text{хв}$	IV

Закінчення Таблиці 9.1.1

Рідкі	0,5 % Біолонг	Бензалконію хлорид, октодецилдимети, амонію хлорид, ізопропіловий спирт	Дезінфекція поверхонь	688 л	IV
	0,2 % Дезактин	Дихлорантин, 5,5-диметилгідантої, диспергатор, аніонні поверхнево-активні речовини, інгібітор корозії, наповнювач		688 л	IV
	0,3% Біомой	Алкілбензолсульфонат натрію, лужна протеаза, карбонат натрію; диспергатор; наповнювач	Миття обладнання	1960 л	IV
	0,3 % Полідез	Полігексаметилеуганідн гідрохлорид, алкілдиметилбензиламонію гідрохлорид, коректор рН, барвник, ароматизатор	Дезінфекція обладнання	1960 л	IV
	0,15 % Бланідаз-А-Форте	надоцтова кислота		1960 л	IV
Тверді	Пластикова тара для мийних засобів	ПЕ- поліетилен	Санітарна підготовка виробництва	3,0 кг	IV
	Пакувальні матеріалами для компонентів поживного середовища	ПП – поліпропілен		3,0 кг	IV

## 9.2. Системи знешкодження рідких відходів

Показник середньорічної кількості стічних вод приймається за 2500 м<sup>3</sup>/1 тону продукту. Орієнтовну забрудненість стічних вод можна оцінити за

наступними показниками:

- |   |                               |
|---|-------------------------------|
| ➤ <u>Забарвлення стічних вод:</u> коричневе | ➤ <u>БСК5, мг/л:</u> 5200     |
| ➤ <u>Запах:</u> органічних розчинників      | ➤ <u>БСК10, мг/л:</u> 11500   |
| ➤ <u>Прозорість:</u> 2 см                   | ➤ <u>Хлориди, мг/л:</u> 3500  |
| ➤ <u>pH:</u> 4                              | ➤ <u>Сульфати, мг/л:</u> 5200 |
| ➤ <u>Завислі речовини, мг/л:</u><br>120-300 | ➤ <u>Фосфор, мг/л:</u> 0,3    |
| ➤ <u>Сухий залишок, мг/л:</u><br>35000      | ➤ <u>Азот, мг/л:</u>          |
| ➤ <u>ХСК, мг/л:</u> 28500                   | • амонійний:<br>35,0          |
|   | • нітратний:<br>18,0          |
|   | • нітритний: 3,5              |

Обчислимо середні витрати стічних вод від промислових підприємств.

Розпочнемо з середніх витрат стічних вод, м<sup>3</sup>/добу:

$$Q_v = q_e \times n = 2500 \times 0,04 = 100 \text{ м}^3/\text{добу}$$

Середні за зміну витрати побутових стічних вод:

$$Q_n = q_n \times N = 0,025 \times 40 = 1 \text{ м}^3/\text{зміну}$$

Загальна витрата атмосферних стічних вод  $Q_a = 0,2 \text{ м}^3$

Загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві:

$$Q = Q_v + Q_n + Q_a = 100 + 1 + 0,2 = 101,2 \text{ м}^3/\text{добу}$$

На рисунку 9.1 зображено установку для очищення стічних вод. МакВохВіо - це сучасна та інноваційна станція біологічного очищення, яка розроблена з використанням передових технологій в області водоочищення. Її головна мета - забезпечити ефективно та екологічно чисте очищення стічних вод на вашому підприємстві.

Основні етапи роботи станції:

1. Попереднє очищення: Стічні води, які містять органічні та неорганічні забруднення, спочатку проходять через етап попереднього очищення. На цьому етапі використовуються різноманітні фізичні методи, такі як сітки,

решітки та осадники, для видалення твердих часток та сміття зі стічних вод.

2. Біологічне очищення: Після попереднього очищення стічні води направляються в спеціальні біологічні реактори MakVoxBio. У цих реакторах відбувається процес біологічного очищення за допомогою мікроорганізмів, таких як бактерії та грибки. Ці мікроорганізми розкладають органічні речовини у стічних водах на біологічно безпечні компоненти, такі як вода, вуглекислий газ та біомасу.

3. Секція відстоювання та осадження: Після проходження через біологічні реактори очищені води потрапляють у секцію відстоювання та осадження, де відбувається відокремлення осаду від очищеної води. Осад, що утворюється, може бути подальше використаний у процесі переробки або утилізований.

4. Знезараження: Якщо потрібно, після очищення стічні води можуть піддаватися додатковому процесу знезараження, наприклад, за допомогою хлору або ультрафіолетового опромінення, щоб знищити залишкові мікроорганізми та забезпечити додатковий рівень безпеки [119].

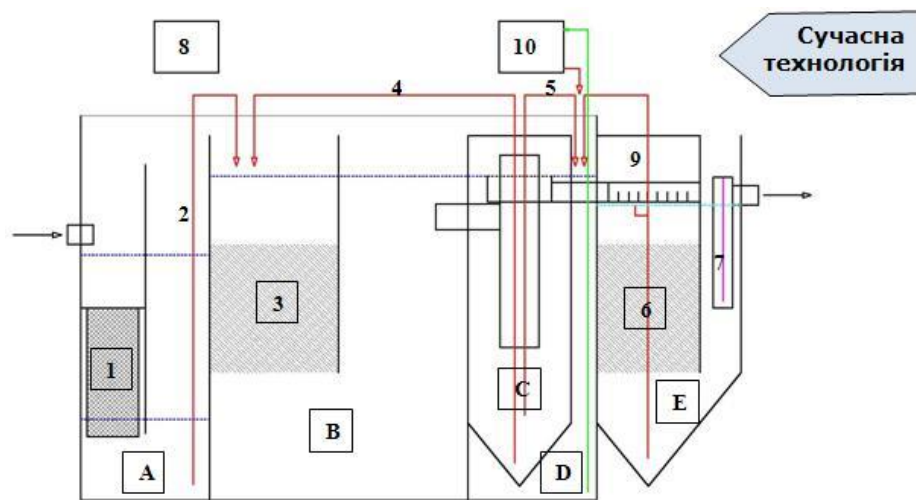


Рис 9.2 Технологія очищення води установкою MakVox

Стічна вода через вхідний трубопровід надходить до усереднювача (А), проходячи через корзину (1). Далі за допомогою аерліфта (2) вода перекачується до аеротенку (В), попадаючи спочатку на пластиківий аерований біофільтр (3). Завдяки біофільтру з прикріпленою аеробною мікрофлорою відбувається очищення основної маси забруднень та СПАР.

Далі, пройшовши другу зону аеротенка, стічна вода надходить у вторинний відстійник (С), де проходить розподіл на очищену воду та мул. При цьому активний мул направляється на рециркуляцію (4) на біофільтр, а надлишковий мул (5) у окремий відсік накопичення і стабілізації (D).

З вторинного відстійника вже очищена вода може подаватись в дренажну систему самопливно (9) або за допомогою дренажного насосу.

