

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

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

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

«__» __ червня 2025 р.

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

«__» __ червня 2025 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

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

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

на тему: Одержання біомаси винних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*

Виконав: здобувач IV курсу, групи 1

ГОРБАТЕНКО Євгенія Антоніївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник БЕЛЕМЕЦЬ Тетяна Олександрівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти
(ім'я та прізвище) (підпис)
(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент БАНДУРА Ульяна Генадіївна
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2025 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

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

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ
“ 01 ” березня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ГОРБАТЕНКО Євгенія Антоніївна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання біомаси винних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin T73

керівник роботи БЕЛЕМЕЦЬ Тетяна Олександрівна, ст. викл.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 27 березня 2025 року № 188-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 28 червня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin T73; цільовий продукт: біомаса *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin T73; геометричний об'єм ферментера: 1 м³; коефіцієнт заповнення: 0,52

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; опис технологічної схеми; основні етапи виділення та очищення цільового продукту; контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу біомаси *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin T73– 1 аркуш формату А2

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з.п.	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика цільового продукту</i>	01.03.2025-05.03.2025	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	06.03.2025-12.03.2025	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	13.03.2025-24.03.2025	
4.	<i>Біосинтез цільового продукту</i>	25.03.2025-27.03.2025	
5.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	28.03.2025-11.04.2025	
6.	<i>Специфікація обладнання</i>	12.04.2025-19.04.2025	
7.	<i>Опис технологічної схеми</i>	20.04.2025-04.05.2025	
8.	<i>Основні етапи виділення та очищення цільового продукту</i>	05.05.2025-19.05.2025	
9.	<i>Контроль виробництва</i>	20.05.2025-24.05.2025	
10.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	25.05.2025-26.05.2025	
11.	<i>Оформлення графічної частини</i>	27.05.2025-28.05.25	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Євгенія ГОРБАТЕНКО _____
(ім'я та прізвище)

Тетяна БЕЛЕМЕЦЬ _____
(ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	7
ВСТУП	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ВИННИХ ДРІЖДЖІВ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> LALVIN T73.....	12
1.1. Морфолого-культуральні ознаки	12
1.2. Фізіолого-біохімічні ознаки	13
1.3. Таксономічний статус	16
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ <i>SACCHAROMYCES</i> <i>CEREVISIAE</i> LALVIN T73	17
2.1. Обґрунтування вибору <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin T73 та поживного середовища для його культивування	17
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА БІОМАСИ ВИННИХ ДРІЖДЖІВ <i>SACCHAROMYCES</i> <i>CEREVISIAE</i> LALVIN T73.....	26
3.1. Потреба у цільовому продукті – біомаса <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin T73	26
3.2. Розрахунок потужності виробництва	27
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів ...	28
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	29
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ БІОМАСИ ВИННИХ ДРІЖДЖІВ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> LALVIN T73	33
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin T73.....	33
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin T73.....	35
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ...	38
5.1. Обґрунтування способу <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin T73 і типу ферментера	38

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	40
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	43
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin T73.....	43
5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin T73	50
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	58
5.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках	59
5.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах	60
5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м ³	62
5.4.4 Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН	63
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	65
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	70
РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> LALVIN T73	76
8.1. Методика виділення та очищення біомаси <i>S. cerevisiae</i> Lalvin T73 ..	76
8.2. Підготовка виділеної біомаси до зберігання: процес зневоднення (сушіння)	77
8.3. Зберігання сухої дріжджової біомаси.....	79
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	82
9.1. Мікробіологічний контроль	82
9.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища	82
9.1.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури	82
9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	83
9.2.1. Концентрація біомаси	83
9.2.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту	85

ЛІТЕРАТУРА	88
ДОДАТКИ	99

ABSTRACT

This qualification work is devoted to a deep analysis and creation of an innovative technological and hardware scheme for the production of biomass of yeast *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin T73. The main goal of the research is to maximize the optimization of the cultivation process of these valuable microorganisms. Particular attention is paid to cultivation in an environment where the main source of carbon is molasses, which allows achieving an impressive biomass yield of up to 22.4 g/l.

The technological process is divided into two key stages: preparatory and production. The preparatory block is the foundation for successful cultivation and includes a number of critically important operations. Among them is the preparation of titration solutions of 6% sodium hydroxide (NaOH) and 42.5% orthophosphoric acid (H₃PO₄), which are indispensable for precise control of the pH of the environment. In addition, careful air preparation is carried out, which includes its purification and sterilization to prevent any contamination of the culture with foreign microorganisms. Sterilization of the nutrient medium is another key step that ensures the absence of competitive microorganisms. The preparation and sterilization of the defoamer is also extremely important, which prevents excessive foaming due to the high concentration of molasses during cultivation, ensuring process stability. Also, the preparatory stage includes clarification and centrifugation of the molasses.

After completing all preparatory operations, the main production process begins, which starts with the preparation of the seed material. This stage includes the cultivation of a sufficient amount of pure culture of *S. cerevisiae* Lalvin T73, which will serve as an inoculum for the main fermenter. Direct biosynthesis of biomass occurs in a fermenter with a volume of 1 m³ and is divided into three consecutive stages.

The apparatus diagram is part of the development and visualization of the technological process. It serves as a clear graphical representation of all involved apparatus, pipelines and auxiliary equipment, providing a complete understanding of the functioning of the entire system. This diagram shows in detail the sequence of operations and the interaction between the various elements, which is critical for the design, construction and operation of the installation. The diagram uses conventional symbols for all components,

including the fermenter, media preparation tanks, pumps, filters, air supply systems, as well as pipelines connecting them, creating a holistic picture of the technological cycle.

The coursework contains an introduction, nine chapters, a list of sources used, a technological and equipment diagram (A2 format). The total volume of the work is 109 pages and 16 tables.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin T73, biomass, biosynthesis, yeast, molasses, wine.

РЕФЕРАТ

Дана кваліфікаційна робота присвячена всебічному дослідженню та створенню інноваційної технологічної та апаратурної схеми для виробництва біомаси дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin T73. Головною метою дослідження є максимальна оптимізація процесу культивування цих цінних мікроорганізмів. Особлива увага приділяється культивуванню в середовищі, де основним джерелом вуглецю є меляса, що дозволяє досягти вражаючого виходу біомаси – до 22,4 г/л.

Технологічний процес поділяється на два ключові етапи: підготовчий та виробничий. Підготовчий блок є фундаментом для успішного культивування та включає низку критично важливих операцій. Серед них – приготування титрувальних розчинів 6%-го гідроксиду натрію (NaOH) та 42,5%-го ортофосфатної кислоти (H_3PO_4), які є незамінними для точного контролю рН середовища. Окрім цього, здійснюється ретельна підготовка повітря, яка охоплює його очищення та стерилізацію для запобігання будь-якій контамінації культури сторонніми мікроорганізмами. Стерилізація поживного середовища є ще одним ключовим етапом, що гарантує відсутність конкурентних мікроорганізмів. Надзвичайно важливою є також підготовка та стерилізація піногасника, який запобігає надмірному піноутворенню через високу концентрацію меляси під час культивування, забезпечуючи стабільність процесу. Також, до підготовчого етапу входить освітлення та центрифугування меляси.

Після завершення всіх підготовчих операцій починається основний виробничий процес, який стартує з приготування посівного матеріалу. Цей етап включає вирощування достатньої кількості чистої культури *S. cerevisiae* Lalvin T73, яка слугуватиме інокулянтом для основного ферментера. Безпосередній біосинтез біомаси відбувається у ферментері об'ємом 1 м³ та розділений на три послідовні етапи.

Апаратурна схема є частиною розробки та візуалізації технологічного процесу. Вона слугує наочним графічним уявленням усіх задіяних апаратів, трубопроводів та допоміжного обладнання, забезпечуючи повне розуміння функціонування всієї системи. Ця схема детально відображає послідовність операцій та взаємодію між різними елементами, що є критично важливим для проектування, будівництва та

експлуатації установки. На схемі використовуються умовні позначення для всіх компонентів, включаючи ферментер, ємності для приготування середовищ, насоси, фільтри, системи подачі повітря, а також трубопроводи, що з'єднують їх, створюючи цілісну картину технологічного циклу.

Курсова робота містить вступ, дев'ять розділів, список використаних джерел, технологічну та апаратурну схему (формат А2). Загальний обсяг роботи складає 109 сторінок та 16 таблиць.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin T73, біомаса, біосинтез, дріжджі, меляса, вино.

ВСТУП

Біотехнологія — це надзвичайно динамічна та багатообіцяюча галузь сучасної науки й промисловості, що відіграє ключову роль у вирішенні глобальних викликів - зокрема продовольча безпека, охорона здоров'я та сталий розвиток.. Серед широкого спектру біотехнологічних процесів особливе місце посідає мікробний синтез, зокрема, одержання біомаси мікроорганізмів, що є джерелом різноманітних цінних продуктів. В цьому контексті, дріжджі *S. cerevisiae* є лідерами завдяки їхній універсальності, безпечності та широкому спектру застосування – від харчової промисловості до фармацевтики та біоенергетики [1].

Актуальність дослідження, присвяченого одержанню біомаси винних дріжджів *S. cerevisiae* Lalvin T73, обумовлена зростаючим попитом на високоякісні мікроорганізми для використання у виноробстві, хлібопеченні, виробництві біологічно активних добавок та інших галузях [2]. Оптимізація процесів культивування, зокрема, використання доступних і ефективних субстратів, таких як м'ясо, відкриває нові можливості для підвищення рентабельності виробництва та розширення сфер застосування дріжджової біомаси.

Дана кваліфікаційна робота має на меті розробку та обґрунтування технологічної та апаратурної схеми одержання біомаси винних дріжджів *S. cerevisiae* Lalvin T73. В рамках роботи буде детально розглянуто характеристики цільового продукту, техніко-економічне обґрунтування виробництва, особливості біосинтезу, а також розроблено оптимальні підходи до підготовки сировини, культивування, виділення та очищення цільового продукту.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.45 КР ПЗ</i>									
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата										
Розробив		Горбатенко Є, А			<i>ВСТУП</i>				Літера		Аркуш		Аркушіє	
Перевірів		Белесмець Т. О.									11		109	
Реценз.									<i>Кафедра БТМ</i>					
Н. Контр.														
Зав. каф.		Стабніков В.П.												

11

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ВИННИХ ДРІЖДЖІВ *S. CEREVISIAE* LALVIN T73

1.1. Морфолого-культуральні ознаки

S. cerevisiae, відомі також як пекарські або пивні дріжджі, являють собою одноклітинні еукаріотичні мікроорганізми, які належать до царства Грибів (Fungi) та відділу Аскомікота (Ascomycota). Їхня морфологія та культуральні характеристики є ключовими для ідентифікації, вивчення та практичного застосування в різноманітних галузях промисловості, включаючи харчову, фармацевтичну та біотехнологічну.

На клітинному рівні *S. cerevisiae* демонструють поліморфізм, проте найчастіше вони мають овальну або еліпсоїдну форму з розмірами, що зазвичай варіюються від 5 до 10 мкм у діаметрі [13]. Клітинна стінка, що оточує цитоплазму, складається переважно з полісахаридів, таких як глюкан та маннан, а також білків, забезпечуючи структурну підтримку та захист клітини від зовнішніх впливів [4,5].

Характерною особливістю *S. cerevisiae* є здатність до брунькування – способу безстатевого розмноження, при якому від материнської клітини відбруньковується дочірня меншого розміру. Після відокремлення, дочірня клітина росте та набуває зрілості, повторюючи процес брунькування. У рідкісних випадках, за певних умов стресу, *S. cerevisiae* можуть переходити до статевого розмноження з утворенням асків, що містять аскоспори [4].

При культивуванні на поживних середовищах *S. cerevisiae* демонструють характерні культуральні ознаки, які залежать від складу середовища, температури інкубації та аерації. На агаризованих середовищах вони утворюють гладкі, округлі колонії кремового або білуватого кольору з чіткими краями.

					НУХТ БТЕК 04.01.45 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата							
Розробив		Горбатенко Є, А			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літера		Аркуш		Аркушів	
Перевірів		Белесмець Т. О.						12		109	
Реценз.						Кафедра БТМ					
Н. Контр.											
Зав. каф.		Стабніков В.П.									
						12					

Консистенція колоній зазвичай є пастоподібною або маслянистою. У рідких поживних середовищах ріст *S. cerevisiae* проявляється у вигляді помутніння середовища, а також утворення осаду на дні колби [5].

1.2. Фізіолого-біохімічні ознаки

Однією з фундаментальних фізіологічних характеристик дріжджів *S. cerevisiae* є метаболічна універсальність, яка яскраво проявляється в здатності здійснювати цукролітичний метаболізм. Цей процес, що лежить в основі отримання енергії та будівельних блоків для клітини, може протікати двома принципово різними шляхами залежно від наявності кисню в навколишньому середовищі. Важливо відзначити, що *S. cerevisiae* є факультативним анаеробом, тобто вони здатні ефективно використовувати кисень для аеробного дихання, але також можуть виживати та метаболізувати за його повної відсутності, вдаючись до анаеробного бродіння [7].

Ферментативна система *S. cerevisiae* являє собою складний та високоорганізований комплекс, що включає величезну різноманітність ферментів. Ці біологічні каталізатори відіграють ключову роль у забезпеченні безперебійного протікання численних біохімічних реакцій, необхідних для життєдіяльності клітини. Їхня діяльність не обмежується лише центральними метаболічними шляхами, такими як гліколіз, цикл Кребса та пентозофосфатний шлях, але й охоплює синтез життєво важливих клітинних компонентів, включаючи амінокислоти, нуклеотиди та ліпіди.

За умов достатнього постачання кисню, *S. cerevisiae* демонструють високоефективний процес аеробного дихання. В цьому випадку глюкоза та інші цукри піддаються повному окисненню до вуглекислого газу та води, що супроводжується вивільненням значної кількості енергії у формі АТФ. Цей аеробний шлях є енергетично вигідним для дріжджової клітини та забезпечує її інтенсивний ріст та розмноження.

Проте, в умовах обмеженого або повного дефіциту кисню, *S. cerevisiae* здатні переключатися на альтернативний метаболічний шлях – анаеробне бродіння. В цьому процесі цукри зазнають неповного окиснення, що призводить до утворення етанолу (спирту) та вуглекислого газу. Хоча бродіння є менш енергетично ефективним

порівняно з аеробним диханням, воно дозволяє дріжджам виживати та продовжувати метаболічну активність в безкисневому середовищі [5].

Оптимальні температурні умови для росту та розмноження більшості штамів *S. cerevisiae* знаходяться в діапазоні від 25 до 30 °C. Однак, слід зазначити, що існують окремі штами, які здатні адаптуватися та рости при значно нижчих або вищих температурах. Крім того, дріжджі демонструють стійкість до широкого діапазону значень pH, проте найкраще вони розвиваються у слабнокислому середовищі з pH близько 4-5.

Важливою особливістю культуральних характеристик *S. cerevisiae* є їхня вражаюча метаболічна гнучкість. Ці мікроорганізми здатні ефективно використовувати різноманітні джерела вуглецю, включаючи такі поширені цукри, як глюкоза, фруктоза, сахароза та мальтоза. При цьому, наявність конкретних вуглеводів у культуральному середовищі може суттєво впливати на швидкість росту дріжджів та на метаболічні шляхи, які вони переважно використовують [8].

Окрім того, *S. cerevisiae* проявляють різний ступінь толерантності до різноманітних стресових факторів, з якими вони можуть стикатися у своєму природному або промисловому середовищі. До таких факторів належать високі концентрації цукрів та етанолу, осмотичний стрес, а також значні коливання температури. Ці властивості є надзвичайно важливими для їхнього успішного застосування в різноманітних промислових процесах, де вони часто піддаються впливу несприятливих умов [9].

Здатність клітин *S. cerevisiae* накопичувати запасні поживні речовини, такі як глікоген та трегалоза, відіграє ключову роль у забезпеченні їхнього виживання в умовах нестачі поживних речовин або дії стресових факторів. Глікоген слугує внутрішнім джерелом глюкози, яка може бути використана для підтримання метаболізму, тоді як трегалоза виконує важливу захисну функцію, стабілізуючи білки та клітинні мембрани за несприятливих умов [10].

Клітинна стінка *S. cerevisiae* - складна структура, що містить в собі переважно з полісахаридів (глюканів та маннанів) та білків, забезпечує надійний захист клітини від різноманітних зовнішніх впливів. Вона запобігає механічним пошкодженням,

проти дії осмотичному стресу та слугує бар'єром проти дії патогенних мікроорганізмів. Склад та структура клітинної стінки можуть динамічно змінюватися залежно від умов росту та стадії клітинного циклу дріжджів.

Транспортна система *S. cerevisiae* є життєво важливою для забезпечення клітини необхідними поживними речовинами з навколишнього середовища та для ефективного виведення продуктів власного метаболізму. Клітинна мембрана багата на різноманітні транспортні білки, які спеціалізуються на перенесенні різних молекул, включаючи цукри, амінокислоти, іони та інші важливі сполуки, через гідрофобний ліпідний бішар [4,5].

Регуляторні механізми, що діють у клітинах *S. cerevisiae*, відрізняються складністю та багаторівневістю. Вони забезпечують точний контроль над усіма аспектами клітинної діяльності, включаючи регуляцію експресії генів на рівнях транскрипції та трансляції, посттрансляційні модифікації білків, а також контроль активності ферментів за допомогою алостеричної регуляції та ковалентних модифікацій. Ці складні системи дозволяють дріжджам швидко адаптуватися до змін у навколишньому середовищі та оптимізувати свій метаболізм.

Важливою фізіологічною характеристикою *S. cerevisiae* є чітко визначений клітинний цикл, який включає послідовні фази росту клітини, реплікації ДНК та, зрештою, поділу клітини. Ретельна регуляція клітинного циклу є абсолютно критичною для забезпечення правильного та скоординованого росту та розмноження дріжджів. Збій у цьому складному процесі здатен спричинити серйозні проблеми, включаючи відмирання клітин або виникнення патологій [11].

Взаємодія *S. cerevisiae* з іншими мікроорганізмами та навколишнім середовищем також є важливою складовою їхньої фізіологічної характеристики. Вони здатні вступати у різноманітні типи взаємодій, включаючи як симбіотичні, так і конкурентні відносини з іншими видами дріжджів, бактерій та грибів. Ці процеси можуть мати значний вплив на ріст, метаболізм та загальну здатність до виживання в різних екологічних нішах.

1.3 Таксономічний статус біологічного агента

Представлена нижче ієрархічна класифікація розкриває положення *S. cerevisiae* в системі живих організмів, починаючи з найвищого таксономічного рангу і завершуючи рівнем виду.

Таксономічний статус *S. cerevisiae*:

Надцарство: Еукаріоти (Eukaryota)

Царство: Гриби (Mycota)

Відділ: Аскоміцети (Ascomycota)

Клас: Сахароміцети (Saccharomycetes)

Родина: Сахароміцетові (Saccharomycetaceae)

Рід: Сахароміцес (*Saccharomyces*)

Вид: *Saccharomyces cerevisiae* [12]

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* LALVIN T73

2.1. Обґрунтування вибору *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin T73 та поживного середовища для його культивування

З метою визначення ефективності для виноробства було проведено порівняльний аналіз трьох штамів *S. cerevisiae*: Lalvin T73 [12], *S. cerevisiae* (загальний штам) [14,15] та ССТСС М201022 [13]. Оцінювалися такі критерії, як концентрація біомаси, тривалість культивування та вартість поживного середовища. Отримані результати демонструють значні відмінності між штамми за цими показниками.

Зокрема, Lalvin T73 показав найбільшу біомасу (22,4 г/л), що значно перевищує показники ССТСС М201022 (7,9 г/л) та *S. cerevisiae* (4,65 г/л). Цей штам також виявився найшвидшим у культивуванні, досягаючи необхідної концентрації за 72 години, тоді як ССТСС М201022 потребував 100 годин, а *S. cerevisiae* — лише 19 годин, що, можливо, свідчить про його швидший, але менш інтенсивний ріст у досліджених умовах.

Вартість поживних середовищ також відіграє важливу роль у виборі біологічного агента. Хоча склади середовищ були схожими, концентрація компонентів суттєво відрізнялася, що вплинуло на кінцеву вартість. Найекономічнішим виявилось середовище для *S. cerevisiae* Lalvin T73 (8,3 грн/л), тоді як для *S. cerevisiae* ССТСС М201022 воно було найдорожчим (284,5 грн/л), а для *S. cerevisiae* — помірним (8,76 грн/л).

НУХТ БТЕК 04.01.45 КР ПЗ

					РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробив		Горбатенко Є. А			Літера	Аркуш	Аркуші
Перевірів		Белесмець Т. О.				17	109
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. каф.		Стабніков В.П.					

На заключному етапі була розрахована умовна вартість 1 грама цільового продукту (біомаси) для кожного штаму. Результати чітко показали, що *S. cerevisiae* Lalvin T73 є найефективнішим з економічної точки зору, оскільки умовна вартість його біомаси найнижча (0,37 грн/г).

