

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

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

«\_\_\_» лютого 2023 р.

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

«\_\_\_» лютого 2023 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: Біосинтез еритритолу *Candida magnoliae*

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

ПАЛЯНИЦЯ Діана Вікторівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник БУЦЕНКО Людмила Миколаївна

(прізвище , ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

Олена ГУДЗЕНКО

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2023 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 ” листопада 20 22 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Паляниця Діана Вікторівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез еритритолу *Candida magnoliae*

керівник роботи Буценко Людмила Миколаївна,  
доцент, доктор біологічних наук

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 781-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2023 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Candida Magnoliae* , цільовий продукт: еритритол, геометричний об'єм ферментера: 50м<sup>3</sup>, коефіцієнт заповнення: 0,6, біосинтез

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)  
Характеристика еритритолу; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агенту *Candida magnoliae*; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу еритритолу - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема біосинтезу еритритолу - 1 аркуш формату А1

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Характеристика еритритолу	01.11.2022-10.11.2022	
2	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента <i>Candida magnoliae</i>	15.11.2022-28.11.2022	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	29.11.2022-04.12.2022	
4	РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	06.12.2022-14.12.2022	
5	РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання	17.12.2022-29.12.2022	
6	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.	04.01.2023-09.01.2023	
7	РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва	10.01.2023-15.01.2023	
8	РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля	16.01.2023-19.01.2023	
9	Апаратурна та технологічна схеми	20.01.2023-31.01.2023	

Здобувач

(підпис)

Діана ПАЛЯНИЦЯ

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Людмила БУЦЕНКО

(ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технології біосинтезу природного замітника цукру еритритолу. Проаналізувавши наукову літературу, було визначено, що використання *Candida magnoliae* є найбільш оптимальним. Продуктивність запропонованого штаму продуценту становить 117г/л.

Кваліфікаційну роботу було виконано згідно з отриманим варіантом завдання. Обсяг кваліфікаційної роботи становить 74 сторінок. Вона містить 12 таблиць, 5 рисунків та 2 додатки. Під час написання роботи було використано дані з 35 джерел.

У кваліфікаційній роботі дано обґрунтування та викладено технологічний процес біосинтезу еритритолу за культивування *Candida magnoliae*, який включає блок допоміжних робіт (підготовка і стерилізація поживних середовищ, розчинів для підтримання рівня рН під час культивування), стадії підготовки посівного матеріалу та вирощування культури у виробничому ферментері.

Обґрунтовано вибір біологічного агента *Candida magnoliae*. Наведено склад поживного середовища для культивування *Candida magnoliae*. З урахуванням складу поживного середовища запропоновано схему його підготовки та підібрано режими стерилізації.

**Ключові слова:** дріжджі, *Candida magnoliae*, поживне середовище, біосинтез, еритритол.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. Характеристика еритритолу.....	9
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента <i>Candida magnoliae</i> .....	13
2.1. Обґрунтування вибору <i>Candida magnoliae</i> та поживного середовища для його культивування.....	13
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Candida magnolia</i> .....	18
2.3. Таксономічний статус <i>Candida magnoliae</i> .....	19
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	20
3.1. Потреба у еритритолі.....	20
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	21
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів....	22
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	23
3.5. Біосинтез еритритолу.....	24
3.5.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у <i>Candida magnoliae</i> ....	24
3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у еритритол.....	25
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	27
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	27
4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	28
4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів .....	31
4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	31
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	34
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	38
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	53
7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів.....	53
7.2. Мікробіологічний контроль .....	57

7.2.1. Контроль чистоти культури.....	57
7.2.2. Контроль стерильності поживних середовищ.....	58
7.2.3. Контроль стерильності аераційного повітря.....	59
7.2.4.Методики виявлення контамінації в процесі культивування.....	59
7.3. Показники росту і синтезу еритритолу.....	60
7.3.1. Концентрація біомаси.....	60
7.3.2. Концентрація еритритолу.....	60
7.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	62
РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля .....	64
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва еритритолу на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	64
8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	65
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....	65
8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	67
8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів.....	69
8.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів .....	70
ЛІТЕРАТУРА.....	72