### **9.3 Системи знешкодження газоподібних відходів**

Об'єм газоподібних відходів приблизно дорівнює об'єму аераційного повітря, яке подається у посівні апарати та ферментер. У найменший посівний апарат об'ємом 10 л подається 1,2 л повітря / 1 л ПС за 1 хв. Вирощування інокуляту триває 24 годин, тому всього подається 17,3 м<sup>3</sup> повітря. В посівний апарат об'ємом 100 л подається 12 л повітря / 1 л ПС за 1 хв. Вирощування інокуляту триває 24 годин, тому всього подається 170,8 м<sup>3</sup> повітря. В ферментер об'ємом 1000 л подається 120 л повітря / 1 л ПС за 1 хв. Виробничий біосинтез триває 75 год, тому всього подається 5 400 м<sup>3</sup> повітря.

Отже, об'єм газоподібних відходів приблизно буде дорівнювати:

$$V_{г.в.} = 17,3 + 170,8 + 5\,400 = 5\,588 \text{ м}^3/\text{цикл.}$$

Для ефективного очищення газів від мікронного і субмікронного пилу широко використовуються швидкісні газопромивачі, такі як скрубери Вентурі (Рис. 9.3). Цей метод базується на принципі інтенсивного розпилення рідини в газовому потоці, який рухається з високою швидкістю (приблизно 60...150 м/с). Основна ідея полягає в тому, що газопотік збиває краплі рідини, яка розпилюється в його простір.

Газ спочатку проходить через конфузор, де зустрічає завісу зрошувальної рідини, яка подається форсунками до звуженої частини труби (горловини) перпендикулярно напрямку руху газу. Завдяки високій швидкості газу (що збільшується через зменшення перерізу труби в горловині) і зниженню тиску, рідина розпилюється на дуже дрібні краплі. Це сприяє

ефективному зволоженню частинок пилу і їх вилученню з газового потоку, включаючи навіть дуже маленькі частинки розміром у десяті долі мікрметра.

У дифузорі швидкість газу зменшується, що сприяє злиттю (коагуляції) крапель води, які несуть пил. Під час цього процесу маса крапель збільшується, що полегшує їх подальше відокремлення від газу. У дифузорі швидкість газу зменшується і відбувається злиття (коагуляція) крапель води, що несуть пил, їхня маса збільшується, що полегшує їх відокремлення від газу [120, 121].

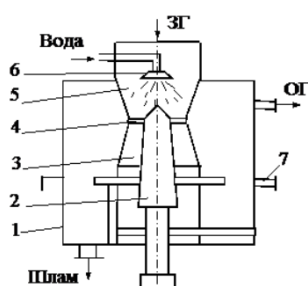


Рисунок 9.3 – Скрубер Вентурі з регульованим перерізом кільцевої горловини:

1 – корпус; 2 – регулювальний конус; 3 – дифузур; 4 – горловина; 5 – конфузур; 6 – форсунка; 7 – відцентровий краплеуловлювач

#### **9.4 Система знешкодження та утилізації твердих відходів**

До категорії твердих відходів належать наступні типи матеріалів і речовин:

1. Відбраковані субстанції, матеріали та лікарські засоби.
2. Субстанції, матеріали і лікарські засоби, які минули строк придатності.
3. Відходи пакувальних матеріалів.
4. Склобій.
5. Ганчір'я.
6. Матеріали для прибирання.
7. Некондиційна тара, пробки, ковпачки та прокладки.

8. Залишки сировини.
9. Відпрацьовані фільтрувальні матеріали і сорбенти.
- 10.Блістери, ампули, флакони, пляшки, тюбики зі збитковим продуктом.
- 11.Залишки фітосировини.
- 12.Нерозфасовані або неупаковані лікарські засоби.
- 13.Допоміжні матеріали, використовувані у виробництві.
- 14.Некондиційні елементи упаковочних матеріалів.
- 15.Речовини та побічні продукти, отримані в результаті технологічного процесу.

Ці види відходів належить відповідно переробляти та утилізувати згідно встановлених екологічних норм і правил.

Знешкодження фармацевтичних відходів відбувається в кілька етапів:

Спочатку необхідно прийняти рішення щодо необхідності знешкодження фармацевтичних відходів. Наступним пунктом є узгодження порядку знищення відходів з відповідними державними органами. Далі відбувається планування витрат на фінансування експертизи, кадрів, витрат часу, площ, обладнання та методів знищення відходів. Необхідним є сортування ЛЗ за окремими категоріями, оскільки методи знешкодження для них різняться.

Технологія знешкодження твердих відходів передбачає насамперед збір цих відходів із завчасним сортуванням за класифікацією, задля полегшення подальшого знешкодження. Після сортування визначається, які матеріали підлягатимуть повторній переробці, а які потребують утилізації. При необхідності ті відходи, що не підлягатимуть переробці, будуть вивезені на полігони 3го типу. Цей тип полігону передбачає викопування спеціальної ями, яка ізолювана від водотоків і розташована над рівнем ґрунтових вод. Відходи розміщуються в цій ямі, а зверху на них накладається ґрунтовий покрив. Такий полігон надійно ізолює відходи від навколишнього середовища і зменшує ризик забруднення ґрунтових вод [122].

## РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА

ДСТУ ISO 9000–2007 Системи управління якістю. Основні положення та словник термінів [123]

ДСТУ ISO 9001–2009 Системи управління якістю [124].

Вимоги ДСТУ ISO 9004–2001 Системи управління якістю. Настанови щодо поліпшення діяльності [125]

Настанова СТ-Н МОЗУ 42–3.0:2011 Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8) [126]

Настанова СТ-Н МОЗУ 42–4.0:2011 Лікарські засоби. Належна виробнича практика [127]

Настанова СТ-Н МОЗУ 42–4.2:2011 Лікарські засоби. Управління ризиками для якості (ICH Q9) [128]

Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.3:2011 Лікарські засоби. Фармацевтична система якості (ICH Q10) [129]

ICH Q10 Pharmaceutical quality system - Scientific guideline [130]

ICH guideline Q10 on pharmaceutical quality system - Step 5 [131]

ICH Q10 Pharmaceutical Quality System Guidance: Understanding Its Impact on Pharmaceutical Quality [132]

ICH Q7 Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients [133]

ICH Q8 Pharmaceutical Development [134]

ICH Q9 Quality Risk Management [135]

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.38 КР ПЗ</b>		
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>			
Розроб.		Іванець О. А.			<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Акрушіє</b>
Перевір.		Скроцька О. І.				97	116
Реценз.					97 <b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабнікоа В П.					
<i>РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ</i>							