Крім того, саме цей штам продемонстрував найвищу швидкість утворення клітин за годину (0,31 г/год), що робить його лідером за сукупністю показників. Таким чином, *S. cerevisiae* Lalvin T73 виступає як найбільш перспективний біологічний агент для виробництва вина з урахуванням як продуктивності, так і економічної вигоди.

Особливості одержання біомаси на суміші ростових субстратів

Таблиця 2.1

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивува, год	Біомаса, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Посилання на літературу
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>S. cerevisiae</i> Lalvin T73	Меляса (NH ₄) ₂ SO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ D-біотин Кальцію пантотенат Тіаміну гідрохлорид	86 18 3,5 0,75 0,5 1 1	72	22,4	t = 0°C, pH = 4,5	Torrellas, M., Pietrafesa, R., Ferrer-Pinós, A., Capece, A., Matallana, E., & Aranda, A. (2023). Optimizing growth and biomass production of non-Saccharomyces wine yeast starters by overcoming sucrose consumption deficiency. <i>Frontiers in Microbiology</i> , 14, 1209940.

Продовження таблиці 2.1

<i>S. cerevisiae</i> strain CCTCC M201022	Сахароза	230	100	7,9	t = 25°C	Wang, D., Xu, Y., Hu, J., & Zhao, G. (2004). Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Journal of the Institute of Brewing, 110(4), 340-346.
	Дріжджовий	1,7				
	екстракт					
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,7				
	Хінат	0,9				
	Яблучна	3,0				
	кислота					
	Молочна	1,0				
	кислота					
	Вітамін D2	0,005				
	Вітамін B1	0,005				

Закінення таблиці 2.1

<i>S. cerevisiae</i>	Сахарози	2	19	4,65	t = 30°C	Frîncu, M., Dumitrache, C., Begea, M., Teodorescu, R. I., Diguta, C. F., Baniță, C. D., ... & Bărbulescu, I. D. (2022, January). Active wine yeast biomass obtained through biotechnological process. In Multidisciplinary Conference on Sustainable Development- Food Chemistry, Engineering & Technology.
	Солодового екстракту	2				
	Дріжджовий екстракт	0,5				
	Пептон ферментативний	0,5				

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів

Продуцент	Складова поживного середовища	Концентрація, г/л	Вартість компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1...)*
1	2	3	4	5	6
<i>S. cerevisiae</i> Lalvin T73	Меляса	86	34	2,92	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	18	88	0,66	1
	KH ₂ PO ₄	3,5	107	0,37	1
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,75	75	0,056	1
	D-біотин				
	Кальцію пантотенат	0,5	800	0,4	1
	Тіаміну гідрохлорид	1	900	0,9	1
		1	3085	3,0	1
	Вартість 1 л середовища – 8,3 грн				

Продовження таблиці 2.2

S. cerevisiae strain CCTCC M201022	Сахароза	230	130	29,9	1
	Дріжджовий екстракт	1,7	6000	10,2	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄				
	Хінін	1,7	88	0,15	1
	Яблучна кислота	0,9	269 774,2	242,79	2
	Молочна кислота	3,0	258	0,77	1
	Ергокальциферол				
	Тіаміну гідрохлорид	1,0	200	0,2	1
		0,005	3300	0,02	1
		0,005	3085	0,02	1
Вартість 1 л середовища – 284,5 грн					

Закінчення таблиці 2.2

<i>S. cerevisiae</i>	Сахарози	2	130	0,26	1
	Солодовий екстракту	2	1000	2	1
	Дріжджовий екстракт				
	Пептон	0,5	6000	3,0	1
	ферментативний	0,5	7000	3,5	1
	Вартість 1 л середовища – 8,76 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на травень 2025 р.

1 – <https://prom.ua/ua>, 2- <https://shop.hlr.ua/ua/>

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г біомаси, синтезованих на суміші ростових субстратів

Продуцент	Кількість біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утворених клітин за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Орієнтовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>S. cerevisiae</i> Lalvin T73	22,4	72	0,31	8,3	0,37
<i>S. cerevisiae</i> strain CCTCC M201022	7,9	100	0,079	284,5	36,0
<i>S. cerevisiae</i>	4,65	19	0,24	8,76	1,92

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА БІОМАСИ ВИННИХ ДРІЖДЖІВ *S. CEREVISIAE* LALVIN T73

3.1. Потреба у цільовому продукті – біомаса *S. cerevisiae* Lalvin T73

S. cerevisiae, або винні дріжджі, є ключовим мікроорганізмом, який відіграє незамінну роль у процесі перетворення виноградного соку на вино. Хоча ці дріжджі добре відомі своєю роллю у випічці хліба, саме у виноробстві вони виявляють весь спектр своїх можливостей.

Під час алкогольного бродіння, ініційованого дріжджами, прості цукри винограду утворюють етиловий спирт, вуглекислий газ та інші сполуки, які й надають вину його особливий смак та аромат. Чинниками, що визначають складність даного процесу, є штам дріжджів, температура, склад виноградного соку та інші відповідні характеристики [16,17].

Різні штами *S. cerevisiae* продукують унікальний набір ароматичних сполук, що впливає на букет вина. Одні штами надають вину фруктові нотки, інші – квіткові або пряні аромати. Вибір конкретного штаму є одним з найважливіших рішень, оскільки саме вони визначають стилістику майбутнього вина.

Крім спирту, дріжджі синтезують широкий спектр інших речовин, таких як вищі спирти, складні ефіри, кислоти та інші сполуки. Ці речовини взаємодіють між собою, створюючи складний ароматичний профіль вина. Кількість і тип цих сполук залежать від багатьох речей, включаючи особливості штаму дріжджів, умови ферментації та склад виноградного соку.

Важливо розуміти, що дріжджі не просто перетворюють цукри на спирт. Вони є активними учасниками процесу, що охоплюють усі етапи бродіння. Дріжджі можуть виділяти ферменти, які розщеплюють складні сполуки, змінювати кислотність суслу, а також взаємодіяти з іншими мікроорганізмами, присутніми у виноматеріалі [18,19].

					НУХТ БТЕК 04.01.45 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата					
Розробив		Горбатенко Є, А			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літера	Аркуш	Аркуші	
Перевірів		Белесмець Т. О.					26	109	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Зав. каф.		Стабніков В.П.							

Таким чином, *S. cerevisiae* не просто біологічним каталізатором, а справжнім творцем вина. Від вибору штаму дріжджів до управління умовами бродіння – кожен етап виробництва вина пов'язаний з діяльністю цих мікроорганізмів. Глибоке розуміння фізіології дріжджів та їхньої ролі у виноробстві дозволяє створювати вина з бажаними характеристиками та забезпечувати їх стабільну якість.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Українське виноробство продемонструвало свою стійкість, випустивши 55 мільйонів літрів вина у 2022 році [20]. Забезпечення такого масштабного виробництва вимагає не лише досвіду виноробів, а й застосування сучасних технологій. Так, для виробництва 1 650 000 л вина, що становить 3% від загального обсягу, необхідний ретельний розрахунок кількості дріжджів. Враховуючи оптимальну концентрацію дріжджів *S. cerevisiae* Lalvin T73 160 г сахарози X 0,14 = 22,4г/л [21] та стандартну дозу 1 г на галон [22], для цього потрібно виростити близько 33,55 м³ культуральної рідини.

1. 3% від загального обсягу виробництва вина

$$55\,000\,000 * 0,03 = 1\,650\,000 \text{ л}$$

2. Необхідна кількість дріжджів на 1 650 000 л

$$1 \text{ г} - 3,79 \text{ л (1 галон)}$$

$$X - 1\,650\,000 \text{ л}$$

$$X = 1\,650\,000 * 1/3,79 = 435\,356,2 \text{ г}$$

3. Об'єм культуральної рідини для виробництва 1 650 000 л вина

$$435\,356,2 \text{ г} / 22,4 \text{ г/л} = 19\,435,55 \text{ л} \approx 19,43 \text{ м}^3$$

4. Відновлення втрат цільового продукту 10% через фільтрування і сушіння

$$19,43 + 1,943 = 21,37 \text{ м}^3$$

Для виготовлення 1 650 000 літрів вина потрібно використовувати значний об'єм культуральної рідини – близько 21,37 м³, враховуючи концентрацію біомаси мікроорганізму 22,4 г/л.

3.3. Розрахунок геометричного об'єму ферментера

Щоб забезпечити річну потребу у дріжджах *S. Cerevisiae* Lalvin T73, необхідний для виробництва вина (згідно з розрахунками, наведеними в пункті 1.2), необхідно виростити 21,37 м³ культуральної рідини з урахуванням втрат під час виділення дріжджових клітин.

Щоб спланувати виробничий процес і визначити кількість необхідних ферментаторів, потрібно розрахувати, скільки культуральної рідини ми повинні отримувати за кожен цикл ферментації. Для цього поділимо загальний річний об'єм на кількість робочих днів (300). Це дозволить нам визначити добову виробничу потужність і, відповідно, кількість необхідних циклів ферментації.

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 21,37 / 300 = 0,07 \text{ м}^3$$

Отриманий продукт за цикл:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 * V_d * T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 * 0,07 * 144,5) / 24 = 0,47 \text{ м}^3$$

Робочий цикл ферментера ($T_{\text{цф}}$) формується з двох основних етапів: безпосереднього виробництва біомаси (136 годин) та підготовчих робіт (8,5 годин). Коефіцієнт запасу K_1 вводиться для того, щоб врахувати можливі непередбачені ситуації, такі як забруднення, поломки обладнання або необхідність додаткової стерилізації. Зазвичай цей коефіцієнт коливається від 1,1 до 1,5.

Підготовка ферментера до роботи включає в себе комплекс операцій: миття та візуальний огляд обладнання (1,5 години), перевірку герметичності всіх з'єднань (1 година), підігрів апарату до робочої температури (0,5 години), проведення стерилізації для знищення мікроорганізмів (1 година), охолодження до оптимальної температури для засіву (1 година), завантаження поживного середовища (2 години), внесення культури мікроорганізмів (0,5 години) та, після завершення процесу ферментації, вивантаження готової культуральної рідини (1 година).

Для визначення геометричного об'єму ферментера необхідно знати об'єм робочої рідини (K_P) за цикл і врахувати коефіцієнт заповнення (K_3):

$$V_r = V_{\text{цк}} / K_3 = 0,47 / 0,6 = 0,78 \text{ м}^3$$

Згідно з інформацією, ферментер, геометричний об'єм якого найближчий

$$V_{\phi} = 1 \text{ м}^3$$

Визначаємо точне значення коефіцієнта заповнення:

$$K_3 = V_{\text{цк}} / V_{\text{ф}} = 0,47 / 1 = 0,47$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу біомаси *S. cerevisiae* Lalvin T73

За один повний цикл виробництва в ферментері отримують 0,47 м³ культуральної рідини (як зазначено в пункті 1.3). Однак, слід врахувати, що під час процесу ферментації відбуваються втрати рідини через краплиносу в системі вентиляції. Ці втрати, як правило, становлять від 10 до 15% від загального об'єму отриманої культуральної рідини.

Враховуючи очікувані втрати поживного середовища та посівного матеріалу на рівні 10%, для забезпечення необхідного об'єму культури в кінці процесу, загальний об'єм завантаження ферментера має бути збільшений. Таким чином, перед початком виробничого біосинтезу необхідно завантажити:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} * (1 + E_{\text{ф}}) = 0,47 * 1,1 = 0,52 \text{ м}^3$$

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

Для забезпечення оптимальних умов культивування, встановлюється об'єм ферментера на рівні 0,52 м³. З огляду на те, що ферментер буде заповнений лише на 60% (коефіцієнт заповнення 0,6), його загальний геометричний об'єм (повний об'єм) складе:

$$V_{\text{ф}} = 0,52 / 0,6 = 0,86 \text{ м}^3.$$

Обирається стандартний ферментер, об'єм якого максимально наближений до потрібного:

$$V_{\text{сТ1}} = 1 \text{ м}^3$$

Визначаємо точне значення коефіцієнта заповнення:

$$K_{31} = 0,52 / 1 = 0,52.$$

Для запуску процесу ферментації вноситься посівний матеріал у кількості, що дорівнює 10% від об'єму поживного середовища:

Для засіву $V_{\text{роб.1}} = 0,52 \text{ м}^3$ середовища необхідно приготувати

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} * X_{\text{ф}} = 0,52 * 0,1 = 0,052 \text{ м}^3 \text{ або } 52 \text{ л, посівного матеріалу,}$$

де $X_{\phi} = 0,1$ – кількість посівного матеріалу, яка використовується для ферментера.

Таким чином, об'єм поживного середовища у ферментері буде:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пм1}} = 0,52 - 0,052 = 0,466 \text{ м}^3 \text{ або } 466 \text{ л}$$

Для отримання цільового об'єму культуральної рідини, а саме $0,052 \text{ м}^3$ (52 л), необхідно правильно розрахувати об'єм поживного середовища та посівного матеріалу для завантаження в інокулятор. Оскільки під час процесу культивування через систему вентиляції втрачається близько 10% рідини, загальний початковий об'єм завантаження повинен компенсувати ці втрати. Таким чином, необхідний загальний об'єм становить:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} * (1 + E_{\phi}) = 52 * 1,1 = 57,2 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 57,2 л за коефіцієнта заповнення 0,6 можливо отримати в посівному апараті об'ємом:

$$V_{\text{па2}} = 57,2 / 0,6 = 95,33 \text{ л}$$

Обирається стандартний ферментер, об'єм якого максимально наближений до потрібного:

$$V_{\text{ст2}} = 100 \text{ л}$$

Визначаємо точне значення коефіцієнта заповнення:

$$K_{32} = 62,7 / 105 = 0,57$$

Посівний матеріал вноситься в інокулятор кількості, що дорівнює 10% від об'єму поживного середовища:

$$V_{\text{роб.2}} = 57,2 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} * X_{\phi} = 57,2 * 0,1 = 5,72 \text{ л} - \text{посівного матеріалу}$$

де $X_{\phi} = 0,1$ – кількість посівного матеріалу, яка використовується для інокулятора.

Таким чином, об'єм поживного середовища в інокуляторі буде:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пм2}} = 57,2 - 5,72 = 51,48 \text{ л}$$

При вирощуванні 5,72 л посівного матеріалу в інокуляторі, приблизно 10% культуральної рідини буде втрачено через систему вентиляції. Для компенсації цих втрат та досягнення необхідного об'єму посівного матеріалу, загальний об'єм

поживного середовища та інокуляту, що завантажується в інокулятор, слід розраховувати з урахуванням прогнозованих втрат. Таким чином, загальний об'єм становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} * (1 + E_{\text{ф}}) = 5,72 * 1,1 = 6,29 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 6,29 за коефіцієнта заповнення 0,6 можна отримати в посівному апараті об'ємом:

$$V_{\text{па2}} = 6,29 / 0,6 = 10,49 \text{ л.}$$

Об'єм є стандартним, отже обираємо апарат:

$$V_{\text{ст3}} = 15 \text{ л.}$$

Визначаємо точне значення коефіцієнта заповнення:

$$K_{\text{з.3}} = 6,29 / 15 = 0,42$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву середовища об'ємом 6,29 л необхідно:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} * X_{\text{ф}} = 6,29 * 0,1 = 0,629 \text{ л посівного матеріалу}$$

де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – кількість посівного матеріалу, яка використовується для інокулятора.

Таким чином, об'єм поживного середовища в інокуляторі буде:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пм3}} = 6,29 - 0,629 = 5,663 \text{ л} \approx 5,67 \text{ л}$$

Для підготовки 689 мл посівного матеріалу для інокуляції, треба проводити культивування дріжджів в колбах на качалці. Для цього треба використати колби об'ємом 750 мл, які заповненні поживним середовищем на одну п'яту частину (коефіцієнт заповнення 0,2).

Кількість колб становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм3}} / (V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}) = 629 / (750 * 0,2) = 4,19 \approx 5 \text{ колби}$$

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу *S. cerevisiae* Lalvin T73 необхідно встановити ферментер об'ємом 1 м³, інокулятор об'ємом 100 л, 15 л та 5 качалочних колби.

Таблиця 3.1

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

№ стадії	Об'єм Культуральної рідини $V_{кр}$, м ³ (л)	Уточнений об'єм культуральної рідини* $V_{роб.}$, м ³ (л)	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$, м ³ (л)	Об'єм поживного середовища , $V_{пс}$, м ³ (л)	Коефіцієнт заповнення , $K_{зап}$, частка	Геометричний об'єм ферментера, $V_{ст}$, м ³ (л)
1	2	3	4	5	6	7
IV	0,47 м ³	0,52 м ³	52 л	466 л	0,52	1 м ³
III	52 л	57,2 л	5,72 л	51,48 л	0,57	100 л
II	5,72 л	6,29 л	629 мл	5,67 л	0,42	15 л
I	629 мл	629 мл	-	629 мл	0,2	5 колб

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОМАСИ ВИННИХ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* LALVIN T73

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

На схемі демонструється ключові метаболічні шляхи — гліколіз, окисне декарбоксилювання пірувату та частину циклу Кребса — що забезпечують катаболізм сахарози у *S. cerevisiae* з метою отримання енергії та будівельних блоків.

На початкових етапах гідролізується глюкоза та фруктоза. Далі глюкоза вступає в гліколіз, анаеробний процес, що перетворює одну молекулу глюкози на дві молекули пірувату, генеруючи при цьому 2 АТФ та 2 НАДН. Гліколіз починається з "інвестиційної" фази, де витрачається АТФ для фосфорилування цукрів, а потім переходить в "енергетичну" фазу з утворенням НАДН та АТФ.

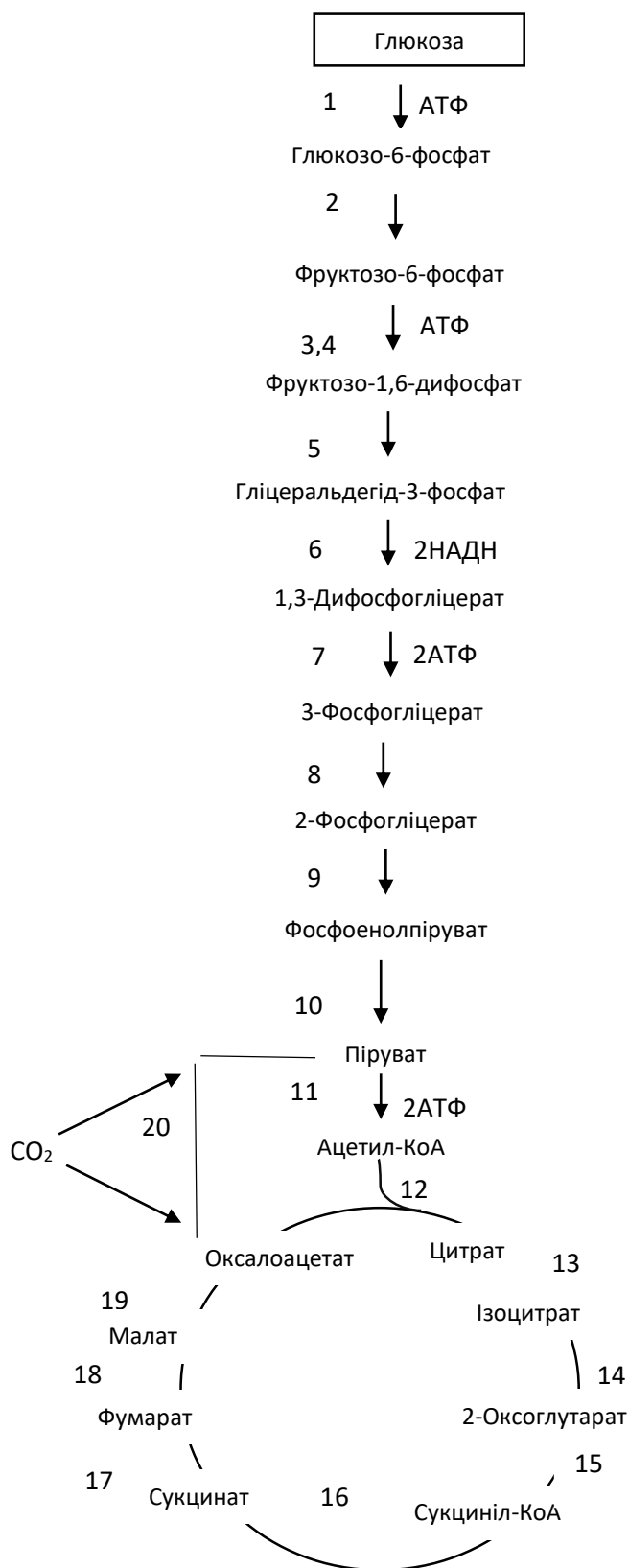
При наявності кисню, піруват транспортується до мітохондрій, де піддається окисному декарбоксилюванню, утворюючи Ацетил-КоА, CO_2 та НАДН. Ацетил-КоА вступає в цикл Кребса, де повністю окислюється до CO_2 , продукуючи додаткові НАДН, ФАДН₂, АТФ.

Таким чином, ці взаємопов'язані шляхи надають можливість дріжджам ефективно розщеплювати сахарозу для виробництва енергії (АТФ) та проміжних метаболітів, необхідних для біосинтезу біомаси [23].