## ВСТУП

На сьогодні все більш актуальним є тема розроблення та впровадження у виробництво цукрозамінників. Відомо, що певна частина людей страждають на ожиріння й діабет. Багатьом людям дуже складно відмовитись від цукоровмістних продуктів, оскільки вони стимулюють у мозку утворення гормону щастя - серотоніну. Еритритол є здоровою альтернативою цукру. У порівнянні з іншими сахаридами еритритол не притаманні сильні побічні ефекти. А в порівнянні зі широко розповсюдженим цукрозамінником стевією, еритритол є більш прийнятним для споживачів тому що, не має сильного присмаку й гірко-гіркого післясмаку. Еритритол лише на 20-30% менш солодкий за звичайний цукор. Разом із тим, даний заміник цукру характеризується нульовим глікемічним індексом, тому не впливає на рівень глюкози в крові й на рівень інсуліну, та може споживатись пацієнтами при діабеті. [1]

Еритритол - є природним підсолоджувачем із сімейства поліолів – речовин із хімічною структурою, що аналогічна структурі цукрових спиртів. Молекула еритритолу містить залишки сахариду та спирту[2].

За зовнішнім виглядом це кристалічний порошок без яскраво вираженого запаху. За органолептичними характеристиками не поступається цукру та характеризується «ментоловим» післясмаком. У якості харчової добавки еритритол зареєстрований у Євросоюзі в 2008 році під кодом E968.

Еритритол міститься у водоростях і лишайниках, виялений у ферментованих продуктах (наприклад: вині, м'ясі, різні типи сирів), у деяких стиглих фруктах (дині, груші та винограді), ягодах (полуниці, кавунах), горіхах (фісташках), у незначних кількостях ідентифікується в грибах.

Як заміник цукру еритритол привернув увагу дослідників лише на початку 1990-х років та знайшов широке застосування у багатьох продуктах

					НУХТ БТЕК 05.01.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Паляниця Д.В.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					6	74
Консультант								
Н. контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						6 <b>Кафедра БТМ</b>		

харчування так і засобах для догляду за порожниною рота . Завдяки своєму антидіабетичному або антигіперглікемічному ефектам й здатності запобігати швидкому розмноженню мікроорганізмів [6].

У промислових масштабах цей цукрозамінник стали виробляти з 1990 року шляхом ферментації вуглеводів пшеничного або кукурудзяного борошна. Виробничий процес порівняний з отриманням пива або вина. Після бродіння сировину очищають і кристалізують, та сушать. У процесі отримують попошок типового вигляду, що нагадує звичайний столовий цукор. Таким чином, еритритол є натуральним 100% чистим підсоложувачем[2].

Дослідження стану здоров'я пацієнтів, що споживали еритритол, підтвердили його здатність, на відміну від інших поліолів, легко всмоктуватися з тонкого кишечника після чого еритритол, не метаболізується системно і виводиться із сечею у незміненому вигляді. Такий метаболічний профіль робить еритритол некалорійним, він характеризується високою толерантністю у шлунково-кишковому тракті та не підвищує рівень глюкози в крові. Такі побічні ефекти, як діарея і здцття, можуть виникнути лише при надмірному споживанні цього заміника цукру. Еритритол може діяти як антиоксидант і може покращувати функцію ендотелію у людей з діабетом 2 типу[7].

Еритритол можна отримати хімічними методами, але ці методи не мають широкого застосування зважаючи на високу вартість або низьку специфічність. Через недоліки хімічного синтезу, еритритол почали отримувати за допомогою біотехнології. Сьогодні в промислових масштабах еритритол отримують у результаті процесів бродіння, здебільшого за культивування дріжджів. Тому актуальним є дослідження і розроблення технології біосинтезу еритритолу з *Candida magnoliae* .[9].

*Candida magnoliae* в 2018 році отримала наукову назву *Starmerella magnoliae*[3].

Ці дріжджі, виділено з стільників. Вони є промислово важливими дріжджами з високою здатністю продукувати еритритол, що свідчить про наявність ферментів, які метаболізують еритрозу[4].