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Stephen Sander PharmD<sup>12</sup> Craig I. Coleman PharmD<sup>12</sup> Aarti A. Patel PharmD, MBA<sup>12</sup> Jeffrey Kluger MD<sup>3</sup> C. Michael White PharmD The Impact of Coenzyme Q10 on Systolic Function in Patients With Chronic Heart Failure *Journal of Cardiac Failure* Volume 12, Issue 6, August 2006, Pages 464-472 <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2006.03.007>
2. Дзюба В., Кучменко О. Сучасні уявлення про роль убіхінону в процесах метаболізму клітини. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.*, 2017, 75: 3-13.
3. Google Patents Synthesis of coenzyme Q10 ubiquinone [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://patents.google.com/patent/US20030028054A1/en>
4. Donald K. Martina, Oscar Vicenteb, Tommaso Beccaric, Miklos Kellermayer and other. A brief overview of global biotechnology. 2021, 35(1): 5-14. doi: 10.1080/13102818.2021.1878933.
5. ResearchGate Chemical structure of coenzyme Q 10 [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-coenzyme-Q-10\\_fig1\\_329646206](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-coenzyme-Q-10_fig1_329646206)
6. Petrova, Ekaterina & Korotkova, Elena & Kratochvil, B. & Voronova, Olesya & Dorozhko, E. & Bulycheva, Liza. (2014). Investigation of Coenzyme Q10 by Voltammetry. *Procedia Chemistry*. 10. 10.1016/j.proche.2014.10.030.
7. Brian C. Brajcich, Andrew L. Iarocci, Lindsey A. G. Johnstone, Roly K. Morgan and other. Evidence that Ubiquinone Is a Required Intermediate for Rhodoquinone Biosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Bacteriology.*, 2010, 192(2): 436-445. doi: 10.1128/JB.01040-09.
8. Natori Y., Nagasaki T., Kobayashi A., Fukawa H. Production of Coenzyme Q10 by *Pseudomonas* N842. *Agric. Biol. Chem.*, 1978, 42(9): 1799-1800.

9. Moghadami F., Hosseini R. Effect of iron and silver nanoparticles on coenzyme Q production by *Gluconobacter japonicus* FM10. *Iran.J. Microbiol.*, 2020, 12: 592-600.
10. Tokdar P., Wani A., Kumar P., Ranadive P., George S. Process and Strain Development for Reduction of Broth Viscosity with Improved Yield in Coenzyme Q10 Fermentation by *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 4452. *Ferment Technol.*, 2013, 2(1): 1-6. doi: 10.4172/2167-7972.1000110.
11. Seo, Myung-Ji, Soon-Ok Kim. Effect of Limited Oxygen Supply on Coenzyme Q10 Production and Its Relation to Limited Electro Transfer and Oxidative Stress in *Rhizobium radiobacter* T6102. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 20(2), 346-349. doi: 10.4014/jmb.0909.09021.
12. Xu W., Yang S., Zhao J., Su T., Zhao L., Liu J. Improving coenzyme Q8 production in *Escherichia coli* employing multiple strategies. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 2014, 41, 1297-1303. doi: 10.1007/s10295-01401458-8.
13. Qiu, Lequan, Wang W., Zhong W., Zhong L., Fang J. Li X., Wu S., Chen J. Coenzyme Q10 Production by *Sphingomonas* sp. ZUTE03 with Novel Precursors Isolated from Tobacco Waste in a Two-Phase Conversion System. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 21(5), 494-502. doi: 10.4014/jmb.1012.12017
14. Vancanneyt M., Coopman R., Tytgat R., Berny J. and other. A taxonomic study of the Basidiomycetous yeast genera *Rhodospordium* banno and *Rhodotorula* Harrison based on whole-cell protein patterns, DNA base compositions and coenzyme Q types. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1992, 38: 363-377.
15. Rusinova-Videva S., Dimitrova S., Georgieva K., Katsarova M., Pavlova K. Effect of  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Fe^{2+}$  ions for accumulation of ergosterol,  $\beta$ -carotene and coenzyme Q10 by antarctic yeast strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL1. *Comptes rendus de l'Acad'emie bulgare des Sciences.*, 2016, 69(8): 1005-1012.

16. Mancini A., Festa R., Raimondo S., Pontecorvi A and Gian Paolo Littarru. Hormonal Influence on Coenzyme Q10 Levels in Blood Plasma. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, 12: 9216-9225. doi: 10.3390/ijms12129216.
17. Tomoko Ohnishia, John C. Salerno. Conformation-driven and semiquinone-gated proton-pump mechanism in the NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *FEBS Letters.*, 2005, 579: 4555-4561. doi: 10.1016/j.febslet.2005.06.086.
18. José Antonio Enriquez, Giorgio Lenaz. Coenzyme Q and the Respiratory Chain: Coenzyme Q Pool and Mitochondrial Supercomplexes. *Mol Syndromol.*, 2014, 5: 119-140. doi: 10.1159/000363364.
19. Mikael Turunena, Jerker Olsson, Gustav Dallner. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 2004, 171-199. doi:10.1016/j.bbamem.2003.11.012.
20. Placido Navas, Jose Manuel Villalba, Rafael de Cabo. The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses. *P. Navas et al. / Mitochondrion.*, 2007, 7: 34-40.
21. Constance Schmelze, Petra Niklowitz, Jurgen G. Okun, Dorothea Haas and other. Ubiquinol-Induced Gene Expression Signatures are Translated into Altered Parameters of Erythropoiesis and Reduced Low Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Humans. *Research Communication.*, 2011 63(1): 42-48. doi: 10.1002/iub.413.
22. Dayong Zhang, Bingxi Yan, Shanshan Yu, Chong Zhang and other. Coenzyme Q10 Inhibits the Aging of Mesenchymal Stem Cells Induced by D-Galactose through Akt/mTOR Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.*, 2015, 1-10. doi: 10.1155/2015/867293.
23. Kaya Y., Demir H., Bakan E., Hakan H. and other. Correlations between Oxidative DNA Damage, Oxidative Stress and Coenzyme Q10 in Patients with Coronary Artery Disease. *Int. J. Med. Sci.*, 2012, 9(8): 621-626. doi: 10.7150/ijms.4768.

24. Luis C. López, Marta Luna-Sánchez, Laura García-Corzo, Catarina M. Quinzii, Michio Hirano. Pathomechanisms in Coenzyme Q 10 -Deficient Human Fibroblasts. *Mol Syndromol.*, 2014, 5: 163-169. doi: 10.1159/000360494.
25. Maja Milivojevic Fir, Andrej Smidovnik, Luka Milivojevic, Janko Zmitek, Mirko Prosek. Studies of CoQ10 and cyclodextrin complexes: solubility, thermo- and photo-stability. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.*, 2009, 64: 225-232. doi: 10.1007/s10847-009-9555-4.
26. Burgardt A., Moustafa A., Persicke M., Spro J., Patschkowski T., Risse J., Peters-Wendisch P., Lee J., Wendisch V. Coenzyme Q<sub>10</sub> Biosynthesis Established in the Non-Ubiquinone Containing *Corynebacterium glutamicum* by Metabolic Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.*, 2021, 9, 1-18. doi: 10.3389/fbioe.2021.650961.
27. Seo, Myung-Ji, Soon-Ok Kim. Effect of Limited Oxygen Supply on Coenzyme Q<sub>10</sub> Production and Its Relation to Limited Electro Transfer and Oxidative Stress in *Rhizobium radiobacter* T6102. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 20(2), 346-349. doi: 10.4014/jmb.0909.09021
28. Lu Zhang Leshi Liu Ke-Feng Wang Lan Xu Liming Zhou Weishan Wang Chuan Li Zheng Xu Tong Shi Haihong Chen Yuanhang Li Hui Xu Xiu Liang Yang Zhichun Zhu Biqin Chen Dan Li Guanghuang Zhan Si-Liang Zhang Li-Xin Zhang Gao-Yi Phosphate limitation increases coenzyme Q10 production in industrial *Rhodobacter sphaeroides* HY01 *Synthetic and Systems Biotechnology* Volume 4, Issue 4, December 2019, Pages 212-219 doi.org/10.1016/j.synbio.2019.11.001
29. Qiu, Lequan, Wang W., Zhong W., Zhong L., Fang J. Li X., Wu S., Chen J. Coenzyme Q10 Production by *Sphingomonas* sp. ZUTE03 with Novel Precursors Isolated from Tobacco Waste in a Two-Phase Conversion System. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 21(5), 494-502. doi: 10.4014/jmb.1012.12017