Ферменти: 1- фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2), 2- глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9), 3- фруктозо-1,6-бісфосфатаза I (КФ 3.1.3.11), 4- 6-фосфоглюкокіназа 1 (КФ 2.7.1.11), 5- фруктозо-бісфосфат альдолаза (ЕФ 4.1.2.13), 6- гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (фосфорилуюча) (КФ 1.2.1.12), 7- фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3), 8- 2,3-бісфосфогліцерат-залежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11), 9- енолаза 1/2/3 (КФ 4.2.1.11), 10- піруваткіназа (КФ 2.7.1.40), 11- – цитратсинтаза

НУХТ БТЕК 04.01.45 КР ПЗ

					РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ		
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробив	Горбатенко Є. А				Кафедра БТМ	Літера	Аркуш
Перевірів	Белесмець Т. О.						33
Реценз.							109
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В.П.						



(КФ 2.3.3.1), 12 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3), 13 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42), 14 – дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4), 15 – сукциніл-КоА синтетаза, альфа-субодиниця (КФ 6.2.1.5), 16 – субодиниця цитохрому b сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.5.1), 17 – фумаратгідратаза клас II (КФ 4.2.1.2), 18 –

малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37), 19 – фосфенолпіруват-карбоксилаза (КФ 4.1.1.31), 20* - піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Утворення біомаси *S. cerevisiae* є комплексним процесом, що інтегрується різними метаболічними шляхами. Схема демонструє, як з сахарози, дріжджами синтезується всі необхідні для їхнього росту та функціонування макромолекули, включаючи полісахариди клітинної стінки, ліпіди, білки та нуклеїнові кислоти.

Початковим етапом є засвоєння глюкози. Вона фосфорилюється до глюкозо-6-фосфату, що є ключовою молекулою, яка може бути спрямована на різні шляхи. Частина глюкозо-6-фосфату йде на синтез глюканів та мананів, які є основними компонентами клітинної стінки. Інша частина глюкозо-6-фосфату через фруктозо-6-фосфат перетворюється на фруктозо-1,6-дифосфат, що є проміжною ланкою гліколізу. Гліколіз продукує гліцеральдегід-3-фосфат, який далі через ряд реакцій перетворюється на 3-фосфогліцерат, а потім на піруват. Піруват є розгалуженням для багатьох наступних шляхів: частина його може бути використана для синтезу амінокислот (наприклад, аланіну, валіну, лейцину), а інша частина перетворюється на ацетил-КоА.

Ацетил-КоА життєво важлива молекула для синтезу ліпідів, включаючи тригліцериди та гліколіпіди, попередником яких є 3-фосфогліцерат. Крім того, ацетил-КоА входить в цикл Кребса (цикл трикарбонових кислот) через оксалоацетат, що виробляє енергію та метаболіти для синтезу інших сполук. 2-Оксоглутарат, що є проміжним продуктом циклу Кребса, використовується для синтезу амінокислот (глутамат, пролін, аргінін, лізин). Також, варто відзначити, що лізин синтезується аміноадипіновим шляхом.

Окрім синтезу білків та ліпідів, на схемі також ілюструє утворення нуклеїнових кислот. Рибозо-5-фосфат є ключовим попередником, з якого синтезуються імідізол-нуклеотиди та пуринові та піримідинові основи, що далі формують ДНК та РНК [23-33].

Ферменти: 1- фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2), 2- глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9), 3- фруктозо-1,6-бісфосфатаза I (КФ 3.1.3.11), 4- 6-фосфофруктокіназа 1 (КФ 2.7.1.11), 5- фруктозо-бісфосфат альдолаза (ЕФ 4.1.2.13), 6- гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (фосфорилююча) (КФ 1.2.1.12), 7- фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3), 8- 2,3-бісфосфогліцерат-залежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11), 9- енолаза 1/2/3 (КФ 4.2.1.11), 10- піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin T73 і типу ферментера

Дріжджі *S. cerevisiae* є універсальним мікроорганізмом, що мають здатність рости як в аеробних (з киснем), так і в анаеробних (без кисню) умовах, що робить їх незамінними для різноманітних біосинтетичних процесів [4,7].

Для нарощування біомаси *S. cerevisiae*, необхідно створювати саме аеробні умови. Присутність кисню стимулює процеси дихання та інтенсивний клітинний ріст, що є критично важливим для досягнення високої щільності культури. Дріжджі можуть ферментувати цукри за відсутності кисню, утворюючи етанол (спиртове бродіння), цей процес не сприяє значному збільшенню клітинної маси. Тому для оптимізації виходу біомаси критично важливо є ефективне перемішування культури. Це забезпечує рівномірний розподіл кисню по всьому об'єму ферментера, підтримуючи необхідну аерацію та інтенсивний ріст клітин [34,35].

Отримання якісної біомаси *S. cerevisiae* неможливе без запобігання забрудненню сторонніми мікроорганізмами. Бактерії, дикі дріжджі або цвілеві гриби можуть конкурувати за поживні речовини, виробляти небажані метаболіти, що пригнічують ріст цільової культури, або навіть призвести до повної її втрати. Це не лише знижує вихід біомаси, а й негативно впливає на якість кінцевого продукту.

Саме тому асептичні умови культивування є абсолютно обов'язковими. Це може передбачати ретельну стерилізацію всього, що контактує з культурою: обладнання (ферментера, трубопроводів), поживного середовища та навіть повітря, що подається для аерації. Суворе дотримання асептики гарантує чистоту культури, забезпечує високу якість отриманої біомаси та мінімізує виробничі втрати [36,37]

					НУХТ БТЕК 04.01.45 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літера	Аркуш	Аркушів
Розробив		Горбатенко Є. А					38	109
Перевірів		Белесмець Т. О.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

Метод вирощування глибинним культивуванням є найбільш ефективним і поширеним підходом для промислового виробництва дріжджів.

При цьому методі дріжджі ростуть у рідкому поживному середовищі, що забезпечує оптимальний доступ клітин до поживних речовин та кисню (за умови ефективної аерації), сприяючи швидкому і рівномірному росту по всьому об'єму ферментера.

Періодичне культивування, що передбачає вирощування дріжджів в одній порції середовища протягом певного періоду часу без додавання нових поживних речовин, набагато частіше використовується для отримання високих виходів біомаси *S. cerevisiae*. Зазвичай культуру збирають у стаціонарній фазі росту, коли щільність клітин досягає максимуму, що дозволяє отримати максимальний вихід біомаси [38,39,40].

Для успішного масштабування виробництва біомаси *S. cerevisiae* на промисловий рівень ключове значення має вибір відповідного обладнання. У цьому контексті ферментер BXBIO BIOTECH-1000 л від Shanghai Baoxing Bio-Engineering Equipment Co., Ltd. (BXBIO) є високотехнологічним і надійним рішенням. Ця установка, що є частиною визнаної лінійки BIOTECH, ідеально підходить для пілотних та середніх промислових масштабів виробництва дріжджової біомаси, забезпечуючи ефективність і відтворюваність процесу.

Ферментер BXBIO BIOTECH-1000 л виділяється низкою характеристик, що робить його оптимальним вибором для інтенсивного культивування *S. cerevisiae*. Загальний об'єм у 1000 літрів, з робочою місткістю 65-75%, дозволить виробляти значні обсяги біомаси, що є важливим для комерційного виробництва. Крім того, приналежність до лінійки BIOTECH, яка включає моделі від 5 л до 50000 л, гарантує легке масштабування виробництва відповідно до зростаючих потреб. Важливою перевагою є універсальність застосування – ферментер придатний для культивування широкого спектра мікроорганізмів (бактерій, дріжджів, грибів) як в аеробних, так і в анаеробних умовах, що робить його ідеальним для вирощування біомаси *S. cerevisiae*.

Для ефективного аеробного культивування *S. cerevisiae*, ферментер BXBIO BIOTECH-1000 л оснащений передовими системами. Система аерації під тиском

являється життєвою важливою для інтенсивного росту дріжджів, забезпечуючи швидке та ефективне розчинення кисню в поживному середовищі. Верхній монтований агітатор з різними типами мішалок (гвинт, якір, скребок, емульгатор) гарантує гомогенне перемішування, завдяки чому поживні речовини, клітини та кисень розподіляються рівномірно, запобігаючи осіданню клітин та значно покращуючи масообмін. Оптимальні геометричні параметри апарату (висота 3000 мм, діаметр 900 мм) також сприяють ефективному перемішуванню. Додатково, система подачі піногасника контролює піноутворення, яке часто виникає при інтенсивній аерації, підтримуючи стабільність процесу.

Ферментер VXBIO BIOTECH-1000 л може забезпечувати точний контроль критичних параметрів для оптимізованого глибинного культивування. Це включає температуру (зазвичай 25-30°C для *S. cerevisiae*), pH та концентрацію розчиненого кисню, які підтримуються завдяки вбудованій системі контролю температури з сорочкою нагрівання та охолодження. Високі показники внутрішнього (0,2 МПа) та оболонкового (0,3 МПа) тиску гарантують безпечну та стабільну роботу ферментера під час стерилізації та ферментації. Для ефективного періодичного культивування, конструкція ферментера забезпечується легким завантаженням та вивантаженням. Комп'ютеризована система управління надає автоматизований моніторинг усіх параметрів, що є важливими для відтворення результатів, оптимізації процесу та контролю якості отриманої біомаси. Таким чином, ферментер VXBIO BIOTECH-1000 л створює оптимальні аеробні та асептичні умови, дозволяючи ефективно використовувати методи глибинного та періодичного культивування для максимального виходу високоякісної біомаси *S. cerevisiae* [41].

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Оптимальні умови для культивування дріжджів *S. cerevisiae* забезпечуються безперервним потоком стерильного повітря. Ця вимога обумовлена аеробним типом дихання дріжджів, який передбачає використання кисню для ефективного росту та метаболізму. Для підтримки асептичних умов у приміщеннях, де проводять роботи з *S. cerevisiae*, застосовується комплекс заходів, включаючи ультрафіолетове опромінення повітря. Крім того, для запобігання контамінації культуральних

середовищ сторонніми мікроорганізмами, використовують спеціальні фільтри та проводиться регулярні дезінфекції обладнання.

З метою забезпечення оптимальних умов для росту мікроорганізмів у біореакторах здійснюється підготовка стерильного стисненого повітря, яке подається в ферментер після проходження стадій очищення та стерилізації:

- Для забезпечення оптимального мікробіологічного середовища у ферментаційному цеху передбачено забір атмосферного повітря турбокомпресором з висоти 2-3 м від найвищої точки будівлі. Це дозволас мінімізувати ризик потрапляння в систему вентиляції великої кількості мікроорганізмів, концентрація яких, як відомо, знижується зі збільшенням висоти над поверхнею землі. З огляду на габарити обладнання (ферментер заввишки 3 м, а поверх – 6 м) та конструктивні особливості будівлі (косий дах), фактична висота забору повітря становить 10 метрів. Такий підхід дозволяє сприяти підвищенню чистоти повітря, що надходить у виробниче приміщення, та зниженню ризику контамінації культуральної рідини.

- Для ефективного видалення великих частинок аерозолі, таких як пил, з повітряних потоків, а ще для підтримки довготривалої та безперервної роботи компресорного обладнання застосовують фільтри попереднього очищення. Ці фільтри сприяють зниженню загального рівня забруднення повітря, що безпосередньо впливає на кращу якість кінцевого продукту, якщо очищене повітря використовується в технологічних процесах.

- З метою подолання гідравлічних опорів, що виникають під час фільтрації та диспергування повітря в культуральній рідині стискається турбокомпресором до тиску 0,35-0,5 МПа.. Такий підхід дозволяє забезпечити необхідний перепад тисків для ефективного проходження фільтрату через пористі матеріали. Однак, слід зазначити, що процес стиснення супроводжується значним підвищенням температури повітря (до 120-250°C), що обумовлює збільшення вмісту водяної пари в одиниці об'єму. Для усунення негативного впливу високої температури та підвищеної вологості на подальші технологічні процеси, необхідно застосування систем охолодження та осушення стисненого повітря.

- Для зниження температури повітря, що нагрівається під час стиснення, та конденсації надлишкової вологи в краплевловлювачі, використовуються водяні теплообмінники. Ці апарати забезпечують ефективне охолодження повітря за рахунок теплообміну з холодною водою, що циркулює по його трубках. Конденсат, що утворився в процесі охолодження, видаляється з краплевловлювача, запобігаючи подальшому насиченню повітря вологою.

- Для забезпечення оптимальних умов зберігання та подальшої обробки продукту, у ресивер подається сухе повітря, що дозволяє остаточно видалити конденсат та вирівняти тиск.

- Для забезпечення високого рівня стерильності повітря, яке надходить до всіх ферментерів цеху, використовується система механічної фільтрації. Основні фільтри, розташовані на головному колекторі стисненого аераційного повітря, заповнюються спеціальним набивним волокном, здатним затримувати до 98% мікроорганізмів. Така конструкція фільтрів дозволяє ефективно очищати повітря від бактерій, грибів та інших забруднень, забезпечуючи оптимальні умови для проведення ферментаційних процесів.

- Повітря, що надходить до індивідуальних ферментерів, проходить багатоступеневу систему фільтрації. Спочатку повітря очищується в головних фільтрах, встановлених безпосередньо на кожному ферментері, які ефективно затримують до 99,999% мікроорганізмів, забезпечуючи стерильність процесу ферментації. Далі, повітря розподіляється по ферментерах через систему колекторів, гарантуючі рівномірний розподіл очищеного повітря та підтримує оптимальні умови для росту культур

Волокнисті та пористі матеріали є найбільш ефективним і економічно доцільним рішенням для очищення повітря в промислових умовах, забезпечуючи ступінь очищення до 99,9999%. Завдяки інерційному та дифузійному механізмам осадження, такі фільтри здатні затримувати навіть найдрібніші забруднюючі частинки. Для підтримки високої ефективності фільтрів необхідно проводити регулярну стерилізацію. Оптимальним методом є парова стерилізація при температурі 125-130°C протягом визначеного часу. Після цього фільтруючий

матеріал піддають сушці гарячим повітрям для видалення залишків вологи та підготовки до подальшої експлуатації [42,43,44,45].

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

У таблиці наведено детальний опис ряду дезінфікуючих засобів, що різняться за складом, спектром антимікробної дії та особливостями застосування. Для кожного засобу вказано його торгову назву, активні речовини, форму випуску та концентрацію діючої речовини. Таблиця містить інформацію про характерні властивості кожного дезінфектанту, методи його застосування, а також орієнтовну вартість та термін придатності.

Зведена таблиця характеристик мийно-дезінфікуючих засобів

Назва засобу	Склад	Протимікробна активність	Характеристика	Можливість застосування на різних матеріалах	Застосування : концентрація робочого розчину	Інформація щодо державної реєстрації	Вартість	Джерело
«БЮПАГ ДЕЗ ЕН» (виробник ТОВ «ДАНА МЕДІКАЛ», Україна)	C12-14 алкілдиметил бензил амоній хлорид 9,0% – 10,0%, полі (гексаметилен) гуанідину гідрохлорид 4,0%-5,0%, 2-пропанол 3,0%-5,0%, комплекс ензимів.	Гриби, спори, віруси, бактерії	Дезінфікуючий засіб, забезпечує високоефективне розщеплення біологічних забруднень. Справляється з білками, жирами, полісахаридами та іншими органічними речовинами. Ензими дозволяють не лише ефективно очищати поверхні та інструменти, але й запобігають утворенню біоплівки.	Засіб, м'яко, але ефективно розщеплює органічні забруднення без агресивного впливу на поверхні. Безпечний для металу, пластику, гуми, скла, а також на текстилі та інших поверхнях, де важливо зберегти їхню цілісність та властивості.	0,05-0,15%	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2023 року за №1363. Дата внесення: 27.07.2023 року. Термін дії до: 27.07.2028 року	1 л коштує 589,0 грн	[46,47]

« Huwa-SanTR50» (виробник Roam Technology NV, Гренландія)	Пероксид водню 49,0-49,9%	Гриби, спори, віруси, бактерії	Засіб без хлору, побічних продуктів, активний при екстремальних значеннях рН та високих температурах, не залишає слідів, запаху та кольору, забезпечує швидку очистку всієї системи поливу, очистку ємностей для води, дезінфекцію приміщень, поверхонь, інструментів та обладнання, ефективний проти грибкових захворювань деревини та бактеріального опіку	Використовується для дезінфекції та очищення поверхонь з нержавіючої сталі, пластику, скла, кераміки, гуми, а також у системах водопостачання, без ризику корозії чи пошкодження матеріалів. Засіб ефективний для обробки обладнання, інструментів, ємностей для води та поверхонь у приміщеннях, забезпечуючи високий рівень гігієни без негативного впливу на матеріали.	4%	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2022 року за №270. Дата внесення: 10.02.2022 року. Термін дії до: 10.02.2027 року	1 кг коштує 870,0 грн	[48]
--	---------------------------	--------------------------------	--	--	----	---	-----------------------	------

Продовження таблиці 5.1

«TASKI Sani 4 in 1 Plus» (виробник Diversey Polska Sp. z o.o., Польща)	Молочна кислота 17,6%	Гриби, спори, віруси, бактерії	Кислотний засіб, що має функції: очищення, видалення накипу, дезінфекцію та дезодорацію всіх кислотостійких твердих поверхонь. Також нейтралізує неприємні запахи, залишаючи свіжий аромат.	Можна використовувати для ефективного очищення і дезінфекції різноманітних водостійких твердих поверхонь, включаючи підлоги, стіни, сантехніку та інші предмети інтер'єру	2%	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2022 року за №63. Дата внесення: 13.01.2022 року. Термін дії до: 13.01.2027 року	750 мл коштує 402 грн	[49,50]
«Helpix Sanity» (виробник ТОВ «НВП «АРТХІМ», Україна)	Бензалконій хлорид у межах 10,0-20,0% та калію гідроксид у межах 15,0-25,0%	Гриби, спори, віруси, бактерії	Концентрований засіб, який вирізняється потужними миючими властивостями, ефективно видаляючи широкий спектр забруднень. Забезпечує не лише ретельне очищення поверхонь від органічних та хімічних плям, жиру, пилу та інших стійких забруднень, а й має пролонговану дезінфікуючу дію.	Універсальний засіб, не пошкоджує структуру та колір оброблюваних поверхонь, що робить його придатним для використання на підлогах, меблях, сантехнічному обладнанні та інших поверхнях як у домашніх умовах, так і в спеціалізованих приміщеннях.	10%	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2021 року за №660. Дата внесення: 08.04.2021 року. Термін дії до: 08.04.2026 року	20 л коштує 650,0 грн	[51]

«Cif SafeGuard Professional Concentrate» (виробник Diversey Polska Sp. z.o.o, Польща)	Алкіл (C12- C16)диметилб ензиламоній хлорид – 7%	Гриби, спори, віруси, бактерії	Висококонцентрований миючий засіб, розроблений для одночасного ефективного очищення та дезінфекції всіх твердих поверхонь, включаючи ті, що використовуються в харчовій промисловості. Легко справляється з жиром, а також знищує широкий спектр мікроорганізмів, включаючи бактерії та оболонкові віруси, що робить його ідеальним для підтримки високих стандартів гігієни.	Засіб розробленим для ефективного використання на різноманітних матеріалах. Він безпечний для застосування на більшості поверхонь, що миються, включаючи керамічну плитку, ламінат, пластик, нержавіючу сталь та інші, забезпечуючи глибоке очищення без пошкодження покриття.	1,3 %	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2023 року за №1707. Дата внесення: 29.09.2023 року. Термін дії до: 29.09.2028 року	5 л коштує 1201 грн	[52,53]
---	---	---	---	--	-------	--	------------------------------	-------------

Продовження таблиці 5.1

«КВІКЦИ Д Д», (виробник ТОВ «ДАНА МЕДІКА Л», Україна)	2-пропанол – 70,0% ± 5,0; C12-14 Алкілдиметил бензил амоній хлорид 0,1% - 0,15	Гриби, віруси, бактерії	Засіб з широким спектром дії проти бактерій, вірусів та грибів. Засіб не потребує змивання, швидко висихає та часто містить зволожуючі компоненти для запобігання сухості шкіри, що робить його зручним для частого використання.	Призначений для широкого спектру застосувань на шкірі, включаючи гігієнічну та хірургічну антисептику рук медичного персоналу.	Готовий до застосування	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2023 року за №1363. Дата внесення: 27.07.2023 року. Термін дії до: 27.07.2028 року	250 мл коштує 133 грн	[54]
--	--	-------------------------------	--	---	----------------------------	--	-----------------------------	------

Закінчення таблиці 5.1

«Софта-Ман ISO/Softa-Ман ISO» (виробник Б. Браун Медікал АГ /B. Braun Medical AG, Швейцарія)	1-пропанол - 30,0 г; 2-пропанол -45 г	Гриби, віруси, бактерії	Готовий до застосування спиртовмісний антисептик для гігієнічної та хірургічної дезінфекції рук, який вирізняється швидкою дією та широким спектром антимікробної активності проти бактерій, мікобактерій, грибів та вірусів.	Завдяки відсутності барвників і ароматизаторів, а також вмісту гліцерину та пантенолу, засіб дбайливо впливає на шкіру рук, запобігаючи сухості та подразненням навіть при частому використанні, що робить його придатним для регулярного застосування.	Готовий до застосування	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2023 року за №1707. Дата внесення: 29.09.2023 року. Термін дії до: 23.09.2028 року	1 л коштує 433,50 грн	[55]
---	---------------------------------------	-------------------------	---	---	-------------------------	--	-----------------------	------

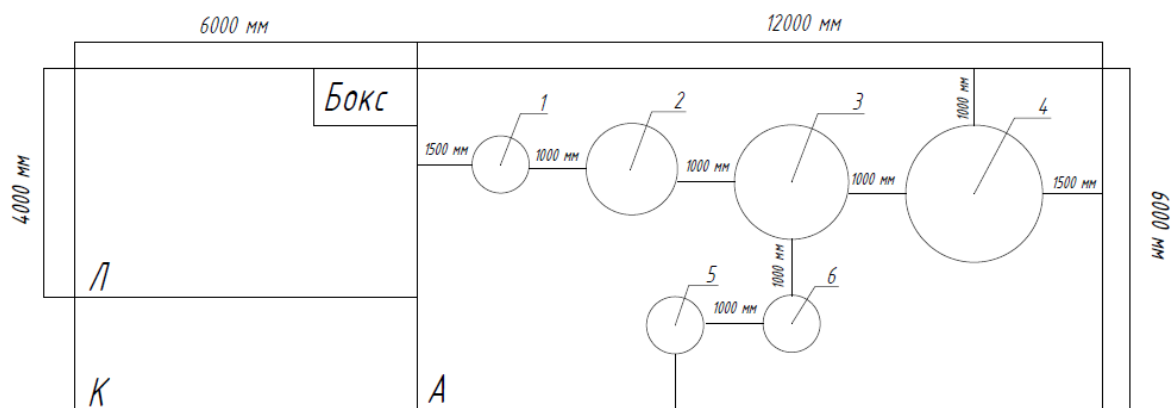
5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів

Процес отримання біомаси спеціалізованих винних дріжджів *S. cerevisiae* Lalvin T73, ключового елементу в якісному виноробстві, розгортається протягом 3 діб і передбачає ретельну підготовку комплексу обладнання. На початкових етапах використовуються інокулятори об'ємом 15 та 100 л для нарощування первинної культури. Подальше культивування до промислових масштабів відбувається у виробничому ферментері ємністю 1000 л, що створює ідеальні умови для росту дріжджів.