З метою аналізу фізіологічних властивостей *C. magnoliae* було проведено дослідження схеми використання цукру. На відміну від більшості дріжджів, *C. magnoliae* може використовувати, як джерелу вуглецю не тільки глюкозу, а й фруктозу, що заслуговує на позначення фруктофільних дріжджів. Така своєрідна закономірність використання цукру *C. magnoliae*, схоже, пов'язана з еволюційним середовищем[4].

Новизною роботи є використання штаму *Candida magnolia* КССМ-10160, використання якого дає змогу отримати вищу специфічну активність щодо відновлення еритрози до відповідного спирту еритритолу, порівняно з іншими розглянутими штамами мікроорганізмів.

Проектований технологічний процес виробництва еритритолу включає проведення допоміжних робіт, які, крім етапів підготовки і стерилізації поживних середовищ для одержання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу, мають особливість – підготовку аераційного повітря для культивування біологічного агента в аеробних умовах. Етапи основного технологічного процесу складаються з підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 50м<sup>3</sup>.

Мета роботи: розроблення технології культивування штаму *Candida magnoliae* КССМ-10160 для отримання еритритолу з високим виходом.

## РОЗДІЛ 1. Характеристика еритритолу

Еритритол - це підсолоджувач з сімейства поліолів – речовин, хімічна структура яких є аналогічною структурі цукрових спиртів. Молекула еритритолу містить залишки сахариду та спиртів[2]. Точка плавлення данної речовини 121 °С, точка кипіння становить від 329 до 331 °С.

В 1848 році ця речовина вперше була отримана Джоном Стенхаусом, британським хіміком. Англійська назва - erythritol або 1,2,3,4-butanetetrol, хімічна формула  $C_4H_{10}O_4$ . Еритритол має вигляд кристалічного порошку без яскравого запаху, характеризується цікавим «ментоловим» післясмаком. В 2008 році еритритол був зареєстрований в Євросоюзі та в Україні, у якості харчової добавки під кодом E968.

Наявність еритритолу зустрічається у водоростях і лишайниках, ягодах (кавуні, полуниці) також в ферментованих продуктах (вині, місо, сирах), наявний в деяких стиглих фруктах( груші, винограді та дині), горіхах (фісташки ), а також він в незначних кількостях міститься в грибах [3].

У промислових масштабах дану харчову добавку почали виготовляти з 1990 року за допомогою процесу ферментації вуглеводів пшеничного або кукурудзяного борошна. Після закінчення етапу бродіння, сировина очищається, кристалізується, сушиться. У данному процесі отримують порошок типового вигляду, що нагадує простий столовий цукор. Таким чином, еритритол є натуральним 100% чистим підсоложувачем.

Детальні дослідження на тваринах визначили, що еритритол не має канцерогенного або тератогенного потенціалу [3].

Дослідження стану здоров'я пацієнтів, які використовували в раціоні еритритол, підтвердили його здатність, легко всмоктуватися з тонкого кишечника після чого еритритол, не метаболізується системно і виводиться із сечею у незміненому вигляді.

					НУХТ БТЕК 05.01.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив	Паляниця Д.В.				РОЗДІЛ 1. Характеристика еритритолу	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Буценко Л.М.						9	74
Консультант								
Н. контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							
						9 <b>Кафедра БТМ</b>		

Цей метаболічний профіль робить еритритол некалорійним, він характеризується високою толерантністю у шлунково-кишковому тракті та не підвищує рівень глюкози в крові. Такі побічні ефекти, як діарея і здуття, можуть виникнути лише при надмірному споживанні цього замітника цукру. Еритритол може діяти як антиоксидант і може покращувати функцію ендотелію у людей з діабетом 2 типу[7].

Дослідження показали що еритритол не використовується для живлення хвороботворними бактеріями, які присутні у порожнині рота, тому при його споживанні відсутній ризик розвитку карієсу зубів. Через його особливості, цукрозаамінник часто використовують у виробництві жувальних гумок і зубної пасти. До переваг також входить те, що цей замітник цукру може зменшити зубний наліт і зменшити ризик захворювань ротової порожнини [5]. У дослідженні на тваринах встановлено антиоксидантні властивості еритритолу [6].