30. P. A. Balakumaran and S. Meenakshisundaram Modeling of Process Parameters for Enhanced Production of Coenzyme Q10 From *Rhodotorula glutinis* *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 45:398–410, 2015 doi: 10.1080/10826068.2014.923447
31. Wikipedia *Rhodobacter sphaeroides* [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://en.wikipedia.org/wiki/Rhodobacter\\_sphaeroides](https://en.wikipedia.org/wiki/Rhodobacter_sphaeroides)
32. Shah DS, Pehinec T, Stevens SM, Aizawa SI, Sockett RE. The flagellar filament of *Rhodobacter sphaeroides*: pH-induced polymorphic transitions and analysis of the *fliC* gene. *J Bacteriol.* 2000 Sep;182(18):5218-24. doi: 10.1128/JB.182.18.5218-5224.2000. PMID: 10960108; PMCID: PMC94672.
33. Porter, S. L., Wadhams, G. H., Martin, A. C., Byles, E. D., Lancaster, D. E., & Armitage, J. P. (2006). The CheYs of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32694–32704. doi:10.1074/jbc.m606016200
34. Subudhi, Sanjukta & Mogal, Sachin & Kumar, Ram & Nayak, Tanmaya & Velankar, Harshad & Kumar, T.A. & Rao, Peddy & Nettem, Venkateswarlu & Shah, Gitesh & Gandham, Sriganesh. (2016). Biohydrogen Subudhi et al 2016.
35. Wang, X., Wu, X., Hu, J., Zhang, A., Chen, D., Yang, H., ... Guo, L. (2018). Isolation of a *Rhodobacter sphaeroides* mutant with enhanced hydrogen production capacity from transposon mutagenesis by NH<sub>4</sub> + nitrogen resource. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(30), 13821–13828. doi:10.1016/j.ijhydene.2018.01.17
36. Puskas A, Greenberg EP, Kaplan S, Schaefer AL. A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* 1997 Dec;179(23):7530-7. doi: 10.1128/jb.179.23.7530-7537.1997. PMID: 9393720; PMCID: PMC179706.
37. Chi SC, Mothersole DJ, Dilbeck P, Niedzwiedzki DM, Zhang H, Qian P, Vasilev C, Grayson KJ, Jackson PJ, Martin EC, Li Y, Holten D, Neil Hunter C. Assembly of functional photosystem complexes in *Rhodobacter sphaeroides* incorporating carotenoids from the spirilloxanthin pathway.

- Biochim Biophys Acta. 2015 Feb;1847(2):189-201. doi: 10.1016/j.bbabbio.2014.10.004. Epub 2014 Oct 27. PMID: 25449968; PMCID: PMC4331045.
38. *Cereibacter sphaeroides* [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=272943>
39. Washington EA. Ameliorating Statin-Associated Myopathies with Coenzyme Q10 Supplementation. *Lynchburg Journal of Medical Science*. 2023
40. A. N. Yasser, M. K. Abdulridha, M. A. Shafek The effectiveness of coenzyme q10 adjuvant therapy in statin-induced muscle symptoms in patients with dyslipidemia *Biochem. Cell. Arch. Vol. 21, Supplement 1, pp. 2771-2781, 2021*
41. Горбась Високий ризик серцево-судинних захворювань населення України: речення чи відправна точка *Львівський клінічний вісник* 2013, 3(3): 45-48 doi.org/10.25040/lkv2013.03.045
42. Г.І. Кочуєв Сучасні грані статинотерапії в практиці сімейного лікаря: запитання та відповіді [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://surl.li/geihq>
43. Аторвастатин - інструкція, показання, склад, спосіб застосування [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://surl.li/geihz>
44. Розувастатин - інструкція, показання, склад, спосіб застосування [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://surl.li/geiii>
45. Населення України [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://surl.li/gdiie>
46. Ішемічна хвороба серця та блокатори  $\beta$ -адренорецепторів: особливості вибору доцільного препарату *Аптека.ua № 32 (1303) 23 Серпня 2021 р.* [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.apteka.ua/article/606398>

- 47.КлінКейсКвест Токсичність бета-блокаторів: краще попередити, ніж лікувати [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://clincasequest.academy/beta-blocker-toxicity/>
- 48.G. Renke, M. B. Pereira, A. Renke Coenzyme Q10 for Diabetes and Cardiovascular Disease: Useful or Useless? [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://surl.li/geihh>
- 49.Chan, D. C., Pang, J., & Watts, G. F. (2014). Pathogenesis and Management of the Diabetogenic Effect of Statins: a Role for Adiponectin and Coenzyme Q10? *Current Atherosclerosis Reports*, 17(1). doi:10.1007/s11883-014-0472-7
- 50.M. Moradi, F. Haghghatdoost, A. Feizi, L. Azadbakht Effect of Coenzyme Q10 Supplementation on Diabetes Biomarkers: a Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Clinical Trials *Arch Iran Med*. 2016 Aug;19(8):588-96. PMID: 27544369
51. Вікіпедія Хвороба Гантінгтона [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://surl.li/gejnj>
52. NINDS Huntington's Disease [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ninds.nih.gov/health-information/disorders/huntingtons-disease>
- 53.Хорея Гентінгтона (ген НТТ) та Гентінгтоноподібне захворювання, тип 2 (ген JPH3) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.testdnk.com.ua/analizy-dnk/chorea-huntington-genetic-test>
- 54.Hussein R, Ibrahim M, Chatterjee R, Coates L, Müh F, Yachandra VK, Yano J, Kern J, Dobbek H, Zouni A. Optimizing Crystal Size of Photosystem II by Macro seeding: Toward Neutron Protein Crystallography. *Cryst Growth Des*. 2018 Jan 3;18(1):85-94. doi: 10.1021/acs.cgd.7b00878. Epub 2017 Nov 13. PMID: 29962903; PMCID: PMC6020701.
- 55.Chakraborty S, Mitra S, Falk MM, Caplan SH, Wheelock MJ, Johnson KR, Mehta PP. E-cadherin differentially regulates the assembly of Connexin43 and Connexin32 into gap junctions in human squamous carcinoma cells. *J*