Важливу роль відіграють реактори-змішувачі, призначені для приготування та стерилізації поживного середовища, необхідного для активного розмноження дріжджових клітин, а також титрувальних розчинів, що використовуються для контролю рН та інших критичних параметрів процесу. Для забезпечення ефективного перемішування використовуються качалки. Усі маніпуляції з чистими культурами проводяться в спеціальних боксах, що мінімізують ризик контамінації. Крім того, для проведення контролю якості та науково-дослідних робіт залучається лабораторне устаткування.

Виробництво біомаси *S. cerevisiae* здійснюється у спеціально обладнаних приміщеннях. Основний етап біосинтезу здійснюється в цеху виробничого біосинтезу, який повністю обладнаний необхідними ферментерами та відповідними допоміжними системами. Лабораторне приміщення є центром для проведення різноманітних аналітичних та підготовчих операцій. Воно включає в себе автоклави для стерилізації, бокси для асептичних робіт, термостати для підтримання стабільних температур, холодильники для зберігання матеріалів та зразків, а також комплекс апаратури для здійснення всебічного контролю якості на кожному етапі виробництва. Цей багаторівневий підхід гарантує отримання високоякісної та життєздатної біомаси винних дріжджів *S. cerevisiae* Lalvin T73.

Зображення 5.1 демонструє орієнтовне планування виробничого приміщення для біомаси винних дріжджів *S. cerevisiae* Lalvin T73. На плані відображено габарити обладнання та дотримано мінімальну відстань в 1 м між апаратами та стінами.



На рисунку 5.1 представлено ескіз плану виробничого приміщення, призначеного для культивування *S. cerevisiae* Lalvin T73. Схема включає такі зони:

А – цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту:

1 – інокулятор об'ємом 15 л (ІН-13)

2 – інокулятор об'ємом 100 л (ІН-15)

3 – реактор-змішувач (Р-18) об'ємом 300 л для приготування композиції А

4 – ферментер об'ємом 1000 л (ФР-17)

5 – реактор-змішувач об'ємом 10 л (РЗ-11) для освітлення меляси

6 – центрифуга (Ц-12) для центрифугування розчину меляси

Л – мікробіологічна лабораторія

К – приміщення з качалками

Важливо підкреслити, що при проектуванні біотехнологічних виробництв, які передбачають використання великогабаритного ферментаційного обладнання з об'ємом реакторів 1 м³ і більше, необхідно неухильно дотримуватися чинних будівельних норм і стандартів. З огляду на це, при визначенні ширини виробничої будівлі було обрано найближче стандартне значення, що становить 18 метрів. Довжина споруди, для оптимізації будівельних процесів та мінімізації відходів

матеріалів, приймається кратною довжині стандартних будівельних плит, а саме – 6 метрів. Основні габаритні розміри технологічного обладнання, що розміщуватиметься в будівлі, детально представлені у *табл 5.2*.

Таблиця 5.2

Габаритні розміри основного обладнання для одержання біомаси винних дріжджів *S. cerevisiae* Lalvin T73

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Реактор-змішувач (РЗ-11) для освітлення меляси	10	0,63	0,7
Центрифуга (Ц-12) для центрифугування розчину меляси	-	0,25	0,97
Інокулятор (ІН-13)	15 л	1,02	0,75
Реактор-змішувач (РЗ-14) для приготування композиції А	10 л	0,63	0,7
Інокулятор (ІН-15)	100 л	0,70	1,5
Реактор-змішувач (РЗ-16) для приготування композиції А	50 л	2,3	2,5
Ферментер (ФР-17)	1000	0,9	3
Реактор-змішувач (РЗ-18) для приготування композиції А	500 л	0,7	1,4
Реактор-змішувач (РЗ-19) для приготування композиції Б	200 л	0,6	2,7
Всього	1885		

Сумарний об'єм реакторів-змішувачів та апаратів, призначених для підготовки посівного матеріалу та здійснення виробничого біосинтезу, становить 1695 л.

Для підтримання належного рівня чистоти у виробничих приміщеннях передбачено щоденне вологе прибирання підлоги, що становить 30 прибирань на місяць. Крім того, один раз на місяць проводиться генеральне прибирання, яке охоплює обробку стін, вікон, підлоги та інших поверхонь. Частота такого прибирання становить 1 раз на 30 днів.

З метою визначення необхідної кількості мийних та дезінфікуючих засобів потрібно розрахувати орієнтовну площу поверхонь, що підлягають обробці. Зазначена площа обчислюється, виходячи з площі підлоги виробничого приміщення та площі стін, беручи до уваги їхню висоту. Також, взято до уваги, що частина обладнання розташована на висоті над ферментером, оскільки деякі компоненти поживного середовища подаються самопливом.

Апаратурна схема виробництва вказує на наявність наступного обладнання, встановленого над ферментером на висоті 3,6 м:

- Реактор-змішувач (Р-14) для приготування композиції А
- Реактор-змішувач (Р-16) для приготування композиції А.
- Реактор-змішувач (Р-19) для приготування композиції Б.

Площа цеху біосинтезу складає 72 м^2 ($12 \text{ м} \times 6 \text{ м}$). Площа стін розраховується як периметр цеху, помножений на висоту, і становить $[(12 \times 6) + (6 \times 6)] \times 2 = 216 \text{ м}^2$. Таким чином, загальна площа поверхонь цеху (підлога + стіни) складає $(72 + 216 = 288) \text{ м}^2$.

Для визначення потреби в мийних засобах було розраховано загальну площу поверхонь виробничих приміщень, включаючи цех біосинтезу та вирощування інокуляту (72 м^2 підлоги та 216 м^2 стін, загалом 288 м^2), мікробіологічну лабораторію (24 м^2 підлоги та 120 м^2 стін, загалом 144 м^2), а також приміщення з качалками (12 м^2 підлоги та 96 м^2 стін, загалом 108 м^2), що дало сумарну площу підлоги 108 м^2 , площу стін 432 м^2 та загальну площу для обробки 540 м^2 .

Для забезпечення належної чистоти обладнання протягом трьох виробничих циклів отримання біомаси, проводиться миття перед початком кожного етапу, а також додаткове фінальне миття після завершення останнього циклу. Таким чином, загальна кількість миття становить 4. Для забезпечення чистоти обладнання протягом всього виробничого процесу знадобиться $1,695 \text{ м}^3$, а таких циклів буде чотири ($1,885 \times 4 = 7,54 \text{ м}^3$). Узагальнені дані щодо розрахованої площі, яка потребує миття та/або дезінфекції протягом усього періоду виробництва, представлені в наступній *табл. 2.3*

Таблиця 5.3

Розрахунок загальної площі миття оброблюваного об'єкту за весь період для одержання біомаси винних дріжджів *S. cerevisiae* Lalvin T73

Об'єкт обробки	Оброблювана площа (м ²) або об'єм (м ³)	Частота проведення миття та/або дезінфекції протягом усього циклу	Загальна площа (або об'єм) оброблюваної поверхні (об'єкта) для миття та/або дезінфекції протягом усього виробничого циклу, м ² (або м ³)
Обладнання	1,885	4	7,54
Підлога	108	30	3240
Стіни, двері, вікна	432	2	864

Для очищення ємнісного обладнання застосовуються СІР-мийки, при цьому об'єм робочого розчину становить 20-30% від об'єму обладнання. Приймаючи середнє значення витрати на рівні 25%, для дезінфекції й миття 6,78 м³ обладнання необхідно 1,695 м³ мийного засобу на рік ($7,54 \times 0,25 = 1,885$ м³). Інформацію щодо вибору конкретних мийних та дезінфікуючих засобів доцільно представити у вигляді узагальнюючої таблиці 2.4. При виборі цих засобів важливо враховувати їх ефективність, вартість, а також витрати, необхідні для обробки визначеної площі або об'єму. Зазвичай, для обробки 1 м² поверхні використовується 100 мл розчину мийного або дезінфікуючого засобу.

Таблиця 5.4

Узагальнена інформація щодо витрат мийних та дезінфікуючих засобів, необхідних для процесу отримання біомаси винних дріжджів *S. cerevisiae* Lalvin T73

Назва засобу (діюча речовина)	Об'єкт очищення	Робоча концентрація розчину, %	Сумарна площа (або об'єм), що підлягає миттю та/або дезінфекції, для даного об'єкта протягом всього виробничого циклу, м ²	Об'єм робочого розчину, використаний за весь період виробництва, л	Вартість одиниці мийного або дезінфекційного засобу (у перерахунку на 1 л або 1 кг), грн.	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Сумарна вартість миття та/або дезінфекції за весь час виробництва, грн
Helpix Sanity (час і луг)	Обладнання	10%	50,85	10884	32,5	3,25	35 373,0
Cif SafeGuard Professional Concentrate (час)	Обладнання	1,3%	50,85	10884	240,2	3,12	33 958,08

Закінчення таблиці 5.4

TASKI Sani 4 in 1 Plus (кислота)	Поверхні обладнання, приміщень	2%	6780	1885	536,0	10,72	20 207,2
Huwa-SanTR50 (бінарна сполука водню з киснем)	Поверхні обладнання, приміщень	4%	6780	1885	870,0	34,8	65 598,0
Біопагdez Ен (час і гуанідин)	Поверхні обладнання, приміщень	0,05-0,15%	6780	1885	589,0	0,88	1 658,8
Квікцид Д (спирт і час)	Для дезінфекція шкіри рук, а також рукавичок	100%	-	-	532	532	-
«Софта-Ман ISO/Softa-Man ISO (спирт)	Для дезінфекція шкіри рук, а також рукавичок	100%	-	-	433,50	433,50	-

Для категорії обладнання найкращим вибором є Heloix Sanity. Незважаючи на те, що Cif SafeGuard Professional Concentrate має меншу концентрацію (1,3% проти 10% у Heloix Sanity), його вартість за 1 кг/л робочого розчину значно вища (240,2 грн проти 32,5 грн). Це призводить до того, що загальна вартість дезінфекції за весь період виробництва для Cif SafeGuard Professional Concentrate (33 958,08 грн) майже така ж, як і для Heloix Sanity (35 373,0 грн), при цьому Heloix Sanity забезпечує вищу концентрацію активної речовини. Таким чином, Heloix Sanity є більш економічно вигідним та ефективним варіантом для дезінфекції обладнання.

Щодо категорії поверхні обладнання, приміщень, оберається Біогадез Ен та TASKI Sani 4 in 1 Plus. Біогадез Ен є найбільш економічно вигідним варіантом для поверхонь, оскільки його загальна вартість дезінфекції за весь період виробництва, значно менша, ніж у інших засобів у цій категорії. Це пояснюється дуже низькою вартістю 1 кг/л робочого розчину (0,88 грн). Хоча його концентрація (0,05-0,15%) є найнижчою, для регулярної дезінфекції поверхонь це може бути достатньо, забезпечуючи при цьому значну економію коштів.

TASKI Sani 4 in 1 Plus є другим вибором завдяки його ефективності та розумній ціні. Його вартість 1 кг/л робочого розчину (10,72 грн) є помірною порівняно з Nuwa-SanTR50 (34,8 грн), і загальна вартість дезінфекції (1 658,8 грн) також значно нижча, ніж у Nuwa-SanTR50 (65 598,0 грн). При цьому TASKI Sani 4 in 1 Plus має концентрацію 2%, що забезпечує належний рівень дезінфекції. Вибір двох засобів для цієї категорії дозволить комбінувати Біогадез Ен для щоденного використання та TASKI Sani 4 in 1 Plus для випадків, що вимагають більш інтенсивної дезінфекції або для ротації засобів, щоб уникнути звикання мікроорганізмів.

Позиції, що стосуються засобів для дезінфекції шкіри рук та рукавичок, обидва мають 100% концентрацію і схоже призначення. Перший засіб, "Квікцид Д (спірт і час)", має вартість 532 одиниці, тоді як другий, "Софта-Ман ISO Softea-Man ISO (спірт)", коштує 433,50 одиниці. Вибір на користь "Софта-Ман ISO Softea-Man ISO (спірт)" є більш обґрунтованим, оскільки він пропонує ідентичне призначення та

концентрацію, але при цьому є значно дешевшим, що дозволяє досягти необхідного рівня дезінфекції з меншими витратами.

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Згідно з розрахунками, проведеними в розділі 3, виробничий біосинтез дріжджів *S. cerevisiae* здійснюється у ферментаційній системі, що складається з основного ферментера об'ємом 1 м³ та каскаду інокуляторів об'ємом 100 л, 15 л і 5 качалочних колб. Така багатоступенева система дозволяє забезпечити поступове нарощування біомаси дріжджів та оптимізувати процес ферментації.

Для культивування інокуляту *S. cerevisiae* використовуються середовище такого складу (г/л):

Дріжджовий автолізат -10

Пептон - 20

Глюкоза - 20

Для виробничого біосинтезу *S. cerevisiae* використовується середовище такого складу (г/л):

М'яса - 86

(NH₄)₂SO₄ - 16

KH₂PO₄ - 3,5

MgSO₄ - 0,75

Розчин вітамінів - 10 (мл) [12]

Виробництво біомаси здійснюється в чотири етапи: підготовка посівного матеріалу в лабораторних колбах, його розмноження в посівних апаратах об'ємом 15 л і 100 л, та масштабне культивування в 1 м³ ферментаторі. Для кожного етапу використовується відповідне обладнання і методи стерилізації. Стерилізацію невеликих об'ємів середовища здійснюють в автоклаві, а великих - безпосередньо в апаратах. Для регулювання кислотності середовища використовують розчини ортофосфорної кислот та гідроксиду натрію, які готують у спеціальних реакторах. Кількість необхідних реагентів розраховують індивідуально для кожного етапу виробництва.

Для оптимізації приготування компонентів середовища та вибору відповідних місткостей (колб, реакторів) розраховується необхідна кількість компонентів для кожного етапу виробництва (табл. 2.1).

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

Обґрунтування підготовки та стерилізації підживлювального розчину сахарози

Концентрація сахарози у середовищі культивування *S. cerevisiae* для виробничого біосинтезу становить 160 г/л. Варто акцентувати увагу на тому що в середовищі знаходиться не чиста сахароза, а меляса, що складається на 70% з сахарози, відповідно необхідно внести $60/0.7=86$ г/л на початку культивування, $100/0.7 = 143$ г/л в вигляді підживлення, відповідно 160 г/л сахарози сумарно.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Для забезпечення оптимального росту дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, враховуючи необхідність вмісту 15% Нітрогену в біомасі при її концентрації 22,4 г/л, задана концентрація згідно статті сульфату амонію 7,5 г/л є недостатньою. З огляду на те, що чистого Нітрогену в біомасі має бути $22,4 \text{ г/л} \times 0,15 = 3,36 \text{ г/л}$, і знаючи, що сульфат амонію $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ містить приблизно 21,21% Нітрогену (оскільки молярна маса Нітрогену становить 14 г/моль, а молярна маса сульфату амонію — 132 г/моль, то $(2 \times 14)/132 \approx 0,2121$), для досягнення потрібної концентрації Нітрогену необхідно додати 15,84 г/л сульфату амонію ($3,36 \text{ г/л} / 0,2121 \approx 15,84 \text{ г/л}$). Таким чином, рекомендована концентрація сульфату амонію в середовищі становить близько 16 г/л.

Для культивування *S. cerevisiae* на стадії підготовки інокуляту використовується поживне середовище, яке можна стерилізувати одразу в одному апараті завдяки тому що всі компоненти термолабільні, тому ділення на композиції не необхідні. Для корекції рН поживного середовища та проведення титрування готуються 6% розчини ортофосфорної кислоти та гідроксиду натрію. Кількість реагентів, необхідних для кожної стадії виробництва середовища, розраховується індивідуально і наведена в таблиці 5.9.1. та 5.9.2.

Таблиця 5.5

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колба

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 629 мл середовища, г	Об'єм композиції V, мл
Дріжджовий автолізат	10	6,29 г	629 мл
Пептон	20	12,58 г	
Глюкоза	20	12,58 г	
Вода	629 мл		

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

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 15 л

Для забезпечення етапу виробництва використовується 5,67 л поживного середовища, склад якого детально описаний у пункті 5.4. Переміщування поживного середовища відбувається – у реакторі-змішувачі, стерилізація проходить без посередньо в інокуляторі. Кількість компонентів для інокулятора 15 л наведено в таблиці 5.6

Таблиця 5.6

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,67 л середовища, г	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий автолізат	10	56,7 г	5,67
Пептон	20	113,4 г	
Глюкоза	20	113,4 г	
Вода	4,5		
Конденсат	0,5		

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

Для забезпечення етапу виробництва використовується 51,48 л поживного середовища, склад якого детально описаний у пункті 5.4. Переміщування поживного середовища відбувається – у реакторі-змішувачі, стерилізація проходить без посередньо в інокуляторі. Кількість компонентів для інокулятора 100 л наведено в таблиці 5.7

Таблиця 5.7

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 51,48 л середовища, г	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий автолізат	10	514,8 г	51,48
Пептон	20	1,0 кг	
Глюкоза	20	1,0 кг	
Вода	40,5		
Конденсат	4,5		

5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³

Для забезпечення етапу виробництва використовується 466 л поживного середовища, склад якого детально описаний у пункті 5.4. Освітлення і відділення осаду меляси відбувається у збірнику та центрифугі. Переміщення поживного середовища відбувається у спеціалізованому обладнанні: реакторі-змішувачі. Кількість компонентів для ферментера 1 м³ наведено в таблиці 5.8

Таблиця 5.8

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 466 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції V, л
Меляса	172 (мл)	80,15 (л)	А	250
Розчин вітамінів	10 (мл)	4,66 (л)		
Вода	329,4 л			
Конденсат	36,6 л			
(NH ₄) ₂ SO ₄	16	7,46 кг	Б	150
KH ₂ PO ₄	3,5	1,63		
MgSO ₄	0,75	0,35		
Вода	90 л			
Конденсат	10 л			

Приготування розчину вітамінів

Компонент поживного середовища	Вміст, мг/л	Кількість для приготування 4,66 л середовища, мг	Об'єм композиції V, л
D-біотин	0,5	2,33	4,66
Кальцію пантотенат	1	4,66	
Тіаміну гідрохлорид	1	4,66	
Вода	3,78		
Конденсат	0,42		

5.4.4 Обґрунтування вибору розчинів для регуляції pH

Під час бродіння вина дріжджі *S. cerevisiae* активно змінюють кислотність сусла. Цей процес зумовлений різноманітними біохімічними реакціями [15]: споживанням цукрів, синтезом органічних кислот (наприклад, янтарної та молочної), виділенням аміаку та взаємодією продуктів метаболізму з іншими компонентами сусла. Кожен з цих процесів має свій внесок у зміну pH і впливає на кінцеву біомасу.

Для точного контролю pH використовується розчин лугу 6% гідроксиду натрію (NaOH) і кислоти 42,5% ортофосфорна кислота (H₃PO₄) [12,13,14].