Еритритол використовують в якості компонента ліків для усунення неприємного запаху і гіркоти, а також у деяких енергетичних напоях[2].

Таблиця 1.1

Порівняльна характеристика підсолоджувачів [7]

<i>Властивості</i>	<i>Цукор</i>	<i>Ксиліт</i>	<i>Сорбіт</i>	<i>Еритритол</i>
<i>Коефіцієнт солодкості</i>	1	1	0,6	0,7
<i>Вміст калорій у 100 г, ккал/г</i>	398	243	260	20
<i>Глікемічний індекс</i>	100	7	4	1
<i>Термообробка</i>	Можлива	можлива	можлива	можлива

<i>Негативний вплив на зуби</i>	Так	ні	ні	ні
---------------------------------	-----	----	----	----

Переваги еритритолу:

- інсуліновий індекс
- низький глікемічний індекс, тобто речовина підійде для використання людьми, які страждають на цукровий діабет. Також еритритол можна використовувати для профілактики цього та інших захворювань, пов'язаних із порушеннями обміну речовин;
- низький рівень калорійності, що дозволяє включати підсолоджувач у дієту для схуднення;
- на відміну від інших цукрових спиртів, не спричиняє руйнування зубів, допомагає в частковій ремінералізації зубної емалі;
- стійкість до впливу високих температур – еритритол додають до гарячих напоїв та до різноманітних страв;
- вважається антиоксидантом, тобто має здатність поглинати вільні радикали;

Недоліки еритритолу:

- висока ціна;
- схильний до кристалізації
- має меншу розчинність, ніж у цукру;
- мала гігроскопічність;
- охолоджувальний ефект.

Галузі застосування еритритолу:

- Харчова (енергетичні напої, діабетичні солодощі, спортивне харчування, дієтичні кондитерські вироби)
- Косметична (зубні пасти, креми, ополіскувачі для ротової порожнини)
- Фармакологічна (харчова добавка для поліпшення смакових якостей лікарських препаратів)

Оскільки дослідження показують, що вживання еритритолу позитивно впливає на стан зубів, його додають в зубні пасти, засоби по догляду за порожниною рота, жувальні гумки.

У продажу цукрозамінник зустрічається у порошкоподібній формі під такими назвами: Erythritol (Now Foods Real Food), еритритол (виробник Green Leaf), Erythri-Sweet (Erythri-Sweet), All Natural Zero Calorie Free Sweetener (Wholesome Sweeteners).

Еритритол додають до складу різних сумішей, де він може виступати, як основна речовина чи як наповнювач для високоінтенсивних підсолоджувачів (що мають великий коефіцієнт солодкості). Також його поєднують з іншими речовинами, щоб покращити їх смак та текстуру. А вони, у свою чергу, маскують охолоджувальний ефект еритритолу, який є не завжди бажаним.

Популярні суміші з еритритолом у складі:

-Fito Forma (еритритол і стевія) – у п'ять разів солодший за цукор, має приємний смак без будь-яких присмаків, підходить для термообробки;

-Fit Parad – № 1, 10 (еритритол, сукралоза, стевіозид, екстракт топінамбуру), № 7 (Еритритол, сукралоза, стевіозид), № 8, 14 (Еритритол, стевіозид);

-iSweet (складається з еритритолу на 99,5% плюс екстракт фрукта Луо Хан Гуо);

-Lakanto Monkfruit Sweetener (еритритол та екстракт Луо Хан Гуо);

-Lite and Sweet (еритритол та ксиліт);

-Truvia (еритритол є основним інгредієнтом)[7].

Форма випуску еритритолу: розсипний порошок в упаковці в різноманітних фасовках, від 250 гр до 1 кг.

## РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика

### біологічного агента *Candida magnoliae*

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

##### Методи виробництва еритритолу:

###### *Хімічний метод*

Для виготовлення еритритолу було винайдено декілька хімічних методів. В 1943 був виданий перший патент на синтез еритритолу з 2-бутен-1,4-діолу. Субстрат був галогенований, а пізніше омилений. Більшість методів мають спільну частину – це гідрування з використанням металевих або металооксидних каталізаторів. Гідрування диалкілового ефіру винної кислоти в метанолі або розчині етанолу призводить до утворення суміші еритритолу і треїтолу. Необхідними умовами є високий тиск (20 МПа) і температура (125–200 °С). Реакція з L-винною кислотою в якості субстрату вимагає більш м'яких умов (120–180 °С, 4–10 МПа), але основним продуктом є треїтол. Етап ізомеризації можна проводити до або після гідрування. Іншим можливим субстратом являється діальдегідний крохмаль, але побічним продуктом гідрування є етиленгліколь.

Жоден з цих методів не отримав широкого застосування через високу вартість або низьку специфічність. Враховуючи бурхливий розвиток електрохімічного виробництва, в останні роки почали отримувати еритрозу, а пізніше еритритол шляхом електролітичного декарбоксілювання арабінової або рибонової кислоти. Субстрати для реакції отримують шляхом декарбоксілювання цукрів С-6. У 2013 році компанія Dynamic Food Ingredients Corporation запустили виробництво еритритолу промислового масштабу з використанням кукурудзи як початкового джерела цукру, і, за словами власників, отриманий вихід еритритолу був вищий за очікуваний.

Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата	НОУХТ БТЕК 05.01.14 КР ПЗ		
Розробив	Паляниця Л.В.				Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Буценко Л.М.					13	74
Консультант					13		
Н. контр.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Затверд.	Стабніков В.П.						

### *Біотехнологічний метод*

Через недоліки хімічного синтезу, про який йшлося вище, нині в промислових масштабах еритритол отримують в результаті процесів бродіння, здебільшого за культивування дріжджів. Також він синтезується деякими молочнокислими бактеріями. Утворення еритритолу дуже поширено серед дріжджоподібних грибів: *Trigonopsis*, *Candida*, *Pichia*, *Moniliella*, *Yarrowia*, *Pseudozyma*, *Trichosporonoides*, *Aureobasidium* і *Trichoderma*. [9] Організми, що використовуються для промислового виробництва: *Moniliella pollinis*, *Trichosporonoides megachiliensis*, а нещодавно також *Yarrowia lipolytica*. Комерційно еритритол виробляється лише кількома компаніями в усьому світі, зокрема: Baolingbao Biotechnology (Dezhou Shi, Китай), Bolak Corporation (Сеул, Південна Корея), Cargill Food & Pharma Specialties (Міннеаполіс, Міннесота), Jungbunzlauer (Базель, Швейцарія), Mitsubishi Chemical Corporation (Токіо, Японія) та O'Laughlin Corporation (Тяньцзінь, Китай) [9]. Головним субстратом для великомасштабного виробництва еритритолу являється глюкоза, отримана з хімічно і ферментативно гідролізованої кукурудзи або пшениці. Відділення та очищення еритритолу це важлива частина виробничого процесу, яка має вирішальне значення для застосування еритритолу як харчової добавки. Вилучення еритритолу з культурального середовища зазвичай вимагає відділення від ферментуючих мікроорганізмів з наступною іонообмінною хроматографією та кристалізацією. Фракція еритритолу, вилучена на етапі хроматографічного поділу, також може бути піддана обробці активованим вугіллям [9].

### *Біосинтез еритритолу в дріжджах*

Характерною особливістю дріжджів, що виробляють еритритол, є їхня здатність рости в присутності високих концентрацій солі та цукру, і в багатьох випадках ці умови посилюють виробництво поліолів. Біосинтез еритритолу дріжджами є багатоступеневим метаболічним шляхом, який протікає в основному через пентозофосфатний шлях. Цей метаболічний шлях складається з двох різних фаз. Продуктами першої фази окислення є НАД(Ф)Н

і рибулозо-5-фосфат. Кінцевим продуктом неокислювальної фази є еритрозо-4 фосфат. Високу активність ключових ферментів пентозофосфатного шляху (глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, фосфоглюконатдегідрогенази, транскетолази та трансальдолази) вимірювали під час виробництва еритритолу *Moniliella megachiliensis* з глюкози. Кінцевими етапами запропонованого шляху є дефосфорилування фосфату еритрози-4 до еритрози і, нарешті, відновлення до еритритолу з використанням однієї молекули НАД(Ф)Н. Фермент еритрозоредуктази був ідентифікований та описаний у кількох дріжджах, що продукують еритритол, включаючи: *Torula sp*, *Moniliella megachiliensis*, *Candida magnoliae* та *Yarrowia lipolytica*.