- Biol Chem. 2010 Apr 2;285(14):10761-76. doi: 10.1074/jbc.M109.053348. Epub 2010 Jan 10. PMID: 20086013; PMCID: PMC2856283.
56. Katz JD, Ondr JK, Opoka RJ, Garcia Z, Janssen EM. Cutting edge: merocytic dendritic cells break T cell tolerance to beta cell antigens in nonobese diabetic mouse diabetes. *J Immunol.* 2010 Aug 15;185(4):1999-2003. doi: 10.4049/jimmunol.1001398. Epub 2010 Jul 19. PMID: 20644171; PMCID: PMC2916973.
57. Центр громадського здоров'я МОЗ України [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://phc.org.ua/news/11-kvitnya-vsesvitniy-den-borotbi-z-khvoroboyu-parkinsona>
58. Shults CW, Flint Beal M, Song D, Fontaine D. Pilot trial of high dosages of coenzyme Q10 in patients with Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2004;188(2):491-494. doi:10.1016/j.expneurol.2004.05.007
59. Muller T, Buttner T, Gholipour AF, Kuhn W. Coenzyme Q10 supplementation provides mild symptomatic benefit in patients з хворобою Паркінсона. *Neurosci Lett.* 2003;341(3):201-204. doi:10.1016/S0304-3940(03)00181-2
60. Beal MF. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;991:120-131. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07470.x
61. Wang Y, Yang X, Guo X, et al. Coenzyme Q10 prevents oxidative stress and fibrosis in isoprenaline-induced cardiac remodeling in rats. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(5):4817-4826.
62. Lifeextension Should Parkinson's patients take CoQ10? [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://content.iospress.com/articles/journal-of-alzheimers-disease/jad00839>
63. Roffe, L., Schmidt, K., & Ernst, E. (2004). Efficacy of Coenzyme Q10 for Improved Tolerability of Cancer Treatments: A Systematic Review. *Journal of Clinical Oncology*, 22(21), 4418–4424. doi:10.1200/jco.2004.02.034

64. Chai, W., Cooney, R. V., Franke, A. A., Shvetsov, Y. B., Caberto, C. P., Wilkens, L. R., ... Goodman, M. T. Plasma Coenzyme Q10 Levels and Postmenopausal Breast Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 19(9), 2351–2356. doi:10.1158/1055-9965.epi-10-0396
65. Complementary and Alternative Medicine [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.stlukes-stl.com/health-content/medicine/33/000706.htm>
66. Дієтичні добавки - користь чи шкода? [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ingeniusua.org/articles/diyetychni-dobavky-koryst-chy-shkoda>
67. Imports in Ukraine [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.volza.com/p/coenzyme-q10/import/import-in-ukraine/hsn-code-2106909200/>
68. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс]. – Japanese. – 2016. – Режим доступу: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?rsq00030](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?rsq00030)
69. ResearchGate Pathways of hepatic cholesterol and Coenzyme Q10 (CoQ10) biosynthesis in liver [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://www.researchgate.net/figure/Pathways-of-hepatic-cholesterol-and-Coenzyme-Q10-CoQ10-biosynthesis-in-liver\\_fig6\\_265691467](https://www.researchgate.net/figure/Pathways-of-hepatic-cholesterol-and-Coenzyme-Q10-CoQ10-biosynthesis-in-liver_fig6_265691467)
70. Nguyen Ba Kien, In-Soo Kong, Min-Gyu Lee, Joong Kyun Kim, Coenzyme Q10 production in a 150-l reactor by a mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Volume 37, Issue 5, 1 May 2010, Pages 521–529, <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0699-4>
71. Wikipedia *Rhodobacter sphaeroides* Електронний ресурс [Режим доступу]: [https://en.wikipedia.org/wiki/Rhodobacter\\_sphaeroides](https://en.wikipedia.org/wiki/Rhodobacter_sphaeroides)

72.Slideshare Stirred tank bioreactor

[https://www.slideshare.net/arunbiotec/stirred-tank-bioreactor?next\\_slideshow=72613285](https://www.slideshare.net/arunbiotec/stirred-tank-bioreactor?next_slideshow=72613285)

73.Aizawa, S.I. *Rhodobacter sphaeroides* — A Resourceful Little Bug. *The Flagellar World*, 66–68. (2014). doi:10.1016/b978-0-12-417234-0.00021-9

74.Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с. с.37-39 ISBN 978-966-612-083-3

75.Стерилізація аераційного повітря [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://surl.li/dgsqn>

76.Засіб дезинфікуючий універсальний Біолонг [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://epicentrk.ua/ua/shop/mplc-zasib-dezinfikuyuchii-universal-nii-biolong-1eb9b56e-d592-6d5c-a11b-a756917ffd43.html>

77.Дезактін методичні вказівки [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/dezaktin-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu/>

78.Біомой [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://mydez.com.ua/ua/p1193047158-biomoj.html?source=merchant\\_center&gclid=Cj0KCQjwz6ShBhCMARIsAH9A0qU1Sb0M2UcYYk7iQsJfKW1LBcYiRA1FDrKuBfRe\\_j57oCJrgvY12VsaAmvgEALw\\_wcB](https://mydez.com.ua/ua/p1193047158-biomoj.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQjwz6ShBhCMARIsAH9A0qU1Sb0M2UcYYk7iQsJfKW1LBcYiRA1FDrKuBfRe_j57oCJrgvY12VsaAmvgEALw_wcB)

79.Полідез (Інструкція МОЗ України) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://cci.vn.ua/wp-content/uploads/2020/04/Polydez-Ynstruktsyya-MOZ-Ukrayny-polnaya-1.pdf>

80.Бланідас А Форте [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://horeca-service.net/ua/product/blanidas-a-forte-20l/>

81.Wu, H.-S., & Tsai, J.-J. (2013). Separation and purification of coenzyme Q10 from *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(6), 872–878. doi:10.1016/j.jtice.2013.03.013

82.Масролаб Гомогенізатор високого тиску (мікрофлюїдаїзер) LM10 [Електронний ресурс] Режим доступу:

[https://www.macrolab.com.ua/catalog/microfluidics/laboratory\\_microfluidics/LM\\_10/](https://www.macrolab.com.ua/catalog/microfluidics/laboratory_microfluidics/LM_10/)