Таблиця 5.9.1

Розрахунок кількості NaOH для підготовки рН

Об'єм середовища, л	NaOH (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування
466 л	932	колба на 2 л

Таблиця 5.9.2

Розрахунок кількості H_3PO_4 для підготовки рН

Об'єм середовища, л	H_3PO_4 (42,5%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування
95,34 л	191	колба на 500 мл

Поживне середовище, збагачене пептонами, сприяє активному росту мікроорганізмів. Однак, інтенсивна аерація, необхідна для забезпечення аеробних процесів, призводить до утворення стійкої піни. Пептони, як складні білкові гідролізати, сприяють піноутворенню завдяки своїй поверхнево-активній дії. В таких умовах для ефективного проведення біотехнологічних процесів у таких умовах необхідно застосовувати піногасники.

Механічний піногасник, розташований у верхній частині ферментера, є одним з найкращих методів боротьби з піною. Принцип його роботи полягає в руйнуванні пінових бульбашок за допомогою обертових лопатей мішалки. Також, у ферментері застосовується простерилізований піногасник Antifoam 204 на основі поліетерів [17]. Датчики, встановлені на ферментері, контролюють рівень піноутворення та автоматично вмикають мішалку або додають піногасник при досягненні критичного значення [15,16] .

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробництва *S. cerevisiae*

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрозабірник	1	Назва: Шахта вентиляційна Виробник: Україна. Характеристика: діаметр: 630 мм; довжина: 120 см; товщина стінок: 30 мм; матеріал: АБС-пластик, наповнений пінополіуретаном [68]
Ф– 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Назва: Фільтр грубої очистки повітря (панельний) Виробник: "ВЕНТ-ФІЛЬТР", Україна. Характеристика: фільтруючий матеріал: пінополіуретан; габарити: 592*592*292 мм; продуктивність: 3400 м³/год; Е= 90 [69]

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.45 КР ПЗ</i>				
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ				
Розробив	Горбатенко Є, А								
Перевірів	Белесмець Т. О.								
Реценз.									
Н. Контр.									
Зав. каф.	Стабніков В.П.				Літера Аркуш Аркуші Кафедра БТМ				
							65	109	

К – 3	Компресор	1	Назва: Турбокомпресор Виробник: "ТОВ Далгакиран", Україна. Характеристика: продуктивність: 8200 м³/год; потужність: 750 кВт; тиск: 2 бар; габарити: 4600*2250*2000 мм [70]
Т – 4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Назва: Рефрижераторний осушувач стисненого повітря Dalgakiran DryAir серії DK Виробник: "ТОВ Далгакиран", Україна. Характеристика: габарити: 423*393*567 мм; продуктивність: 0,35 м³/хв; тиск: 16 бар [71]
Р – 5	Ресивер	1	Назва: Ресивер Повітряний. Виробник: "Тиск", Україна. Характеристика: Об'єм: 2700 л; тиск: 10 бар [72]
Т – 6	Теплообмінник-нагрівач	1	Назва: Круглий каналний водяний нагрівач. Виробник: "Salda", Литва. Характеристика: габарити: 258*190*333 мм; температура повітря: з -25 °С до 52°С; повітряний потік: 60 м³/год; падіння тиску (повітря): 13 Па; потужність: 1,54 кВт [73]
Ф – 7	Фільтр тонкої очистки	1	Назва: Касетний фільтр для вентиляції Виробник: "ВЕНТ-ФІЛЬТР", Україна Характеристика: Фільтруючий матеріал: поліестер; габарити: 287*287*600 мм; E= 95 [74]
ІФ-8 ІФ-9 ІФ-10	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Назва: HEPA фільтр Виробник: "ВЕНТ-ФІЛЬТР", Україна Характеристика: Фільтруючий матеріал: водовідштовхувальне та вологостійке скловолокно; габарити: 305x610x300; E= 99,999 % [75]

РЗ-11	Реактор - змішувач	1	Назва: Реактор-змішувач 10 л Виробник: "АТО", Китай. Характеристика: Температура: -80 до 200°C; обертання мішалкою: 0-1000 об/хв; з рубашкою; датчики температури рН; габарити: 1280*630*700 мм [76]
Ц-12	Центрифуга	1	Назва: Центрифуга Виробник: "ANDRITZ Separation GmbH", Німеччина Характеристика: середній розмір частинок: 100 - 10 000 μm; Продуктивність по твердій фазі: До 150 тонн на годину (т/год); діаметр ротора (корзини): 250 - 1250 мм [77]
ІН-13	Інокулятор	1	Назва: Ферментери (біореактор) на 15 л Виробник: " Biostat®Cplus", Україна. Характеристика: Матеріал робочої зони: нержавіюча сталь AISI 316L, EPDM, боросилікатне скло; зовнішній – нержавіюча сталь AISI 304.; обертання мішалкою: 20-1000 об/хв; температура: 0-150°C; з рубашкою; датчики температури рН, розчиненого кисню, рівня піни і культуральної рідини; барботер; стерильні фільтри; охолоджувач вихідного відпрацьованого газу; габаритні розміри, мм: 1900 x 1020 x 750 [78]

Продовження таблиці 6.1

РЗ-14	Реактор - змішувач	1	Назва: Реактор-змішувач 10 л Виробник: "АТО", Китай. Характеристика: Температура: -80 до 200°C; обертання мішалкою: 0-1000 об/хв; з рубашкою; датчики температури рН; габарити: 1280*630*700 мм [79]
ІН-15	Інокулятор	1	Назва: Ферментери (біореактор) на 100 л Виробник: Україна. Характеристика: Матеріал робочої зони: нержавіюча сталь AISI 316L, зовнішній – нержавіюча сталь AISI 304. лопатева мішалкою; температура: до 120°C; габарити: 700*700*1500 [80]
РЗ-16	Реактор - змішувач	1	Назва: Реактор-змішувач 50 л Виробник: "Alibaba", Китай Температура: до 200°C; обертання мішалкою: 0-1000 об/хв; з рубашкою; датчики температури рН; габарити: 230X230X250 см [81]
ФР-17	Ферментер	1	Назва: Ферментер 1м³ Виробник: , Китай. Характеристика: Матеріал робочої зони: нержавіюча сталь AISI 316L та AISI 304; обертання мішалкою: 10-600 об/хв; температура: 0 до 150°C; з рубашкою; датчики температури рН, розчиненого кисню, рівня піни і культуральної рідини; барботер [82]

Закінчення таблиці 6.1

РЗ-18	Реактор - змішувач	1	Назва: Реактор-змішувач 500 л Виробник: "АЛІБАБА", Китай. Характеристика: Температура: -80 до 200°C; обертання мішалкою: 0-1000 об/хв; з рубашкою; датчики температури рН; габарити: 700*700*1400 см [83]
РЗ-19	Реактор - змішувач	1	Назва: Реактор-змішувач 200 л Виробник: Китай. Характеристика: Температура: -80 до 200°C; обертання мішалкою: 0-1000 об/хв; з рубашкою; датчики температури рН; габарити: 600*2700 мм [84]
НВ-20 НВ-21 НВ-22	Насос відцентровий	3	Назва: Насос відцентровий Виробник: "SAER", Італія. Характеристика: Потужністю 1,5 кВт; продуктивністю 166,7 літрів за хвилину (або 10 кубічних метрів за годину); довжина кабелю 0,5 метра [86]
ОВД-23	Дозатор	1	Назва: Дозатор об'ємний Виробник: "Козак", Україна Характеристика: 3 нержавіючої сталі; діапазоном зважування 10-5000 г з точністю 2 г; продуктивністю 3-10 зважувань/хв; об'ємом бункера 55 л; працюють при температурі 10-40°C; споживають 0,2 кВт при напрузі 220 В/50 Гц; габарити 680х400х1300 мм [87]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1 Забір атмосферного повітря.

З атмосфери, на висоті 8-10 метрів, за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1) здійснюється відбір повітря.

ДР 1.2 Очищення повітря від пилу та механічних часток.

Великі частинки пилу та бруду затримуються спеціальними фільтрами (ФГО-2), з ефективність очищення $E=90$ під час очищення повітря.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Турбокомпресор (К-3) стискає повітря до 15 бар, нагріваючи його до 200°C , а автоматична система підтримує стабільний тиск, враховуючи опір повітряної системи.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Повітря, що пройшло через компресор і нагрілося, направляється в теплообмінник (ТО-4), де його температура знижується до 5°C . Після цього, в ресивері (Р-5), повітря зневоднюється, в результаті чого вологість знижується до 60-70% і стабілізується на цьому рівні.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Проходячи через теплообмінник (ТН-6), повітря нагрівається до комфортної температури $30-37^{\circ}\text{C}$, одночасно збільшуючи свою вологість приблизно до 50%.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря очищається двоступеневою системою фільтрації. На першому ступені воно проходить через високоточний фільтр (Ф-7), ефективно затримуючи дрібні частинки пилу, пилку та інших забруднень. Цей синтетичний фільтр забезпечує 95% очищення повітря від механічних домішок.

					НУХТ БТЕК 04.01.45 КР ПЗ								
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ				Літера	Аркуш	Аркушів		
Розробив		Горбатенко Є. А										70	109
Перевірів		Белесмець Т. О.											
Реценз.													
Н. Контр.													
Зав. каф.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ								

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Завершальну стадію очищення повітря здійснюють індивідуальні фільтри (ІФ-8, 9, 10), які ретельно відфільтровують до 99,999% всіх забруднень.

ДР 2. Приготування титрувальних розчинів

ДР 2.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH

ДР 2.1.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у ферментері 1 м³

Для приготування поживного середовища об'ємом 466 л необхідно підготувати невелику кількість лужного розчину. Для цього потрібно приготувати 932 мл 6% розчину гідроксиду натрію. Зважують 27,96 г їдкого натру на технічних вагах та перенести у колбу місткістю 3 л. До зваженого натру додають 932 мл дистильованої води і ретельно перемішати до повного розчинення. Отриманий розчин закривають стерилізувати при температурі 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв. Як тільки розчин простерилізовано, він готовий до використання в ферментері (ФР-21).

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 42,5%-го розчину H₃PO₄

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 42,5%-го розчину H₃PO₄ для пікислення солей

Для приготування поживного середовища об'ємом 466 л необхідно підготувати невелику кількість кислотного розчину. Для цього береться 932 л 42,5% розчину ортофосфатної кислоти. Мірним циліндром на 1 л відбирати 466 мл ортофосфатної кислоти концентрованої (85%) і перенести у колбу місткістю 3 л. До кислоти додати 932 мл дистильованої води і ретельно перемішати до повного розчинення.

ДР 3. Підготовка та стерилізація піногасника

ДР 3.1. Підготовка та стерилізація піногасника для виробничого біосинтезу у ферментері 1 м³

Для приготування 0,05% розчину піногасника 204 Sigma необхідно відміряти 0,5 мл піногасника, додати його до 999,5 мл дистильованої води, ретельно перемішати до повного розчинення. Отриманий розчин перенести в колбу на 2 л та стерилізувати в автоклаві при температурі 121°C протягом 15-20 хв. Як тільки розчин простерилізовано він готовий до використання в ферментері (ФР-21).

ДР 4. Підготовка меляси

ДР 4.1 Освітлення меляси

У реактор-змішувач (Р-11) на 10 л через дозатор (ОВД-23) внести 229 г меляси, додати 458 мл питної води (включно з 10 % конденсату, що утворюється при стерилізації). Нагріти суміш до 40 °С, подаючи глуху пару в сорочку апарата. Увімкнути мішалку на 200 об/хв до повного розчинення меляси. Потім додати 4,58 л 1 н розчину сульфатної кислоти, щоб досягти рН 4,0 (приблизно 1 мл 1 н розчину сульфатної кислоти на 100 мл меляси). Знову увімкнути мішалку на 200 об/хв на 30–40 хв. Після цього суміш розчину меляси та осаду сульфату кальцію передати на центрифугу.

ДР 4.2. Центрифугування розчину меляси

За допомогою центрифуги (Ц-14) (зі швидкістю 3000 об/хв протягом 20 хв) видаляти осад з розчину меляси, який потім утилізувати. Освітлений розчин меляси транспортувати відцентровим насосом (НВ-20) до реактора-змішувача (Р-15) для подальшої стерилізації.

ДР 5. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Для приготування 629 мл поживного середовища використовуємо 629 мл води. Точні кількості компонентів наведено в таблиці 2.1 (розділ 2).

Для приготування поживного середовища зважити на технічних вага пептон 12,58 г, дріжджовий екстракт 6,29 г, глюкозу 12,58 г. Компоненти ретельно змішати у колбі на 3 л, додати 629 мл води. Отриманий розчин стерилізувати в автоклаві при температурі 112°С та тиску 0,05 МПа протягом 30 хвилин.

ДР 5.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 15 л

Для приготування 5,67 л поживного середовища використовуємо 5,1 л води. Точні кількості компонентів наведено в таблиці 2.2 (розділ 2).

Для приготування поживного середовища зважити на технічних вагах пептон 113,4 г, дріжджовий екстракт 56,7 г, глюкозу 113,4 г. Компоненти ретельно змішати

у збірник-змішувачі на 10 л (33-18), додаючи 4,5 л води. Отриманий розчин стерилізувати при температурі 112 °С та тиску 0,05 МПа протягом 30 хвилин в інокулятор (ІН-22).

ДР 5.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 100 л

Для приготування 51,48 л поживного середовища використовуємо 46,3 л води. Точні кількості компонентів наведено в таблиці 2.3 (розділ 2).

Для приготування поживного середовища зважити на технічних вагах пептон 514,8 г, дріжджовий екстракт 1,0 кг, глюкозу 1,0 кг. Компоненти ретельно змішати у збірник-змішувачі на 70 л (33-20), додаючи 40,5 л води. Отриманий розчин стерилізувати при температурі 112 °С та тиску 0,05 МПа протягом 30 хвилин в інокулятор (ІН-24).

ДР 5.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу об'ємом 1 м³

Для приготування 513 л поживного середовища використовуємо 461,7 л води. Точні кількості компонентів наведено в таблиці 2.5 (розділ 2).

ДР 5.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Розчин сахарози 160 г/л та вітамінів, стерилізувати гострою парою в збірнику (Р-15) об'ємом 500 л при температурі 112 °С та тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв. Стерильний розчин меляси подавати порціями за допомогою відцентрового насоса (НВ-21) в ферментер (ФР-26) до ТП 7.1.

ДР 5.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Для приготування поживного середовища зважити за допомогою дозатора (Д-19) 7,46 кг (NH₄)₂SO₄, 1,63 кг КН₂РО₄, 0,35 кг MgSO₄, розчиняють у 76,5 л води в збірнику-змішувачі (33-8) 200 л та одночасно подати ортофосфатну кислоту (згідно ДР 2.2.1) стерилізувати при температурі 121 °С та тиску 0,1 МПа протягом 30 хвилин в ферментері (ФР-26).

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Дріжджову культуру *S. cerevisiae* Lalvin T73 зберігати у пробірках з скошеним суцло агаром (СА) при температурі від 2 до 4°C. Для підтримання життєздатності культури її регулярно пересівати на свіже середовище кожні 1-2 місяці. Усі маніпуляції з культурою проводити у стерильних умовах, щоб запобігти забрудненню сторонніми мікроорганізмами.

ТП 6.2. Одержання робочої культури

Для отримання колоній культури *S. cerevisiae* Lalvin T73 її розсівати на чашки з СА агаром. Потім інкубувати у термостаті протягом 24 годин при температурі 30 С.

ТП 6.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах

Із чашок Петрі (з ТП 5.2), на яких вирости окремі колонії дріжджів *S. cerevisiae* Lalvin T73, стерильною петлею відбирати по одній колонії. Кожну відібрану колонію перенести в окрему пробірку з рідким поживним середовищем СА. При цьому важливо забезпечити достатню відстань між місцями внесення різних колоній не менше 1 см, щоб уникнути їхнього змішування. Пробірки з посіяними дріжджами інкубувати при температурі 30°C протягом 24 годин. Мікробіологічний контроль проводиться шляхом відбору проб з кожної пробірки кожні 4 години.

ТП 6.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Стерильну суміш компонентів А (з ДР 5.1.) розподілити по колбах для струшування. До кожної колби додали по 1 мл суспензії дріжджів *S. cerevisiae* Lalvin T73 (з ТП 6.3). Культивування проводити при 30 °С протягом 10 годин. Мікробіологічний контроль проводиться шляхом відбору проб з кожної пробірки кожні 4 години.

ТП 6.5. Вирощування в інокуляторі об'ємом 15 л

До інокулятора (ІН-22) додати стерильну композицію А (з ДР 5.2.) від збірника-змішувача (ЗЗ-18). Далі, через засівну колбу внести посівний матеріал (підготовлений відповідно до ТП 6.4). Культивування здійснити при температурі 30°C протягом 72 годин. Мікробіологічний контроль проводиться шляхом відбору проб з кожної пробірки кожні 4 години.

ТП 6.6. Вирощування в інокуляторі об'ємом 100 л

До інокулятора (ІН-24) додати стерильну композицію А (згідно з документацією ДР 5.3) від збірник-зміщувача (ЗЗ-20). Потім, через трубку для перетискування, внести посівний матеріал (з ТП 6.5). Культивування проводити при температурі 30°C протягом 72 годин. Мікробіологічний контроль проводиться шляхом відбору проб з кожної пробірки кожні 4 години.

ТП 7. Виробничий біосинтез

ТП 7.1. Виробничий біосинтез (отримання культуральної рідини)

У стерильний ферментер об'ємом 1 м³ через спеціальну трубу вносити посівний матеріал композицію А (з ДР 5.4.1), Б (з ДР 5.4.2 від реактора-зміщувача (РЗ-15) та збірника-зміщувача (ЗЗ-8), підготовлений відповідно до ТП 5.6. Одночасно, подавати гідроксид натрію (з ДР 2.1.1), щоб довести кислотність середовища до значення рН температурі 30 °С. Мікробіологічний контроль проводиться шляхом відбору проб з кожної пробірки кожні 4 години.

РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

8.1. Методика виділення та очищення біомаси *S. cerevisiae* Lalvin T73

Методика виділення та очищення біомаси дріжджів *S. cerevisiae* базується на застосуванні відцентрифугування та послідовних промивань. Першим та ключовим етапом процесу є ефективне відділення клітин від початкового рідкого культурального середовища. У даному конкретному випадку таким середовищем виступала меляса.

Для досягнення швидкого та ефективного відділення клітин *S. cerevisiae* від меляси був використаний метод центрифугування. Цей метод є стандартизованим підходом у мікробіології та біотехнології для концентрування клітинних суспензій. Принцип дії полягає у створенні сильного відцентрового поля, яке багаторазово перевищує силу тяжіння, змушуючи частинки з більшою щільністю (у даному випадку дріжджові клітини) швидко осідати [52,53,12].

В процесі культуральну суспензію, що містила клітини *S. cerevisiae* та мелясу, піддавали центрифугуванню. Швидкість обертання центрифуги була встановлена на рівні 4000 об/хв. Така швидкість є достатньою для генерації відцентрової сили, здатної ефективно відділити дріжджові клітини від рідкої фази протягом відносно короткого проміжку часу.

В результаті застосування відцентрової сили дріжджові клітини, які мають вищу щільність порівняно з культуральним середовищем, осідали на дно центрифужної ємності. Це призводило до утворення щільного осаду, який представляв собою концентровану дріжджову біомасу, тоді як прозора або менш мутна рідина (супернатант), що складалася з залишків меляси та розчинених компонентів, залишалася над осадом.

					НУХТ БТЕК 04.01.45 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літера	Аркуш	Аркушів	
Розробив		Горбатенко Є, А							
Перевірів		Белесмець Т. О.					76	109	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Зав. каф.		Стабніков В.П.							

Після успішного відділення осаду клітин від культуральної рідини, отриману дріжджову біомасу піддавали процедурі очищення. Цей етап є надзвичайно важливим для видалення залишків поживного середовища, які могли б негативно вплинути на подальші процеси, такі як зберігання, аналіз або специфічні застосування. Залишки меляси, наприклад, можуть містити цукри, мінеральні солі та інші сполуки, які можуть сприяти небажаним реакціям або деградації під час зберігання.

Процес очищення полягав у багаторазовому промиванні дріжджового осаду. Осад ресуспендували, тобто знову переводили у стан суспензії, використовуючи стерильну дистильовану воду. Використання стерильної води є важливим для запобігання контамінації біомаси сторонніми мікроорганізмами. Дистильована вода забезпечує відсутність іонів, які могли б взаємодіяти з клітинами або залишками середовища.

Процедуру промивання та подальшого центрифугування для повторного осадження клітин повторювали кілька разів. Кожне промивання сприяло подальшому видаленню залишків меляси та інших компонентів середовища, які були присутні після первинного відділення. Повторення цієї операції забезпечувало досягнення високого ступеня чистоти дріжджової біомаси.

Таким чином, комбінація ефективного центрифугування для концентрування клітин та багаторазового промивання стерильною дистильованою водою дозволила отримати очищену пасту дріжджової біомаси *S. cerevisiae*. Ця паста представляє собою висококонцентровану масу дріжджових клітин, мінімально забруднену компонентами початкового культурального середовища, що робить її придатною для подальших етапів обробки, зокрема, підготовки до тривалого зберігання шляхом зневоднення [12].