В дослідженнях для виробництва еритритолу найчастіше, як субстрат використовується глюкоза [9]. Використання дисахаридів або складних цукрів може бути обмежено здатністю до гідролізу О-глікозидних зв'язків окремих видів дріжджів. Відносно новим субстратом для виробництва еритритолу є гліцерин, який виявився хорошим джерелом вуглецю з *Yarrowia lipolytica*.

Більшість штамів, що продукують еритритол, мають тенденцію виробляти інші цукрові спирти, такі як гліцерин. Гліцерин являється побічним продуктом, на додаток до еритритолу, що ускладнює його очищення через подібні фізичні та хімічні властивості та хімічну структуру до еритритолу. Наприклад, штам, що продукує еритритол, *Moniliella tomentosa var polinis*, виробляє еритритол з високим виходом 41%, але паралельно вона виділяє гліцерин і рибітол як побічний продукт. Тому він не використовується для виробництва.

Еритритол був комерційно виготовлений з використанням мутанта *Aureobasidium*, який продукує еритритол з високим виходом 44%. Однак, не зважаючи на високу продукцію цільового продукту, *Aureobasidium* складніше культивувати, ніж дріжджі.

Еритрозоредуктаза (**ER**) каталізує останній етап виробництва еритритолу, який відновлює еритрозу до еритритолу з використанням

НАД(Ф)Н як кофактора. **ER** здобула інтерес через його важливість у виробництві еритритолу.

*Candida magnoliae*, виділений із стільників, виробляє значну кількість еритритолу, що свідчить про наявність ферментів, що метаболізують еритрозу.

Ген, що кодує новий **ER**, був виділений з осмофільних дріжджів *C. magnoliae*. Ген **ER**, що складається з 849 нуклеотидів, кодує поліпептид з розрахунковою молекулярною масою 31,4 кДа. Виведена амінокислотна послідовність **ER** показала високий ступінь подібності з іншими членами надсімейства альдо-кеторедуктази, включаючи три ізоферменти **ER** з *Trichosporonoides megachiliensis*. Неушкоджену кодуючу область **ER** від *C. magnoliae* клонували, функціонально експресували в *Escherichia coli* за допомогою комбінованого підходу злиття генів і спільної експресії молекулярного шаперона, а потім очищали до однорідності. Фермент показав оптимальні температури і рН при 42°C і 5,5 відповідно. Серед різноманітних альдоз, *C. magnoliae* **ER** виявив високу специфічну активність щодо відновлення еритрози до відповідного спирту еритритолу. *C. magnoliae* є одним із найефективніших виробників еритритолу. [10]

Рис. 2.1

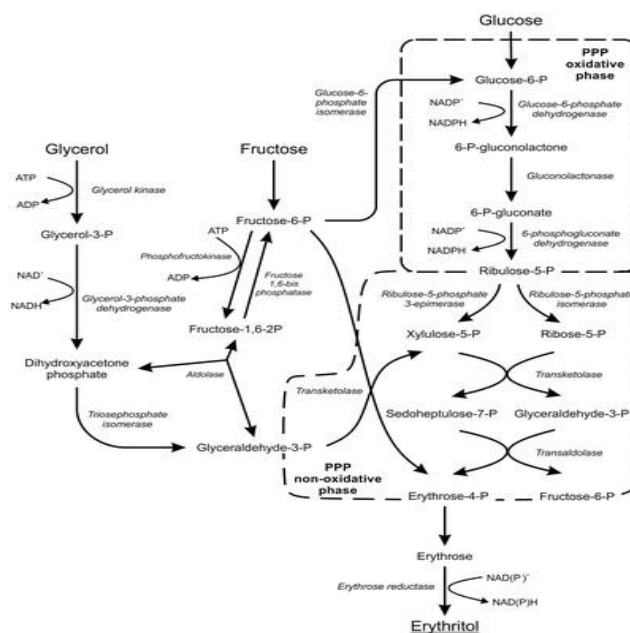


Схема біосинтезу еритритолу[9]

Продуцентом харчової добавки E968 є мутантний штам *Candida magnoliae*. Він здатний синтезувати еритритол з більш високим виходом ніж дикий штам *Candida magnoliae*.