83. ТехноФабрика Центрифуга лабораторна [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://surl.li/hfuvl>
84. Ventalab Автоматична система Gerhardt SOXTHERM® SOX412 макро для екстракції [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ventalab.ua/avtomatichna-sistema-dlya-shvidkoi-ekstraktsii-soxtherm-sox412-2-misna-macro-230v-50gts-400w/>
85. Specified by S-Series-Roof Mounted Natural Ventilators [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.PHEN.pdf>
86. Фільтр грубої очистки [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://www.mpfiltri.com/FilesProdotti/XP57Wb\\_MPHEN.pdf](https://www.mpfiltri.com/FilesProdotti/XP57Wb_MPHEN.pdf)
87. Dalgakiran Турбокомпресор TRX [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/centrobizhni-kompresory-ih-dalgakiran-seriyi-t2/>
88. Dalgakiran Промисловий осушувач повітря Hankinson [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/promyslovi-osushuvachi-povitrya-hankinson-refryzheratornogo-tipu/>
89. Air link compressed air systems Ресивер Galvanized 1000Ltr Vertical Compressed Air Receiver Tank & Fittings – 4101000922 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://airlinkcompressors.com/products/galvanized-vertical-compressed-air-receiver-tank-1000l-fittings-4101000922>
90. ТЕКО Україна Водяний нагрівач SWH 100-50/3R [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://teko-ua.com/ua/vodyanoj-nagrevatel-swh-100-503r.html>
91. Tameson Фільтр MAFR302 [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://tameson.com/pneumatics/compressed-air-treatment/filter-regulator-lubricator/pneumatic-filter-regulator/mafr302-8a-g-1200-l-m-g1-4inch-filter-regulator-0p5-10bar.html?id\\_country=17](https://tameson.com/pneumatics/compressed-air-treatment/filter-regulator-lubricator/pneumatic-filter-regulator/mafr302-8a-g-1200-l-m-g1-4inch-filter-regulator-0p5-10bar.html?id_country=17)

92. Bailun bio Ферментер-біореактор BLBIO-10SJY [Електронний ресурс]  
Режим доступу: [http://www.blbio.com/en/Product\\_Detail.aspx?id=58](http://www.blbio.com/en/Product_Detail.aspx?id=58)
93. Цикада Дозатор ваговий Hualian NPF-200 [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://cicada.in.ua/ru/dozator-dlya-sypuchyh-produktov-npf-200-201-hualian?gclid=CjwKCAiA68ebBhB-EiwALVC-NpjQ\\_E4mYHq37S8hPEEZ\\_PGNkyDLH\\_tkLPWpIjpK1kwftp2kH-mGoXoCxdcQAvD\\_BwE](https://cicada.in.ua/ru/dozator-dlya-sypuchyh-produktov-npf-200-201-hualian?gclid=CjwKCAiA68ebBhB-EiwALVC-NpjQ_E4mYHq37S8hPEEZ_PGNkyDLH_tkLPWpIjpK1kwftp2kH-mGoXoCxdcQAvD_BwE)
94. ХИММІКС Вакуумний хімічний реактор на 75 л [Електронний ресурс]  
Режим доступу: <https://khimmix.ua/himicheskie-reaktory/bioreactor%2075%20liters>
95. Козак Дозатор об'ємний GCG-A напівавтоматичний [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/gcg-a-100-1000>
96. BOXER 3MQ Series [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.boxerpumps.com/en/products/miniature-diaphragm-pumps-liquid/boxer-3mq-liquid-diaphragm-pump-series/>
97. Berlinpackaging 25 liters stainless steel tank [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://www.berlinpackaging.eu/en/145/inox-tanks/978/25-liters-stainless-steel-tank?\\_adin=02021864894](https://www.berlinpackaging.eu/en/145/inox-tanks/978/25-liters-stainless-steel-tank?_adin=02021864894)
98. Bailun bio Ферментер-біореактор BLBIO-100SJY [Електронний ресурс]  
Режим доступу: [http://www.blbio.com/en/Product\\_Detail.aspx?id=53](http://www.blbio.com/en/Product_Detail.aspx?id=53)
99. Made in China 10 Liters 100 Liters Stainless Steel Fermenter [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://shbailun.en.made-in-china.com/product/VyWQApYdvnHJ/China-10-Liters-100-Liters-Stainless-Steel-Fermenter-Sand-blasting-.html>
100. Exont Coalescing filter & adsorber [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.emerson.com/documents/automation/european-catalog-series-651-652-653-coalescing-filter-adsorber-aventics-en-7004872.pdf>

101. Цикада Дозатор ваговий FZ-1000 Hualian [Електронний ресурс]  
Режим доступу: [https://cicada.in.ua/ru/dozator-dlya-sypuchyh-produktov-fz-1000-hualian?gclid=CjwKCAiAjs2bBhACEiwALTBWZXq5Oa47buq7h58xfdP2et3LxKAe3R\\_LAMqK0vcX1d\\_Iag69KR2VxhoCB44QAvD\\_BwE](https://cicada.in.ua/ru/dozator-dlya-sypuchyh-produktov-fz-1000-hualian?gclid=CjwKCAiAjs2bBhACEiwALTBWZXq5Oa47buq7h58xfdP2et3LxKAe3R_LAMqK0vcX1d_Iag69KR2VxhoCB44QAvD_BwE)
102. ХИММІКС Реактор 250л для виробництва антисептиків [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://khimmix.ua/himicheskie-reaktory/reactor-dlya-proizvodstva-antiseptikov>
103. AgroTech Дозатор-змішувач води [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://agro-teh.com.ua/ua/p370240337-dozator-smesitel-vody.html>
104. AgroTech Мембранний насос для рідин [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://agro-teh.com.ua/ua/p570771963-membrannyj-nasos-lmin.html>
105. AgroTech Ваговий дозатор [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://agro-teh.com.ua/ua/p570771963-membrannyj-nasos-lmin.html>
106. Czech brewery system Ферментер ССТ-SHP3-1000DE [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://eshop.czechminibreweries.com/ru/product/cct-shp3-1000de/>
107. AgroTech Мембранний насос для рідин Насос для перекачування AdBlue [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://agro-teh.com.ua/ua/p570173232-nasos-dlya-perekachki.html>
108. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с
109. Аналізатор BactAlert 3D [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://ukrbio.com.ua/pages-2/monitorinh-septychnykh-staniv/analizator-bactalert-3d>

110. Maja Milivojevic Fir, Andrej Smidovnik, Luka Milivojevic, Janko Zmitek, Mirko Prosek. Studies of CoQ10 and cyclodextrin complexes: solubility, thermo- and photo-stability. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.*, 2009, 64: 225-232. doi: 10.1007/s10847-009-9555-4.
111. Goara Vetisyan Рідкісної хроматографії ВЕРХ. Особливості використання методу високоефективної рідинної хроматографії у фармацевтиці Електронний ресурс [Режим доступу]: <https://goaravetisyan.ru/uk/zhidkostnoi-hromatografii-vezhh-osobennosti-ispolzovaniya-metoda/>
112. Wikiwand Високоефективна рідинна хроматографія Електронний ресурс [Режим доступу]: <https://inlnk.ru/O1exLI>
113. Lu ZhangLeshi LiuKe-Feng WangLan XuLiming ZhouWeishan WangChuan LiZheng XuTong ShiHaihong ChenYuanhang LiHui XuXiuLiang YangZhichun ZhuBiqin ChenDan LiGuanghuang ZhanSi-Liang ZhangLi-Xin ZhangGao-Yi Phosphate limitation increases coenzyme Q10 production in industrial *Rhodobacter sphaeroides* HY01 [\*Synthetic and Systems Biotechnology\* Volume 4, Issue 4, December 2019, Pages 212-219](#) doi.org/10.1016/j.synbio.2019.11.001
114. Millab analytic Тандемный квадруполь-времяпролётный масс-спектрометр серии Agilent 6550 (Q-TOF) Електронний ресурс [Режим доступу]: <https://analitika.millab.ru/catalog/analiticheskoe-oborudovanie/mass-spektrometry/dlya-zhidkostnoy-khromatografii-vezhkh-ms-i-kapillyarnogo-elektroforeza/agilent-6500/>
115. Studocu Back Titration of Ammonia Електронний ресурс [Режим доступу]: <https://www.studocu.com/row/document/university-of-technology-jamaica/physical-chemistry/310631085-back-titration-of-ammonia/10071504>
116. Rácz, A., Vass, A., Héberger, K., & Fodor, M. (2015). Quantitative determination of coenzyme Q10 from dietary supplements by FT-NIR