8.2. Підготовка виділеної біомаси до зберігання: процес зневоднення (сушіння)

Після успішного виділення та очищення дріжджової біомаси *S. cerevisiae* у вигляді пасти, що містить значну кількість вологи, виникає необхідність її підготовки до тривалого зберігання. Високий вміст води у клітинній масі сприяє підтриманню метаболічної активності та створює сприятливі умови для розвитку контамінантів, що

може призвести до швидкої втрати життєздатності клітин та деградації продукту [12,54].

Для забезпечення стабільності біомаси протягом тривалого періоду та збереження її життєздатності застосовують процес зневоднення, або сушіння. Сушіння дозволяє зменшити вміст вологи до рівня, за якого метаболічні процеси у клітинах практично припиняються, а ризик мікробного псування значно знижується. Отриманий в результаті сухий продукт є набагато більш стабільним і зручним для зберігання та транспортування [12,55].

У процесі зневоднення біомаси *S. cerevisiae* використовувалася настільна сушарка з псевдозрідженим шаром виробництва Sherwood Scientific (Кембридж, Велика Британія). Сушарки цього типу ефективно використовуються для сушіння дисперсних матеріалів, оскільки вони забезпечують інтенсивний контакт між частинками матеріалу та сушильним агентом (зазвичай гарячим повітрям), що призводить до швидкого та рівномірного видалення вологи.

Перед завантаженням очищеної пасти дріжджової біомаси у сушарку проводили її попередню підготовку. Пасту формували у вигляді тонкої локшини. Цей етап підготовки є важливим для оптимізації процесу сушіння. Формування у вигляді тонких структур значно збільшує площу поверхні біомаси, яка контактує з потоком сушильного повітря.

Збільшена площа поверхні сприяє більш ефективному та швидкому випаровуванню вологи з клітинної маси. Волога може легше дифундувати від внутрішніх шарів "локшини" до її поверхні, де вона підхоплюється потоком сушильного агента. Таким чином, попередня підготовка біомаси у вигляді локшини забезпечує рівномірніше та інтенсивніше сушіння, запобігаючи утворенню сухих кірок на поверхні, які можуть перешкоджати виходу вологи з внутрішніх шарів.

Безпосередньо процес зневоднення здійснювався шляхом пропускання потоку повітря через шар підготовленої дріжджової біомаси. Об'ємна швидкість подачі повітря становила 2,5 м³/хв. Цей потік повітря виконував функцію сушильного агента, забираючи випаровану вологу з поверхні біомаси та підтримуючи процес

псевдозрідження, що забезпечує інтенсивне перемішування частинок та рівномірний доступ повітря до кожної з них.

Температура повітря, що подавалося у сушарку, підтримувалася на рівні 37°C. Вибір температури сушіння є критичним параметром, оскільки він впливає на швидкість випаровування вологи та водночас на життєздатність клітин. Температура 37°C є відносно помірною для дріжджів *S. cerevisiae*, дозволяючи ефективно видаляти вологу без спричинення значного теплового стресу, який міг би призвести до загибелі клітин або пошкодження їх структур.

Тривалість процесу сушіння для біомаси *S. cerevisiae* становила 50 хвилин. Цей часовий інтервал був емпірично визначений як оптимальний для досягнення цільового рівня вологості. Емпіричний підхід означає, що час сушіння був встановлений на основі експериментальних даних, спрямованих на оптимізацію процесу з точки зору ефективності видалення вологи та збереження життєздатності клітин.

Контроль за завершенням процесу сушіння та досягненням необхідного рівня вологості здійснювався шляхом моніторингу втрати ваги біомаси протягом процесу. Випаровування вологи призводить до зменшення загальної маси зразка. Процес вважався завершеним, коли була досягнута залишкова вологість біомаси на рівні 8%. Цей показник є критично важливим, оскільки досягнення низького рівня вологості (8% у даному випадку) є необхідною умовою для забезпечення довготривалої стабільності та максимального збереження життєздатності сухої дріжджової біомаси *S. cerevisiae* під час подальшого зберігання [12,56].

8.3. Зберігання сухої дріжджової біомаси

Після успішного завершення процесу зневоднення та досягнення цільового рівня залишкової вологості, суха дріжджова біомаса *S. cerevisiae* стає готовою до тривалого зберігання. Метою зберігання є максимальне збереження життєздатності дріжджових клітин та їх функціональної активності протягом певного періоду часу до моменту їх використання. На відміну від вологої біомаси, сухий продукт є значно більш стабільним, але умови зберігання все одно мають вирішальне значення.

Оптимальні умови зберігання сухої біомаси визначаються необхідністю мінімізації деградаційних процесів, які можуть відбуватися навіть за низького вмісту вологи. До таких процесів можуть належати окиснення клітинних компонентів, неферментативне потемніння (реакції Маяра) або повільна втрата функціональності біомолекул. Інтенсивність цих процесів значною мірою залежить від температури [56].

Оптимальною температурою для зберігання сухої біомаси *S. cerevisiae* з метою максимального збереження життєздатності клітин було обрано 4°C. Зберігання при зниженій температурі є стандартною практикою для збереження біологічних зразків та продуктів, оскільки низька температура значно уповільнює швидкість хімічних та біохімічних реакцій.

Зниження температури зберігання до 4°C дозволяє ефективно мінімізувати метаболічну активність дріжджових клітин, які перебувають у стані анабіозу через низький вміст вологи. Хоча у сухому стані метаболізм клітин практично зупинений, певна мінімальна активність або автолітичні процеси все ще можуть відбуватися. Низька температура обмежує ці процеси до мінімуму.

Крім того, низька температура зберігання допомагає запобігти деградації основних компонентів клітин, а саме білків, нуклеїнових кислот та ліпідів, які можуть пошкоджуватися з часом під впливом факторів навколишнього середовища або залишкової ферментативної активності. Стабільність цих молекул є критичною для збереження цілісності клітин та їх здатності відновити активність при регідратації.

Таким чином, зберігання сухої дріжджової біомаси при температурі 4°C забезпечує створення умов, несприятливих для розвитку мікроорганізмів-контамінантів (якщо такі випадково потрапили в продукт), а також істотно уповільнює процеси старіння та деградації самих дріжджових клітин. Це дозволяє зберегти високий відсоток життєздатних клітин протягом значного періоду часу [12,56].

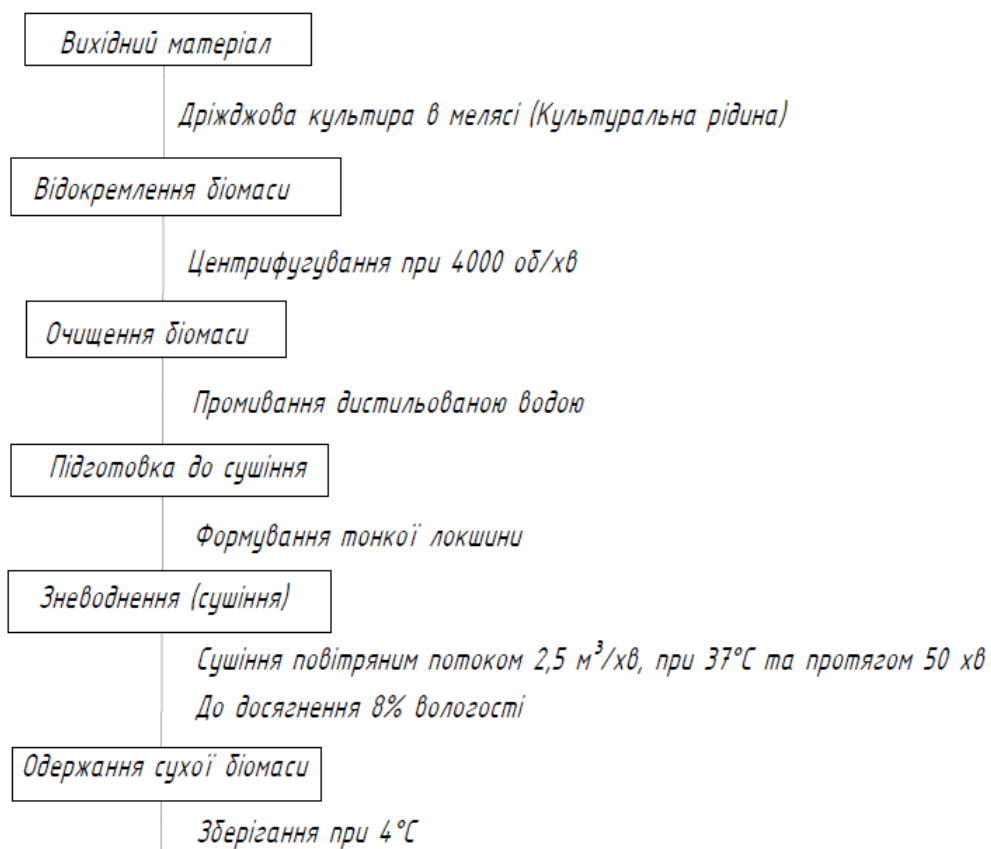


Рис. 3.1. Етапи виділення та підготовки біомаси *S. cerevisiae*

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Мікробіологічний контроль

9.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Для проведення контролю, 0,1 об'єму проби розподілити по поверхні поживного середовища. Для цього використовувати шпатель Дригальського, попередньо простерилізований в полум'ї. Після посіву чашки Петрі загортати у папір, перевертають догори дном і поміщати в термостат. Інкубація проводити при температурі 30°C протягом 1-2 діб. Всі маніпуляції, від стерилізації чашок до посіву проби, необхідно виконувати в стерильних умовах, щоб запобігти зовнішньому забрудненню. Це забезпечує точність і надійність контролю стерильності.

Після завершення періоду інкубації, посіви візуально оглядати. Якщо на поверхні поживного середовища відсутні будь-які колонії мікроорганізмів, це свідчить про те, що поживне середовище можна вважати стерильним. Наявність росту мікроорганізмів, навіть у невеликій кількості, вказує на контамінацію та необхідність повторної стерилізації або використання нового середовища. Варто зауважити, що контроль проводиться в асептичних умовах [62,63,64].

9.1.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури

Для забезпечення високої якості дріжджів *S. cerevisiae* та запобігання контамінації сторонніми мікроорганізмами проводиться двохетапний мікробіологічний контроль чистоти культури.

На першому етапі контролю культуру *S. cerevisiae* висівають на чашки Петрі з сусло-агаром. Висів здійснюється бактеріальною петлею методом виснажувального штриха, що дозволяє отримати ізольовані колонії. Після посіву чашки інкубують у термостаті при температурі 30°C протягом 1-2 діб.

					НУХТ БТЕК 04.01.45 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробив		Горбатенко Є. А			РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА		
Перевірів		Белесмець Т. О.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Зав. каф.		Стабніков В.П.					
					Літера	Аркуш	Аркуші
						82	109
					Кафедра БТМ		

Після інкубації проводиться візуальний аналіз вирослих колоній. Чиста культура *S. cerevisiae* формує колонії, що характеризуються однорідністю за розміром, формою, кольором та текстурою. Відсутність сторонніх домішок, таких як колонії бактерій (зазвичай менші, слизові, з іншою морфологією) або інших дріжджів (які можуть мати відмінний колір чи форму), є ключовою ознакою чистоти. Будь-які відхилення в морфології колоній або наявність різнотипних колоній свідчить про контамінацію, що вимагає подальшого аналізу або повторного висіву.

Другий етап включає мікроскопію дріжджів за допомогою методу «роздавлена крапля», що дозволяє безпосередньо оцінити морфологію клітин. Для цього краплю дистильованої води поміщають на попередньо знежирене предметне скло. Простерилізованою бактеріальною петлею відбирають невелику кількість культури *S. cerevisiae* з колонії та переносять її в краплю води, ретельно перемішуючи для рівномірного розподілу клітин. Потім суміш накривають покривним склом, а надлишок води обережно видаляють фільтрувальним папером, щоб уникнути зсуву покривного скла та утворити тонкий шар рідини.

Мікроскопування проводять за допомогою світлового мікроскопа при об'єктиві 40×, що забезпечує достатнє збільшення для виявлення характерних морфологічних ознак дріжджів. При відсутності інших мікроорганізмів, таких як бактерії (мають паличкоподібну, кокоподібну форму, значно менші розміри) або плісняві гриби, можна спостерігати такі характерні морфологічні ознаки клітин *S. cerevisiae*:

Форма: переважно овальна або кругла, що є типовою для більшості видів дріжджів.

Поверхня: гладка або злегка зморщена клітинна стінка.

Колір: сіруватий або напівпрозорий.

9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

9.2.1. Визначення концентрації цільового продукту (біомаса)

Живі клітини визначали шляхом підрахунку колонієутворюючих одиниць (КУО) після посіву розведених зразків на чашки YPD. Принцип методу полягає у тому, що кожна життєздатна клітина дріжджів, висіяна на поживне середовище,

утворює колонію, яку можна підрахувати. Хід роботи включав центрифугування дріжджової біомаси для відокремлення від меляси, промивання дистильованою водою, зневоднення у сушарці з псевдозрідженим шаром до 8% вологості, регідrataцію сухої біомаси, розведення зразків, посів на чашки YPD, інкубацію протягом 24 годин при 30°C та підрахунок КУО.

Матеріали та реактиви, використані в цьому процесі, включали: дріжджову біомасу, мелясу, стерильну дистильовану воду, настільну сушарку з псевдозрідженим шаром (Sherwood Scientific), чашки YPD. Для розрахунку відсотка виживання КУО свіжих клітин приймали за 100% [12].

Концентрацію біомаси визначали гравіметричним методом. Визначення максимальної питомої швидкості росту ґрунтується на вимірюванні оптичної щільності (OD600) проб, відібраних протягом експоненціальної фази росту культури дріжджів. Зміна оптичної щільності прямо пропорційна збільшенню концентрації клітин у цей період, що дозволяє розрахувати швидкість їхнього поділу. Визначення сухої маси клітин (DCW) здійснюється гравіметрично. Суть методу полягає у відокремленні клітин з певного об'єму культури шляхом центрифугування, їхньому багаторазовому промиванні для видалення залишків середовища та подальшому висушуванню до досягнення постійної ваги.

Для визначення максимальної питомої швидкості росту протягом експоненціальної фази росту дріжджової культури через певні проміжки часу відбираються проби. В кожній пробі вимірюється оптична щільність за довжини хвилі 600 нм (OD600) за допомогою спектрофотометра. Отримані значення OD600 використовуються для побудови кривої росту та розрахунку максимальної питомої швидкості росту.

Для визначення сухої маси клітин відбираються зразки культури об'ємом 1 мл на стаціонарній фазі росту. Клітини відокремлюються від культуральної рідини шляхом центрифугування при 6800 g протягом 6 хвилин. Осад клітин тричі промивається дистильованою водою для повного видалення залишків культурального середовища. Для досягнення постійної ваги, промиті клітини висушують у сушильній шафі при 65 °C. Після повного висихання, зважується осад

клітин. Для кожної точки даних проводиться не менше п'яти біологічних повторностей, а потім розраховується середнє значення.

Реактиви та матеріали:

- Культура дріжджів
- Дистильована вода
- Пробірки для центрифугування
- Стерильні наконечники для піпетки
- Спектрофотометр
- Кювети для спектрофотометра
- Центрифуга
- Сушильна шафа
- Аналітичні ваги
- Ексикатор [67]

9.2.2. Визначення концентрації джерела вуглецевого (сахароза та глюкоза) і азотного (пептон і сульфат амонію) живлення у поживному середовищі

Визначення концентрації джерела вуглецевого (сахароза та глюкоза)

Для визначення концентрації сахарози використовували ферментативний метод з інвертазою. Спочатку зразок інкубували з інвертазою, яка розщеплює сахарозу на глюкозу та фруктозу. Потім реакцію зупиняли, а утворену глюкозу вимірювали глюкозооксидазно-пероксидазним методом.

Глюкозооксидазно-пероксидазний метод базується на реакції глюкози з глюкозооксидазою, в результаті якої утворюється пероксид водню. Пероксид водню, в свою чергу, реагує з о-діанізином у присутності пероксидази, утворюючи забарвлений продукт. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації глюкози. Вимірюючи оптичну густину розчину при 540 нм, можна визначити концентрацію глюкози за допомогою калібрувальної кривої.

Матеріали та реактиви, що використовувались: зразки, натрій-ацетатний буфер (50 мМ, рН 5,0), інвертаза (2,5 ОД), K_2HPO_4 (0,4 М), реактив GOX/P (глюкозооксидаза

7,8 ОД, пероксидаза 0,4 ОД, о-діанізидин 0,9 мМ у 100 мМ калій-фосфатному буфері рН 7,0), НСІ (6 N), глюкоза (0–10 мг/мл) [12].

Концентрацію пептону (амінного азоту) визначали за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Цей метод ґрунтується на розділенні амінокислот і амонію на хроматографічній колонці з подальшим їх виявленням. Результати виражали в одиницях дріжджового засвоюваного азоту (YAN), перераховуючи концентрації амінокислот і амонію згідно з кількістю засвоюваних атомів азоту в кожній амінокислоті.

Для аналізу використовували зразки середовищ, в яких вирощували мікроорганізми. Аналіз проводили в двох повторях для кожної проби. Матеріали та реактиви включали хроматографічну колонку, розчинники для елюювання, стандартні розчини амінокислот і амонію. Хід роботи полягав у підготовці зразків, їх введенні в хроматограф, розділенні компонентів, їх виявленні та кількісному визначенні [66].

Для визначення концентрації сульфату амонію як джерела азоту в середовищі використовується опосередкований метод, заснований на кількісному визначенні вивільнених іонів амонію (NH_4^+). Принцип методу полягає в тому, що іони амонію, присутні в розчині, вступають у специфічну реакцію з реактивом Несслера. Ця реакція призводить до утворення характерного жовто-коричневого забарвлення, інтенсивність якого прямо пропорційна концентрації амонію. Цей колір може бути виміряний за допомогою спектрофотометра, що дозволяє кількісно оцінити вміст NH_4^+ .

Матеріали та хід роботи:

Для проведення аналізу знадобляться:

- Реактив Несслера (розчин калію тетрайодомеркурату(II) у лужному середовищі).
- Стандартні розчини хлориду амонію (NH_4Cl) з відомими концентраціями іонів NH_4^+ у діапазоні 1–5 мкг/мл для побудови калібрувальної кривої.

- Зразки досліджуваного середовища, в якому необхідно визначити сульфат амонію.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Спектрофотометр для вимірювання оптичної густини.
- Пробірки, піпетки, мірні колби та інше стандартне лабораторне обладнання.

Хід роботи включає кілька етапів. Спершу готують серію стандартних розчинів NH_4Cl різної концентрації, додають до них реактив Несслера і після витримки (необхідної для розвитку кольору) вимірюють оптичну густину кожного розчину на спектрофотометрі при відповідній довжині хвилі. На основі цих даних будують калібрувальну криву, яка відображає залежність оптичної густини від концентрації NH_4^+ . Потім до досліджуваних зразків середовища також додають реактив Несслера, витримують і вимірюють їхню оптичну густину. За отриманими значеннями оптичної густини зразків, використовуючи побудовану калібрувальну криву, визначають концентрацію іонів NH_4^+ у досліджуваному середовищі. Нарешті, оскільки відомо, що кожна молекула сульфату амонію дисоціює на два іони амонію, отриману концентрацію NH_4^+ перераховують на еквівалентну концентрацію сульфату амонію (виражену в мг NH_4^+ на л середовища), що дозволяє оцінити його вміст як джерела азоту [88].