*Candida sp.* був ізольований з гребінця. Шматочок гребінця переносили в середовище, що містить 40% глюкози та 1,0% дріжджового екстракту, та інкубували при 30°C. Бульйон розбавляли та інкубували при 30°C на чашці з агаром, що містить 20% глюкози, 1,0% дріжджового екстракту і 2,0% агару. Після інкубації отриманих колоній на ферментаційному середовищі, яке складалося з 10% глюкози та 1,0% дріжджового екстракту, культуральний бульйон центрифугували для видалення клітин, а супернатант аналізували на визначення еритритолу. Для виробництва еритритолу був обраний штам з високою продукцією еритритолу. Штам був ідентифікований як *Candida magnoliae* компанією Microcheck Co. [11]

Штам *Candida magnoliae* інкубують на середовищі для росту, яке складається з 2,0% глюкози, 1,0% дріжджового екстракту та 1,0% пептону. Після вирощування бульйон розносили на агарову чашку, що містила 10 % глюкози, 0,8 % дріжджового екстракту, 0,3 % пептону і 2,0 % агару, і отриману колонію переносили на середовище для споруляції, що містило 0,1 % глюкози, 1,0 % дріжджового екстракту і 2,0% агару. Утворену спору збирали автоклавною дистильованою водою і відбирали додаванням 10 мМ 2-меркаптоетанолу протягом 30 хвилин і обробкою літиказою 0,5 мг/мл протягом 4 годин. [11]

Відібрані спори обробляли EMS (етилетанолсульфонат) та інкубували на середовищі, що складає 30% глюкози, 18% KCl, 0,1% дріжджового екстракту і 2,0% агару. Одну колонію було обрано як швидко зростаючі мутанти для відбору мутанта з високою стійкістю до солі. Відібрану колонію переносили на ферментаційне середовище для перевірки активності продукування еритритолу у колбі для струшування. [11]

Після інкубації при температурі 30°C і 240 об/хв протягом 72 годин був відібраний мутант з високим вмістом еритритолу. Дані мутантні клітини

були депоновані в Корейському культурному центрі мікроорганізмів з номером доступу КССМ-10160 згідно з Будапештським договором[11].

Одним із найважливіших факторів, що визначають кінцеву концентрацію еритритолу після ферментації, є фактична система культивування. Для виробництва еритритолу був обраний штам з високою продукцією еритритолу. Штам був ідентифікований як *Candida magnoliae*. З дикого штаму виділили мутантний штам, під назвою *Candida magnoliae* КССМ-10160. Культивування *Candida magnoliae*, факультативного анаероба, в нашому випадку на рідкому середовищі буде здійснюватися глибинним періодичним культивуванням.