- spectroscopy and statistical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(10), 2887–2898. doi:10.1007/s00216-015-8506-8
117. Nirundorn Raekasin Purification of Coenzyme Q10 from Artemia by Chromatography and Preservation A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Chemistry Prince of Songkla University 2013 Електронний ресурс [Режим доступу]: <https://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2010/9454/1/375208.pdf>
118. Silva, S.V.e.; Gallia, M.C.; Luz, J.R.D.d.; Rezende, A.A.d.; Bongiovanni, G.A.; Araujo-Silva, G.; Almeida, M.d.G. Antioxidant Effect of Coenzyme Q10 in the Prevention of Oxidative Stress in Arsenic-Treated CHO-K1 Cells and Possible Participation of Zinc as a Pro-Oxidant Agent. *Nutrients* 2022, 14, 3265. <https://doi.org/10.3390/nu14163265>
119. Станції біологічного очищення [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://aquapolymer.com.ua/produksiya/station-biologichnogo-ochyshhennya/>
120. Швидкісні газопромивачі (скрубери Вентурі) [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://web.posibnyky.vntu.edu.ua/iebmd/severin\\_priodoohoronni\\_tehnologi/5-8.html](https://web.posibnyky.vntu.edu.ua/iebmd/severin_priodoohoronni_tehnologi/5-8.html)
121. Wikipedia Труба Вентурі [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%80%D1%83%D0%B1%D0%B0\\_%D0%92%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%83%D1%80%D1%96](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%80%D1%83%D0%B1%D0%B0_%D0%92%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%83%D1%80%D1%96)
122. Кочкин О., Сагайдак-Нікітюк Р.В. Дослідження методів знешкодження та утилізації відходів фармацевтичних підприємств удк 65:661.12 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/11523/1/332-335.pdf>

123. ДСТУ ISO 9000–2007 Системи управління якістю. Основні положення та словник термінів [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://dbn.at.ua/\\_ld/11/1128\\_432\\_iso9000-1-.pdf](https://dbn.at.ua/_ld/11/1128_432_iso9000-1-.pdf)
124. ДСТУ ISO 9001–2009 Системи управління якістю [Електронний ресурс] Режим доступу: [http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id\\_doc=25688](http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id_doc=25688)
125. Вимоги ДСТУ ISO 9004–2001 Системи управління якістю. Настанови щодо поліпшення діяльності [Електронний ресурс] Режим доступу: [http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id\\_doc=45956](http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id_doc=45956)
126. Настанова СТ-Н МОЗУ 42–3.0:2011 Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-1/st-n-mozu-42-3-0-2011/>
127. Настанова СТ-Н МОЗУ 42–4.0:2011 Лікарські засоби. Належна виробнича практика [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-3/st-n-mozu-42-4-0-2020/>
128. Настанова СТ-Н МОЗУ 42–4.2:2011 Лікарські засоби. Управління ризиками для якості (ICH Q9) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-3/st-n-mozu-42-4-0-2020/>
129. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.3:2011 Лікарські засоби. Фармацевтична система якості (ICH Q10) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.gmpua.com/World/Ukraine/nastanova42432011.pdf>

130. ICH Q10 Pharmaceutical quality system - Scientific guideline [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q10-pharmaceutical-quality-system-scientific-guideline>
131. CH guideline Q10 on pharmaceutical quality system - Step 5 [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human_en.pdf)
132. ICH Q10 Pharmaceutical Quality System Guidance: Understanding Its Impact on Pharmaceutical Quality [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34773177/>
133. Q7 Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Q7-Good-Manufacturing-Practice-Guidance-for-Active-Pharmaceutical-Ingredients-Guidance-for-Industry.pdf>
134. ICH Q8 Pharmaceutical Development [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q8-r2-pharmaceutical-development-scientific-guideline>
135. ICH Q9 Quality Risk Management [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use\\_en-3.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-3.pdf)

Ключові моменти культивування *Rhodobacter sphaeroides* HY01Phosphate limitation increases coenzyme Q<sub>10</sub> production in industrial *Rhodobacter sphaeroides* HY01

Lu Zhang<sup>a,2</sup>, Leshi Liu<sup>a,2</sup>, Ke-Feng Wang<sup>a,2</sup>, Lan Xu<sup>b</sup>, Liming Zhou<sup>a</sup>, Weishan Wang<sup>b</sup>, Chuan Li<sup>a</sup>, Zheng Xu<sup>b,1</sup>, Tong Shi<sup>a</sup>, Haihong Chen<sup>a</sup>, Yuanhang Li<sup>a</sup>, Hui Xu<sup>c</sup>, Xiuliang Yang<sup>d</sup>, Zhichun Zhu<sup>e</sup>, Biqin Chen<sup>e</sup>, Dan Li<sup>e</sup>, Guanghuang Zhan<sup>e</sup>, Si-Liang Zhang<sup>a</sup>, Li-Xin Zhang<sup>a</sup>, Gao-Yi Tan<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> State Key Laboratory of Bioreactor Engineering (SKLBE), And School of Biotechnology, East China University of Science and Technology (ECUST), No. 130 Meilong Road, Shanghai, 200237, China

<sup>b</sup> State Key Laboratory of Microbial Resources and CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (CAS), No.1 Beichen West Road, Beijing, 100101, China

<sup>c</sup> Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang, 110016, China

<sup>d</sup> Shandong Jincheng Bio-Pharmaceutical Co., Ltd, No. 117 Qixing River Road, Zibo, 255130, China

<sup>e</sup> Inner Mongolia Kingdoway Pharmaceutical Co., Ltd, Tuokeuo Power Industrial Park, Hohhot, 010206, China

## ARTICLE INFO

## Keywords:

*R. sphaeroides*

CoQ<sub>10</sub>

Phosphate limitation

Overproduction

Scale-up

Transcriptome

## ABSTRACT

Coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) is an important component of the respiratory chain in humans and some bacteria. As a high-value-added nutraceutical antioxidant, CoQ<sub>10</sub> has excellent capacity to prevent cardiovascular disease. The content of CoQ<sub>10</sub> in the industrial *Rhodobacter sphaeroides* HY01 is hundreds of folds higher than normal physiological levels. In this study, we found that overexpression or optimization of the synthetic pathway failed CoQ<sub>10</sub> overproduction in the HY01 strain. Moreover, under phosphate-limited conditions (decreased phosphate or in the absence of inorganic phosphate addition), CoQ<sub>10</sub> production increased significantly by 12% to 220 mg/L, biomass decreased by 12%, and the CoQ<sub>10</sub> productivity of unit cells increased by 27%. In subsequent fed-batch fermentation, CoQ<sub>10</sub> production reached 272 mg/L in the shake-flask fermentation and 1.95 g/L in a 100-L bioreactor under phosphate limitation. Furthermore, to understand the mechanism associated with CoQ<sub>10</sub> overproduction under phosphate-limited conditions, the comparative transcriptome analysis was performed. These results indicated that phosphate limitation combined with glucose fed-batch fermentation represented an effective strategy for CoQ<sub>10</sub> production in the HY01. Phosphate limitation induced a pleiotropic effect on cell metabolism, and that improved CoQ<sub>10</sub> biosynthesis efficiency was possibly related to the disturbance of energy metabolism and redox potential.