ЛІТЕРАТУРА

1. Das, S., Ray, M. K., Panday, D., & Mishra, P. K. (2023). Role of biotechnology in creating sustainable agriculture. *PLOS Sustainability and Transformation*, 2(7), e0000069.
<https://doi.org/10.1371/journal.pstr.0000069>
2. Onyema, V. O., Amadi, O. C., Moneke, A. N., & Agu, R. C. (2023). A Brief Review: *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity potential and promising cell factories for exploitation in biotechnology and industry processes—West African Natural yeasts contribution. *Food Chemistry Advances*, 2, 100162.
<https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100162>
3. Timira, V., Chen, X., Zhou, P., Wu, J., & Wang, T. (2024). Potential use of yeast protein in terms of biorefinery, functionality, and sustainability in food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(3), e13326.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.13326>
4. Мікроорганізми як біологічні агенти [Електронний ресурс] [Текст] : конспект лекцій для студ. освіт. ступ. "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" / Т. П. Пирог, О. І. Скроцька ; Нац. ун-т харч. технол. — Київ : НУХТ, 2018. — 158 с. — каф. біотехнології і мікробіології.
5. Gautam, E., & Shukla, A. (2020). Isolation, identification and characterization of *Sacchromyces cerevisiae* strains, obtained from different sources. *Int. Res. J. Eng. Techn*, 7(5), 564-575.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01690>
6. Serikov, T. A., Jamalova, G. A., Rafikova, K. S., K Yelikbayev, B., Yernazarova, A. K., Serikovna, K. L., ... & Egutkin, V. Y. (2024). Ecological, biological and biotechnological aspects of *Saccharomyces cerevisiae* biomass production. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 22(2), 499-512.
<https://www.google.com/search?q=https://doi.org/10.22124/cjes.2023.7327>

7. Zhang, K., Wu, X. C., Zheng, D. Q., & Petes, T. D. (2017). Effects of temperature on the meiotic recombination landscape of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *MBio*, 8(6), 10-1128.
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mbio.02099-17>
8. Garay-Arroyo, A., Covarrubias, A. A., Clark, I., Nino, I., Gosset, G., & Martinez, A. (2004). Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 63, 734-741.
<https://doi.org/10.1007/s00253-003-1414-4>
9. Кірічевська, Я. В. (2021). Дослідження впливу температури приготування і зберігання пивних дріжджів на їх бродильну активність.
10. Oliveira, A. P., & Sauer, U. (2012). The importance of post-translational modifications in regulating *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *FEMS yeast research*, 12(2), 104-117.
<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00765.x>
11. *Saccharomyces cerevisiae* таксономічний статус [Електронний ресурс] Режим доступу:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4932&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f&log_op=lineage_toggle
12. Torrellas, M., Pietrafesa, R., Ferrer-Pinós, A., Capece, A., Matallana, E., & Aranda, A. (2023). Optimizing growth and biomass production of non-*Saccharomyces* wine yeast starters by overcoming sucrose consumption deficiency. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1209940.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1209940>
13. Wang, D., Xu, Y., Hu, J., & Zhao, G. (2004). Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, 110(4), 340-346.
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00630.x>
14. Frîncu, M., Dumitrache, C., Begea, M., Teodorescu, R. I., Diguta, C. F., Baniță, C. D., ... & Bărbulescu, I. D. (2022, January). Active wine yeast biomass obtained

through biotechnological process. In Multidisciplinary Conference on Sustainable Development-Food Chemistry, Engineering & Technology.

<http://journal-of-agroalimentary.ro/>

15. Bărbulescu, I. D., Ghica, M. V., Begea, M., Albu Kaya, M. G., Teodorescu, R. I., Popa, L., ... & Dinu-Pîrvu, C. E. (2021). Optimization of the fermentation conditions for brewing yeast biomass production using the response surface methodology and Taguchi Technique. *Agriculture*, 11(12), 1237.

<https://doi.org/10.3390/agriculture11121237>

16. *Saccharomyces cerevisiae* – проти паразитів та збудників інших захворювань [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://laktiale.ua/pro-laktiale/saccharomyces-cerevisiae/>

17. Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(4), 30.

<https://doi.org/10.3390/beverages2040030>

18. Технологічні прийоми підвищення якості урожаю та продуктів переробки сортів і форм винограду нової селекції ННЦ «ІВІВ ім. В.Є. Таїрова» [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.tairov.org.ua/wp-content/uploads/2021/04/Dysertatsiyna-robota-Kovanoyi-Oleny-Olehivny.pdf>

19. Alonso-del-Real, J., Lairon-Peris, M., Barrio, E., & Querol, A. (2017). Effect of temperature on the prevalence of *Saccharomyces non cerevisiae* species against a *S. cerevisiae* wine strain in wine fermentation: competition, physiological fitness, and influence in final wine composition. *Frontiers in Microbiology*, 8, 150.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00150>

20. Аналіз ринку вина в Україні [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://inventure.com.ua/uk/analytics/investments/analiz-rinku-vina-v-ukrayini>

21. Torrellas, M., Pietrafesa, R., Ferrer-Pinós, A., Capece, A., Matallana, E., & Aranda, A. (2023). Optimizing growth and biomass production of non-*Saccharomyces* wine yeast starters by overcoming sucrose consumption deficiency. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1209940.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1209940>

22. Скільки дріжджів на галон вина [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://www.mountaintideswine.com/blog/how-much-yeast-per-gallon-of-wine/#:~:text=Full-bodied%20Red%20Wines%20\(e.g.,ensures%20a%20robust%20fermentation%20process](https://www.mountaintideswine.com/blog/how-much-yeast-per-gallon-of-wine/#:~:text=Full-bodied%20Red%20Wines%20(e.g.,ensures%20a%20robust%20fermentation%20process)
23. Гліколіз [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/sce00010>
24. Цитратний цикл [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/sce00020>
25. Пентозофосфатний шлях [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/sce00030>
26. Метаболізм фруктози та манози [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?sce00051
27. Біосинтез жирних кислот [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/sce00061>
28. Метаболізм аланіну, аспартату та глутамату [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/sce00250>
29. Метаболізм гліцину, серину та треоніну: [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/sce00260>
30. Метаболізм цистеїну та метіоніну [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/sce00270>
31. Біосинтез валіну, лейцину та ізолейцину [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/sce00300>
32. Біосинтез фенілаланіну, тирозину та триптофану [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/sce00400>
33. Біосинтез аргініну [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/sce00220>

34. Zakhartsev, M., Yang, X., Reuss, M., & Pörtner, H. O. (2015). Metabolic efficiency in yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to temperature dependent growth and biomass yield. *Journal of thermal biology*, 52, 117-129.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.05.008>
35. Vieira, É. D., Andrietta, M. D. G. S., & Andrietta, S. R. (2013). Yeast biomass production: a new approach in glucose-limited feeding strategy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 551-558.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200035>
36. Chaoui, H., & Eckhoff, S. R. (2014). Biomass feedstock storage for quantity and quality preservation. In Engineering and science of biomass feedstock production and provision (pp. 165-193). New York, NY: Springer New York.
http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-8014-4_7
37. Bykowski, T., & Stevenson, B. (2020). Aseptic technique. *Current protocols in microbiology*, 56(1), e98.
<https://doi.org/10.1002/cpmc.98>
38. Chai, W. Y., Tan, M. K., Teo, K. T. K., & Tham, H. J. (2024). Optimization of Fed-Batch Baker's Yeast Fermentation Using Deep Reinforcement Learning. Process integration and optimization for sustainability, 8(2), 395-411.
<http://dx.doi.org/10.1007/s41660-024-00406-6>
39. Understanding Types of Bioprocessing: Batch, Fed-Batch, and Continuous [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://cultiPLY.net/en/understanding-types-of-bioprocessing/>
40. Загальна біотехнологія [Електронний ресурс] [Текст] : конспект лекцій для здобувачів освіт. рівня "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія" ден. та заоч. форм навч. / Ю. М. Пенчук ; уклад. : Ю. М. Пенчук ; Нац. ун-т харч. технол. — Київ : НУХТ, 2019. — 80 с. — каф. біотехнології і мікробіології.
41. 1000L промисловий мікробіологічний ферментер [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://shbxbio.en.made-in-china.com/product/lnfYwperqmkc/China-1000L-Industrial-Microbiology-Stainless-Steel-Fermenter-Bioreactor-Prices-Enzymes-Fermenting-Vessel.html>

42. Girotto, F., Peng, W., Rafieenia, R., & Cossu, R. (2018). Effect of aeration applied during different phases of anaerobic digestion. *Waste and Biomass Valorization*, 9, 161-174.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-016-9785-9>
43. Стерилізація аероційного повітря [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://bioengineering.kpi.ua/attachments/article/277/%D0%93%D0%BB%D0%B0%D0%B2%D0%B0%206.%D0%A7%D0%B0%D1%81%D1%82%D1%8C2.pdf>
44. Методичні вказівки до практичних занять з дисципліни «устаткування галузі» [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.dstu.dp.ua/Portal/Data/5/8/5-8-mzp24.pdf>
45. Загальна біотехнологія [Електронний ресурс] [Текст] : конспект лекцій для здобувачів освіт. рівня "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія" ден. та заоч. форм навч. / Ю. М. Пенчук ; уклад. : Ю. М. Пенчук ; Нац. ун-т харч. технол. — Київ : НУХТ, 2019. — 80 с. — каф. біотехнології і мікробіології.
46. ІНСТРУКЦІЯ «Біопагdez» [Електронний ресурс] Режим доступу: http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin_upload/dana/biopacdez-enzim.pdf
47. Біопагdez Ензим [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://larinna-shop.com.ua/uk/zasib-koncentrat-dlya-dezinfekciyi-ta-sterilizaciyi-instrumentiv-ta-poverhon-biopagdez-enzym-1-l.html>
48. Нува-Сан TR 50 Agro (Хува-Сан) 1кг [Електронний ресурс] Режим доступу: https://mirsemyan.com.ua/ru/pers_shop/sredstvazashitirasteniysr/332596.htm?srltid=AfmBOoq9PXd0hh2zPMORdR4sY8DZZh2JL9OKlFSX8mt3UOfJMmKbN9kC
49. Diversey TASKI Sani 4in1 Plus [Електронний ресурс] Режим доступу: https://ukrchoice.in.ua/ua/p2094872854-kislotnoe-sredstvo-dlya.html?srltid=AfmBOoqOPLQ9_aQiLO9A6r6p2Z0LAh8L1Q5RqU-cGhoRFFWW3JFhbFz1B

50. TASKI Sani 4 in 1 Plus [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://lysoform.ua/products/taski-sani-4-in-1-qs/>
51. Helpix Professional conc [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://shop.helpix.ua/products/view/koncentrirovannoe-sredstvo-dlya-gigienicheskoy-obrabotki-poverhnostey-20-l.html>
52. Cif Professional 2in1 Cleaner Disinfectant conc [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://lysoform.ua/products/cif-professional-2in1-cleaner-disinfectant-conc-5l/>
53. Засіб для дезінфекції з миючою дією для промислових поверхонь 5 л Cif Prof SafeGuard [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://prote.ua/zasobi-dlya-pribirannya/sredstvo-dlya-dezinfekcii-s-moyushchim-deystviem-dlya-promyshlennyh-poverhnostey-5-l-cif-prof-safeguard-25488862?srsId=AfmBOoq0bNtawdcw7O7Qcnq2oRTboGxF-Mmq1cXIiaRQYrRpji6cBsyL>
54. Антисептичний засіб із дозатором Квікцид [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://larinna-shop.com.ua/uk/antyseptychnyj-zasib-iz-dozatorom-kvikcyd-250-ml.html>
55. Софта-Ман ISO [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://lavernamarket.com.ua/ua/p884025332-softa-man-iso.html>
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12760>
56. Lei, F., Rotbøll, M., & Jørgensen, SB (2001). A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biotechnology*, 88 (3), 205-221.
57. Мікроорганізми як біологічні агенти [Електронний ресурс]: лабораторний практикум для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / Скроцька О.І., Красінько В.О, Волошина І.М. – К.: НУХТ, 2021. – 65 с.
58. Atmanto, Y. K. A. A., Paramita, K., & Hidayati, I. (2022). Culture media. *International Research Journal of Modernization in Engineering Technology and Science*, 4(4), 2213-2225.
59. Salari, R., & Salari, R. (2017). Investigation of the best *Saccharomyces cerevisiae* growth condition. *Electronic physician*, 9(1), 3592.

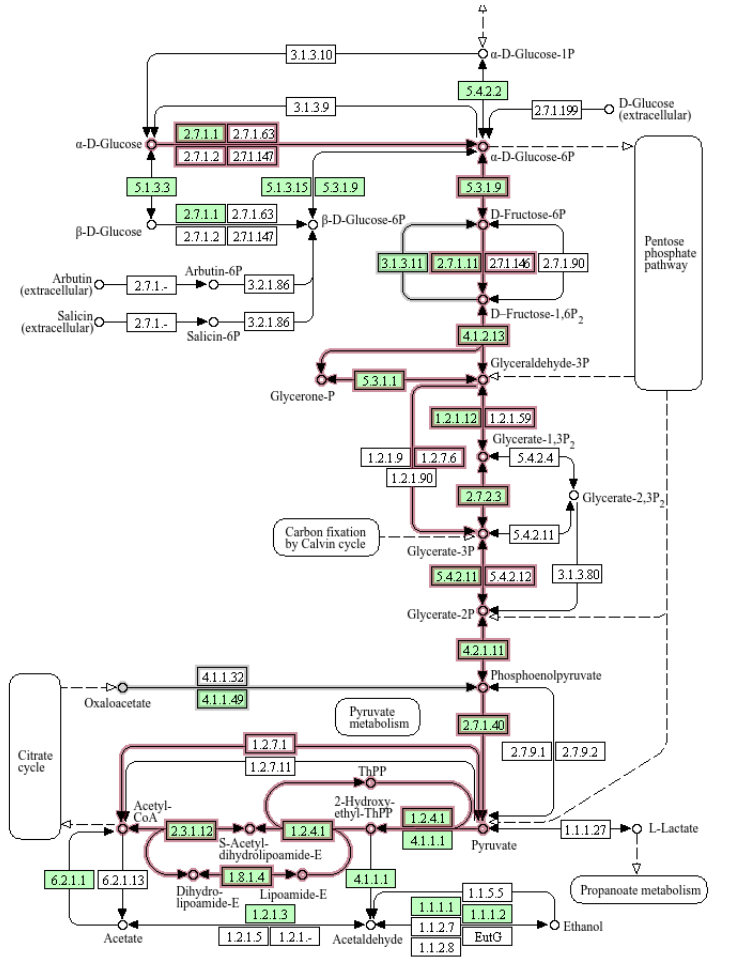
60. Martínez-Moreno, R., Morales, P., Gonzalez, R., Mas, A., & Beltran, G. (2012). Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source. *FEMS Yeast Research*, 12(4), 477-485.
61. Kasavi, C., Finore, I., Lama, L., Nicolaus, B., Oliver, S. G., Oner, E. T., & Kirdar, B. (2012). Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass. *Biomass and Bioenergy*, 45, 230-238.
62. Lei, F., Rotbøll, M., & Jørgensen, SB (2001). A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biotechnology*, 88 (3), 205-221.
63. Мікроорганізми як біологічні агенти [Електронний ресурс]: лабораторний практикум для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / Скроцька О.І., Красінько В.О, Волошина І.М. – К.: НУХТ, 2021. – 65 с.
64. Atmanto, Y. K. A. A., Paramita, K., & Handayani, I. (2022). Culture media. *International Research Journal of Modernization in Engineering Technology and Science*, 4(4), 2213-2225.
65. Salari, R., & Salari, R. (2017). Investigation of the best *Saccharomyces cerevisiae* growth condition. *Electronic physician*, 9(1), 3592.
66. Martínez-Moreno, R., Morales, P., Gonzalez, R., Mas, A., & Beltran, G. (2012). Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source. *FEMS Yeast Research*, 12(4), 477-485.
67. Kasavi, C., Finore, I., Lama, L., Nicolaus, B., Oliver, S. G., Oner, E. T., & Kirdar, B. (2012). Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass. *Biomass and Bioenergy*, 45, 230-238.
68. Шахта вентиляційна [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://agroprolisok.com.ua/ua/p1164637862-shahta-ventilyatsionnaya-630.html>
69. Фільтр грубої очистки повітря [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-gruboy-ochistki-vozduha-panelniy>

70. Турбокомпресор [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/centrobizhni-kompresory-ih-dalgakiran-seriyi-t3/>
71. Рефрижераторний осушувач [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/refryzheratorni-osushuvachi-stysnenogo-povitrya-dalgakiran-dryair-seriyi-dk/>
72. Ресивер [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://tusk.ua/product/resiver-vozdushnyj-lider-10-bar-2700-l-rv2700120001-dlya-kompressora/?keyword=&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=21688629505&creative=&placement=&target=&campaignid=21688629505&adgroup=&feeditemid=&targetid=&loc_interest_ms=&loc_physical_ms=9061016&matchtype=&network=x&device=c&devicemodel=&ifmobile=&ifnotmobile=notmobile&ifsearch=&ifcontent:\[value\]=&keyword=&marketing.link=google-cpc-21688629505_x&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAhP67BhAVEiwA2E_9g-nr4hYq7CcQP4lLu1y5wi3glF8gewF4A0lqnti3Tp0KsiDy8ar3xRoCX8wQAvD_BwE](https://tusk.ua/product/resiver-vozdushnyj-lider-10-bar-2700-l-rv2700120001-dlya-kompressora/?keyword=&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=21688629505&creative=&placement=&target=&campaignid=21688629505&adgroup=&feeditemid=&targetid=&loc_interest_ms=&loc_physical_ms=9061016&matchtype=&network=x&device=c&devicemodel=&ifmobile=&ifnotmobile=notmobile&ifsearch=&ifcontent:[value]=&keyword=&marketing.link=google-cpc-21688629505_x&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAhP67BhAVEiwA2E_9g-nr4hYq7CcQP4lLu1y5wi3glF8gewF4A0lqnti3Tp0KsiDy8ar3xRoCX8wQAvD_BwE)
73. Теплообмінник-нагрівач [Електронний ресурс] Режим доступу: https://smartvent.com.ua/ua/p849612801-kruglyj-kanalnyj-vodyanoj.html?srsId=AfmBOoqsrWX8noWNs4rdsJNWEBUxDWg9aWByBK_GwkFowTFhaRYD1HC4L
74. Фільтр тонкої очистки [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/kishenkovi-filtri-f5-dlya-ventilyatsiyi.html>
75. Індивідуальний фільтр очистки повітря [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ventfilter.kiev.ua/goods/hepa-filtr-dlya-farmatsevticheskoy-promyshlennosti-i-meditsyny/>
76. Реактор-зміщувач 10 л [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.ato.com/10l-double-jacketed-glass-reactor?srsId=AfmBOopeiucCGKg1ecHJ0pXgQ7p-jDeXcz_0UWWK6S51Z10SzlbXEIf0

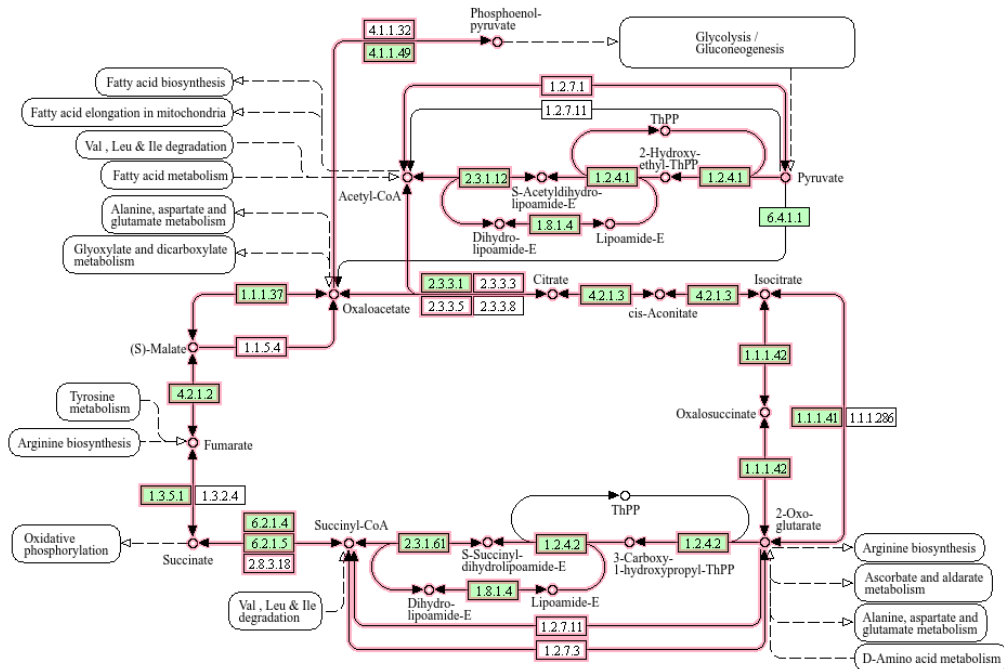
- 77.Центрифуга [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://www.andritz.com/products-en/separation/filter-centrifuges/krauss-maffei-sz-pusher-centrifuge>
- 78.Інокулятор 15 л [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://sartorius.com.ua/fermenteri-i-bioreaktori/sterilizuyemi-na-misczi-fermenteri-bioreaktori-cip/biostat-cplus/>
- 79.Реактор-зміщувач 10 л [Електронний ресурс] Режим доступу:
https://www.ato.com/10l-double-jacketed-glass-reactor?srsId=AfmBOopeiucCGKg1ecHJ0pXgQ7p-jDeXcz_0UWWK6S51Z10SzlbXEIf0
- 80.Інокулятор 100 л [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://stprom.com.ua/ua/p1720299542-reaktor-rubashkoj-meshalkoj.html?srsId=AfmBOoqFNRJzXeJ3-wy5LhyCj6z3wHw6hURDD3fhXJcSVaikcs8mL1my>
81. Реактор-зміщувач 50 л [Електронний ресурс] Режим доступу:
https://www.alibaba.com/product-detail/Food-Grade-50l-500l-Stainless-Steel_1601055853108.html
82. Ферментер 1м3 [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://shbxbio.en.made-in-china.com/product/lnfYwperqmkc/China-1000L-Industrial-Microbiology-Stainless-Steel-Fermenter-Bioreactor-Prices-Enzymes-Fermenting-Vessel.html>
- 83.Реактор-зміщувач 500 л [Електронний ресурс] Режим доступу:
https://stprom.com.ua/ua/p1719736729-farmatsevticheskij-reaktor-500.html?srsId=AfmBOoql-EizGvbGOa1Na_PrM4kcc3VqH2J2VloSozfdCUhlDYYcAnmh
84. Реактор-зміщувач 200 л [Електронний ресурс] Режим доступу: 200 л
<https://blsfluid.en.made-in-china.com/product/wycnRkaChxhp/China-High-Pressure-200L-Stainless-Steel-Heater-Reactor-with-Scraper-Mixer.html>