## 1. Introduction

Coenzyme Q (CoQ) is a crucial component of the respiratory chain, which is responsible for oxidative phosphorylation and adenosine triphosphate (ATP) generation in all aerobic organisms. CoQ comprises a polyisoprenoid tail and a benzoquinone nucleus, and according to the number of isoprenoid moieties in different species, CoQ can be classified into different subtypes (e.g., CoQ<sub>6</sub>, CoQ<sub>8</sub>, CoQ<sub>9</sub>, and CoQ<sub>10</sub>). In humans and some microbes, CoQ<sub>10</sub> is the major form of CoQ, and as a high value-added nutraceutical antioxidant, exhibits excellent capacity to prevent cardiovascular disease [1,2]. In Western countries, CoQ<sub>10</sub> is

among the most popular nutraceuticals and has been widely used for decades. In 2011, the CoQ<sub>10</sub> market reached \$500 million in United States [1].

Microbes are a primary source of certain chemicals, nutraceuticals, and drugs/drug precursors [3,4]. *Agrobacterium tumefaciens*, *Paracoccus denitrificans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Sporidiobolus johnsonii*, and *Rhodobacter sphaeroides* can naturally produce CoQ<sub>10</sub>, with the associated biosynthetic pathway for CoQ<sub>10</sub> has elucidated in these species [5–12]. Fig. 1 shows that the benzoquinone nucleus of CoQ<sub>10</sub>, the *para*-hydroxybenzoic acid moiety derived from the shikimate pathway, and the 10-isoprenoid tail are synthesized via the 2-C-methyl-D-erythritol 4-

(NADH/NAD<sup>+</sup>) and oxygen uptake yielded 163.5 mg/L of CoQ<sub>10</sub> in shake-flask fermentation by *R. sphaeroides* [22,25]. However, the titer of CoQ<sub>10</sub> in industrial strain (190 mg/L in shake-flask fermentation, Table 1) is higher than that in these genetically engineered strains. And up to now, none of the engineering endeavors achieved overproduction of CoQ<sub>10</sub> in an industrial strain, indicating that the rate-limiting steps in the CoQ<sub>10</sub> overproduction strains remain to be elucidated.

Inorganic phosphate is an important essential nutrient that determines cell physiology, nucleotide biosynthesis, and phospholipid and energy metabolism [27–30]. Under natural conditions, phosphorus is often a limited nutrient in microorganisms. Moreover, bacteria have evolved mechanisms to sense, adapt and respond under phosphate-

## 2.1. Microorganisms and cultivation

*E. coli* DH10b was used for plasmid construction and propagation, and *E. coli* S17-1 was used for di-parental conjugation. All *E. coli* strains were cultivated in Luria–Bertani medium at 37 °C. HY01 and its derivatives were cultivated on agar plates (0.8% yeast extract, 0.3% glucose, 0.2% NaCl, 0.13% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.0125% MgSO<sub>4</sub>, and 1.5% agar, supplemented with 15 mg/L biotin, 1 mg/L nicotinic acid, and 1 mg/L thiamine hydrochloride). For shake-flask and bioreactor fermentation, HY01 and its derivatives were cultivated in fermentation medium [4% glucose, 0.4% corn steep liquor, 0.3% sodium glutamate, 0.3% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.28% NaCl, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.63% MgSO<sub>4</sub>, and 0.2% CaCO<sub>3</sub>

213

**Table 1**  
List of *R. sphaeroides* strains and their CoQ<sub>10</sub> production in shake-flask fermentation<sup>a</sup>.

Strain	Descriptions	CoQ <sub>10</sub> production (mg/L)	Plasmid source/Ref.
HY01	CoQ <sub>10</sub> industrial strain <i>R. sphaeroides</i>	192.2 ± 3.7	
HY01-pBBR	HY01 containing pBBR1MCS2 (plasmid control)	192.9 ± 5.9	[26]
MEP pathway overexpression			
HY01-idi	<i>idi</i> overexpression in HY01	111.2 ± 4.4	This study
HY01-dxs	<i>dxs</i> overexpression in HY01	159.5 ± 5.1	This study
Quinone modification pathway overexpression			
HY01-ubiCA	<i>ubiC</i> , <i>ubiA</i> overexpression in HY01	105.5 ± 4.9	This study
HY01-ubiF	<i>ubiF</i> overexpression in HY01	86.5 ± 0.7	This study
HY01-ubiH	<i>ubiH</i> overexpression in HY01	168.0 ± 8.5	This study
HY01-ubiE	<i>ubiE</i> overexpression in HY01	210 ± 3.5	This study
HY01-ubiG	<i>ubiG</i> overexpression in HY01	83.5 ± 3.5	This study
MEP and quinone modification pathway optimization			
HY01-MQc	HY01 containing pMCS-MQc ( <i>dxc</i> , <i>dxr</i> , <i>idi</i> , <i>ispD</i> , <i>ubiE</i> , <i>ubiG</i> , <i>lactI<sub>RBS</sub>c</i> )	160.8 ± 1.1	[2]
HY01-MQe	HY01 containing pMCS-MQe ( <i>dxc</i> , <i>dxr</i> , <i>idi</i> , <i>ispD</i> , <i>ubiE</i> , <i>ubiG</i> , <i>lactI<sub>RBS</sub>e</i> )	90.5 ± 1.2	[2]

<sup>a</sup> Detail information about construction and fermentation of these genetic engineered strains is provided in supplementary materials. Data are expressed as mean ± standard deviation (SD).

supplemented with 1 mg/L thiamine hydrochloride, 1 mg/L nicotinic acid, and 15 µg/L biotin). For phosphate- limited conditions, 50% or 100% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> was removed from the fermentation medium, and potassium was replaced to the same level as that in the control group via the addition of potassium chloride.

(150 mm × 4.6 mm; YMC Co., Ltd., Tokyo, Japan) for HPLC analysis on an Agilent 1260 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The mobile phase (methanol: ethanol; 65: 35) was applied at a flow rate of 1.5 mL/min at room temperature, and the eluate was monitored at 275 nm using a photodiode array detector (Agilent Technologies, Santa