85. Реактор-змішувач 10 л [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.ato.com/10l-double-jacketed-glass-reactor?srsId=AfmBOopeiucCGKg1ecHJ0pXgQ7p-jDeXcz_0UWWK6S51Z10SzlbXEIf0
86. Насос відцентровий [Електронний ресурс] Режим доступу: https://ovs.com.ua/ua/dacha-sad-ogorod/nasosnaya-tekhnika/poverkhnostnye-nasosy/nasos-tsentrobegnyj-saer-m-700b-nerg-1-5kvt-10-m3-chas-52-m?gad_source=1&gclid=CjwKCAiAhP67BhAVEiwA2E_9g7K19PVeUxYbGh-h-4obiDo0hHcqt0z3qn90-BNg_HrUrX0z-q--fxxoCBKYQAvD_BwE
87. Дозатор об'ємний [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://delta-rozliv.com.ua/ua/p1055063201-dozator-obemnyj-poluavtomaticheskij.html>
88. Bayliak, M. M., Hryniv, O. V., Knyhynytska, R. V., & Lushchak, V. I. (2018). Alpha-ketoglutarate enhances freeze–thaw tolerance and prevents carbohydrate-induced cell death of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 200(1), 33-46.
<https://doi.org/10.1007/s00203-017-1423-9>

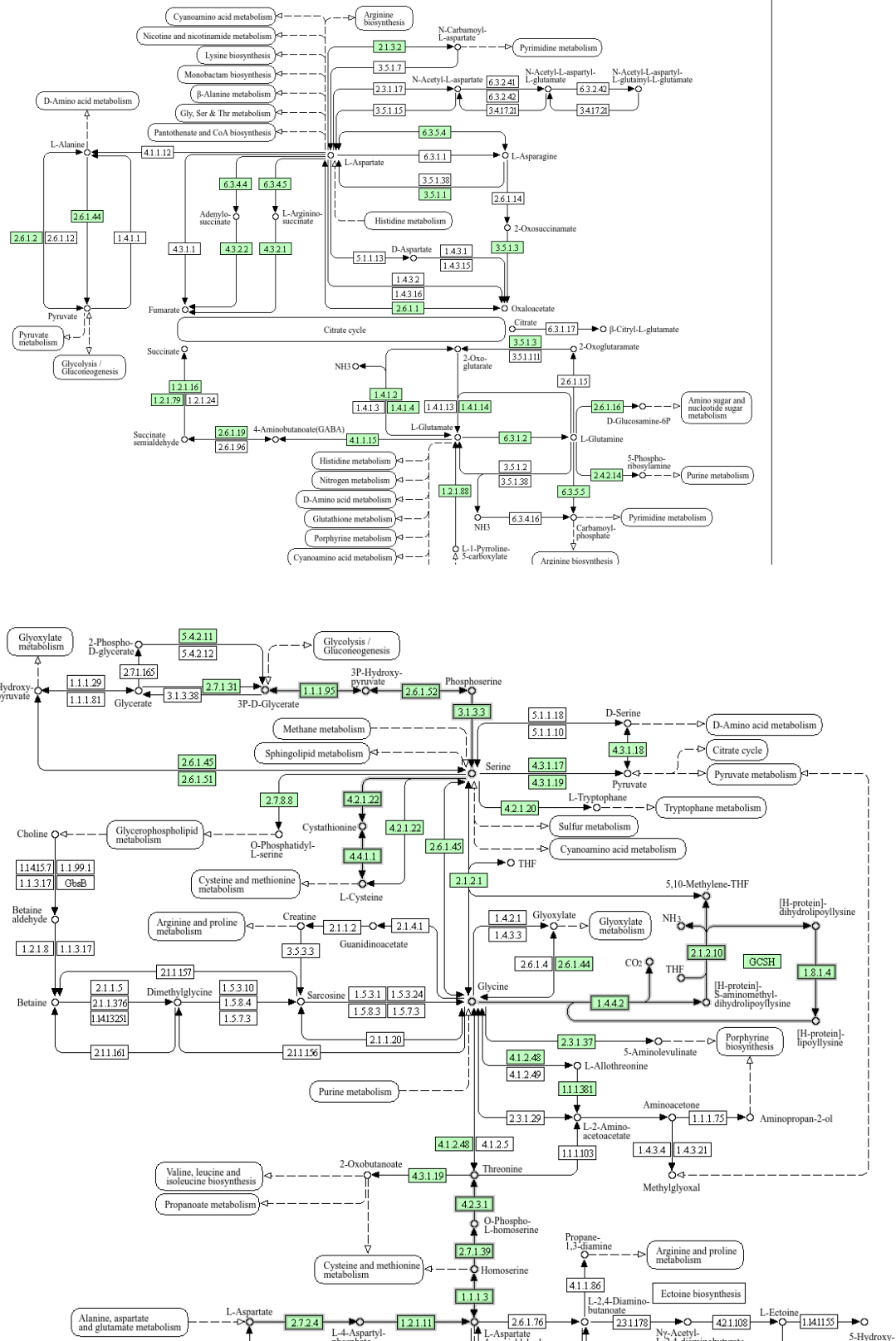
Додаток



CITRATE CYCLE (TCA CYCLE)

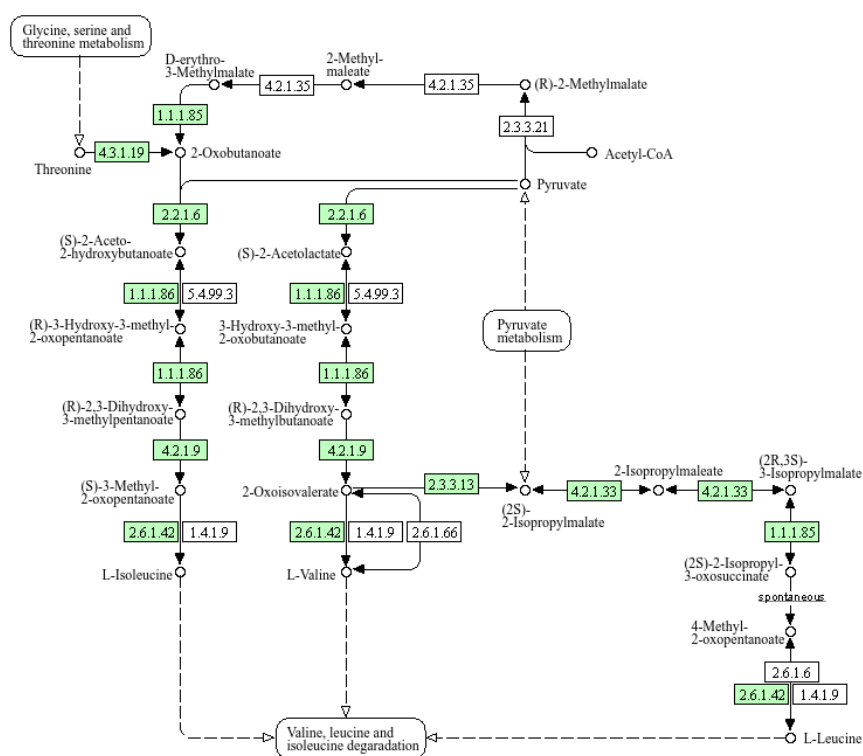


ALANINE, ASPARTATE AND GLUTAMATE METABOLISM

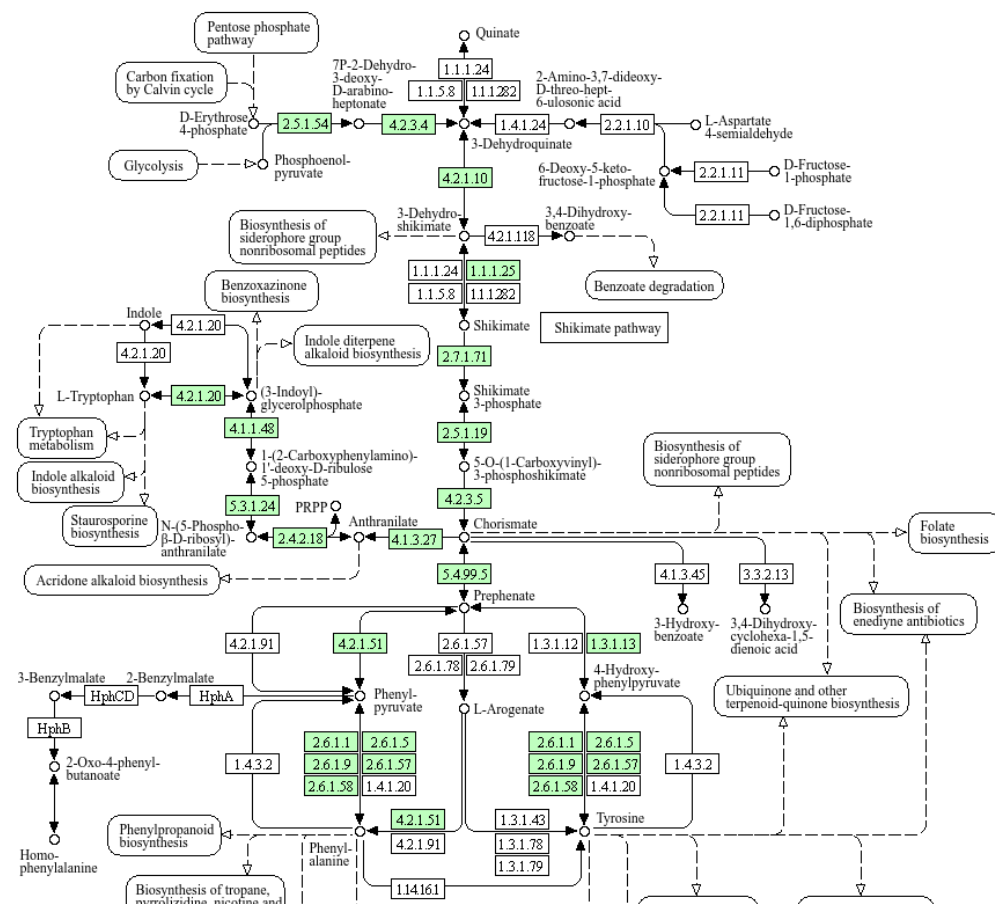


[illegible][illegible]

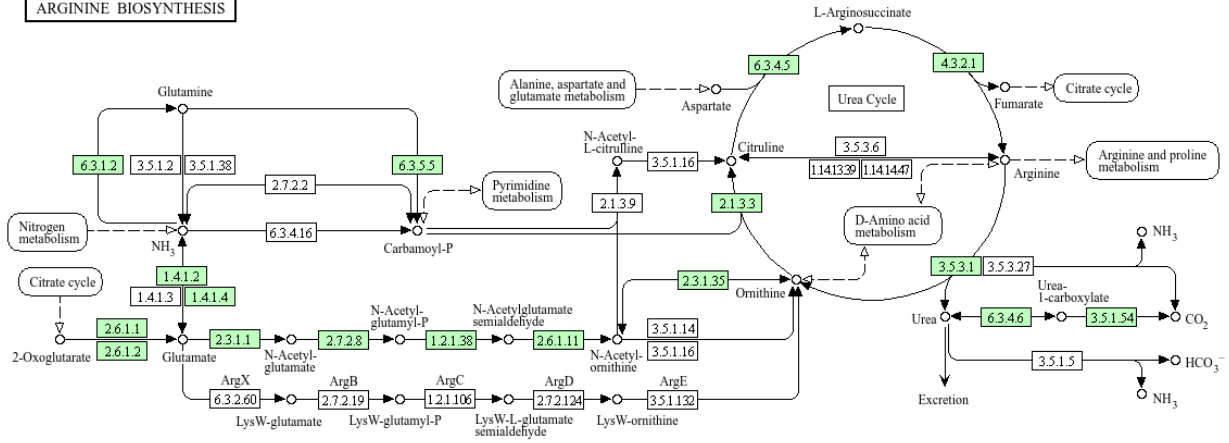
VALINE, LEUCINE AND ISOLEUCINE BIOSYNTHESIS



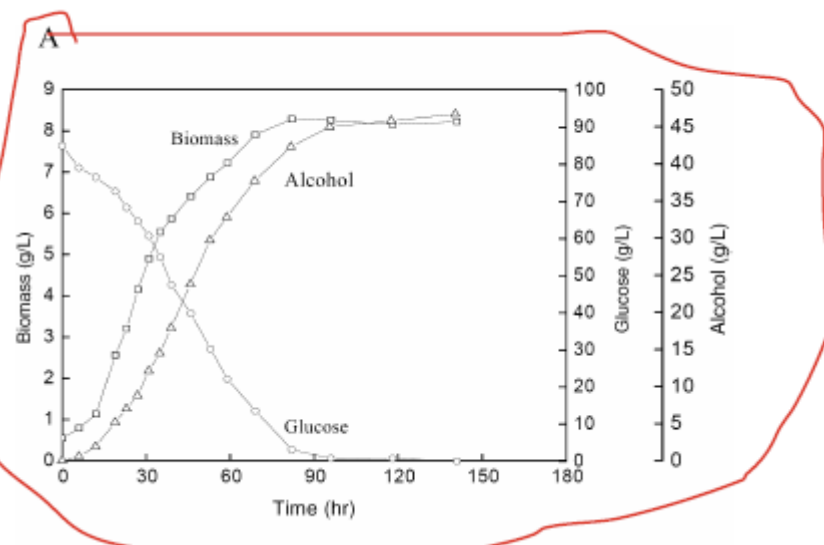
PHENYLALANINE, TYROSINE AND TRYPTOPHAN BIOSYNTHESIS



ARGININE BIOSYNTHESIS



00220 12/6/24



Medium

In order to investigate the effect of a single sugar on yeast fermentation, a synthetic medium was prepared to simulate an apple juice concentrate, according to the composition of an 'ideal' apple juice used for apple wine^{5,11}. It contained 20~230 g/L single sugar (glucose, fructose or sucrose, respectively), 1.7 g/L yeast extract, 1.7 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.9 g/L quinate, 3.0 g/L malic acid, 1.0 g/L lactic acid, and 10 mg/L vitamin D₂ and B₁. The pH was adjusted to 3.5. Titratable acidity to 8.1 as malic acid was 3.95 g/L.

For maintenance culture was used the selected yeast culture cultivated at slant tube with YMSP agarised medium (yeast extract, sucrose, malt extract and peptone hy-soy) [9].

After the processing phase of the culture medium resulting from the bioprocess, a final biomass concentration > 4.96 g / L was obtained.

sucrose–Peptone Hy-Soy agar, with the following composition: 0.5 g yeast extract; 2 g malt extract; 2 g; sucrose; 0.5 g Peptone Hy-Soy; 2 g agar; and 100 mL distilled water.

Saccharomyces cerevisiae strain Lalvin T73 (Querol et al., 1992) was used as the reference strain.

Precultures for biomass propagation were prepared in liquid YPD medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose) and incubated at 30°C with shaking (180 rpm). Growth curves were followed in a Varioskan plate reads (Thermo Scientific). Biomass propagation experiments were performed using beet molasses provided by Lessafre Iberica (60 g/L of sucrose for batch experiments, 100 g/L of sucrose for fed-batch phase and 20 g/L in diluted molasses experiments), supplemented with 7.5 g/L (NH₄)₂SO₄, 3.5 g/L KH₂PO₄, 0.75 g/L MgSO₄, and 10 mL/L vitamin solution (Torrellas et al., 2020). The vitamin solution contained 0.5 mg/L D-biotin, 1 mg/L calcium pantothenate and 1 mg/L thiamine hydrochloride. Molasses and mineral solutions were autoclaved separately at 121°C for 20 min. The vitamin solution was filter sterilized (0.2 µm pore size). pH was adjusted to 4.5 using H₃PO₄ 42.5% (v/v). To analyze sucrose acid hydrolysis, concentrations of HCl ranging from 0.5% to 2% (v/v) and incubation times of 15, 30, and 60 min and temperatures of 80°C and 95°C were tested (Supplementary Table 1). Molasses treated with HCl 1% (v/v) for 1 h at 80°C was enough to fully hydrolyze sucrose into glucose and fructose, so this condition was used in the next experiments. After treatment, pH was adjusted at 4.5 using NaOH 5M. Diluted molasses were treated as above lowering sucrose concentration from 60 to 20 g/L.

For bench-top scale biomass propagation experiments, cells were cultivated in flasks at 30°C with shaking (180 rpm) in molasses and in liquid YPD medium. Bioreactor scale assays were performed using a 5 L ez2-Control bioreactor (Applikon Biotechnology, Netherlands) equipped with proportional, integral and derivative (PID) control units for pH, temperature, oxygen and agitation speed. The bioreactor containing 2 L of sterilized molasses was inoculated with an initial OD of 0.1 from YPD precultures. Antifoam 0.05 and (w/v; antifoam 204, Sigma) was added. Cells were cultivated at 30°C with stirring. Dissolved oxygen was measured with an electrode and maintained at 20% by a PID control system that allowed automatic modification of the air flux and the agitation speed between (300–500 rpm). The initial pH was 4.5 and it was allowed to freely vary during the batch phase. During the fed-batch phase pH was maintained at 4.5 by automatic addition of 1 M NaOH or 42.5% H₃PO₄. Cell growth was monitored by measuring OD₆₀₀.

Yeast biomass was separated from molasses by centrifugation at 4000 rpm and several washes with sterile distilled water were performed. The biomass paste was recovered and placed as thin noodles inside a tabletop fluid bed dryer (Sherwood Scientific, Cambridge, United Kingdom). Biomass was dehydrated with an air flux of 2.5 m³/min at 37°C during 50 min for *S. cerevisiae*, 40 min for *H. vineae* and 60 min for *M. pulcherrima*, the time needed to reach 8% humidity, as determined by weight loss. It was then stored at 4°C. For rehydration, the dry biomass was placed in sterile distilled water (1 part biomass, 9 parts water) at 37°C for 10 min, followed by 10 min with shaking at 140 rpm.

2.3. Metabolite determination

Sucrose determination was performed by mixing 40 µL of each sample with 160 µL of a sodium acetate buffer 50 mM pH 5.0 containing invertase 2.5 U (Sigma, United States). Samples were then incubated at 30°C for 10 min. The reaction was stopped by adding 100 µL K₂HPO₄ 0.4 M and keeping samples at 95°C for 3 min. The glucose liberated by the reaction was determined by the glucose oxidase-peroxidase method. One hundred µL of each sample was added to 400 µL of the GOX/P reactive (glucose oxidase 7.8 U, peroxidase 0.4 U, o-dianisidine 0.9 mM in 100 mM pH 7.0 potassium phosphate buffer). Reaction was performed for 15 min at 30°C and was stopped by the addition of 500 µL of HCl 6 N. OD₅₄₀ was measured and glucose content was calculated using a calibration curve (glucose 0–10 mg/mL). Reducing sugars were determined following the protocol described by Robyt and Whelan (1972). In short, 100 µL of DNS [3,5-dinitrosalicylic acid 1% (w/v), NaOH 1.6% (w/v), potassium-sodium tartrate 30% (w/v)] were added to 100 µL of each sample. Samples were incubated at 95°C for 5 min and cooled in an ice bath.

22.42/1 Biomach

TABLE 1 Biomass propagation parameters under different conditions.

Species	Condition	Biomass yield (g biomass/g sucrose)	Max. ethanol production (g/L)	Viable cells after dehydration (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bench-top	0.09 (± 0.01) ^a	27.72 (± 2.39) ^a	48.55 (± 5.11) ^a
	Bioreactor (batch)	0.08 (± 0.01) ^a	23.75 (± 2.40) ^a	40.17 (± 4.74) ^a
	Bioreactor (fed-batch)	0.14 (± 0.02) ^a	n.d.	66.76 (± 8.23) ^b
	Molasses + HCl	0.08 (± 0.01) ^a	25.78 (± 1.16) ^a	45.39 (± 6.06) ^a

2.4. Determination of maximum specific growth rate and dry cell weight

For maximum specific growth rate determination, optical densities (OD_{600}) of samples collected during the exponential phase of growth were used.

Dry cell weights (DCW) of steady state cultures were determined gravimetrically by first recovering cells from 1 ml culture samples through centrifugation at $6800 \times g$ for 6 min (Eppendorf 5415C; Germany). Cells were washed with distilled water three times and then dried at 65°C until constant weight was achieved. Reported values are averages of five biological replicates for each data point.

2.5. Determination of YAN concentration

The nitrogen concentration in all of the media used was confirmed by HPLC analysis. The nitrogen concentrations were analyzed in duplicate by HPLC according to the method of Gomez-Alonso *et al.* (2007). Amino acid and ammonium concentrations were transformed into yeast assimilable nitrogen (YAN, expressed as mg N L^{-1}) according to assimilable nitrogen atoms of each amino acid. One nitrogen atom per amino acid was considered except Arg (three atoms), Lys (two atoms), Gln (two atoms), and Pro (no assimilable nitrogen).