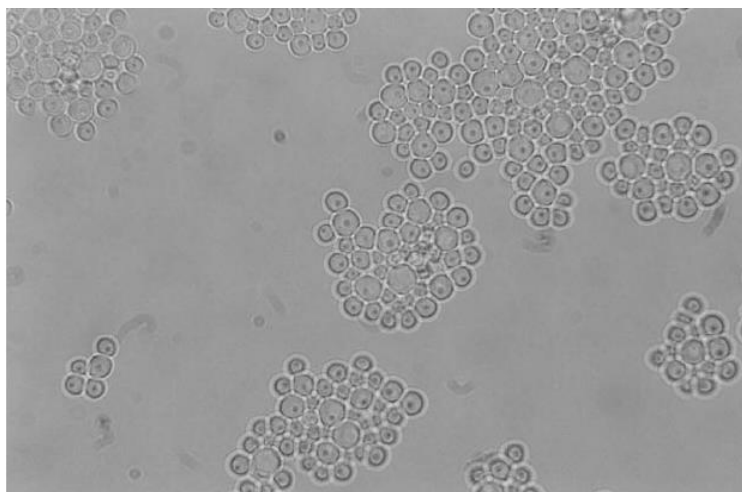
Мутантні клітини *Candida magnoliae* КССМ-10160 культивували у 250-мл колбі, яка містила 50 мл ростового середовища (2,0% глюкози, 1,0% пептону, 1,0% дріжджового екстракту) при 30°C. і 240 об/хв протягом 48 годин, і цю посівну культуру переносили в 250-мл колбу для отримання еритритолу. Експеримент в колбі з ферментаційним середовищем проводили при температурі 280°C та початковому рН 7 і 240 об/хв протягом 84 годин. Середовище бродіння складалося з 25% глюкози як джерела вуглецю та 0,5% дріжджового екстракту, 0,2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  та 0,04%  $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ [11].

## **2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Candida magnoliae***

### ***Морфолого-культуральні ознаки.***

Дріжжеподібні гриби роду *Candida* - одноклітинні мікроорганізми.

За культивування в лабораторії штами *Candida magnoliae* виглядять як великі, круглі, білі або кремові колонії, мають запах дріжджів на чашці з агаром при кімнатній температурі. Не мають псевдогіф. Клітини яйцевидної та подовженої форми (1,5-2,5x2,5-4) мкм, є поодинокі та попарно. Аскоспор немає. В різних умовах вони утворюють бластоспори і псевдоміцелій (нитки подовжених клітин)[12].

*Морфологічні особливості Candida magnoliae [13]****Фізіолого-біохімічні ознаки.***

Осмофільні дріжджі. Мезофіл. Факультативний анаероб. Мають метаболізм бродильного типу. Сприятливими умовами для *Candida* вважається температура 21–37 °С, притаманна здатність рости при температурі 30-37°С. Добре ростуть на нейтральних і слабокислих середовищах, оптимальне середовище існування при рН =5,8-6,5, також можуть довго переносити різкокислі середовища, здатні ферментувати та асимілювати вуглеводи[14].

**2.3. Таксономічний статус *Candida magnoliae***

Домен Eukaryaota

Царство *Fungi*

Підцарство *Dikarya*

Відділ *Ascomycota*

Підвідділ *Saccharomycotina*

Клас *Saccharomycetes*

Підклас *Saccharomycetidae*

Порядок *Saccharomycetales*

Родина *Saccharomycetaceae*

Рід *Candida* (*Starmerella*) Вид *magnoliae*

Штам: КССМ-10160[15]

## РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

### 3.1. Потреба у еритритолі

Певна частина людей страждають на ожиріння й діабет. Багатьом людям дуже складно відмовитись від цукоровмістних продуктів, оскільки вони стимулюють у мозку утворення гормону щастя - серотоніну. Еритритол є здоровою альтернативою цукру.

Головна перевага еритритолу, це те що при споживанні він не підвищує рівень цукру в крові. Дана речовина низькокалорійна, не містить жирів і не впливає на інсулін. Еритритол не збільшує кількість поганого холестерину в крові і не призводить до розвитку атеросклерозу. Люди хворі на діабет та серцево-судинні захворювання, люди з групи ризику, а також люди що потребують зниження маси тіла, можуть використовувати цей підсолоджувач без шкоди для здоров'я.

Оскільки еритритол є природним замінником цукру для визначення рівня потреб населення в еритритолі, розглянемо тенденції споживання населенням цукру.

Таблиця 3.1

Тенденція виробництва, споживання та експорту цукру в Україні[8]

Роки	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
1	2	3	4	5	6	7	8
Фонди споживання цукру населенням України, тис. тон	1795	1704	1686	1559	1528	1420	1290
Споживання цукру на одну особу за рік, кг	38,1	37,1	37,1	36,3	35,7	33,3	30,4
Виробництво цукру-піску, тис. тон	2139	1805	1263	2053	1459	2021	2043

					НУХТ БТЕК 05.01.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив	Паляниця Д.В.				РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Буценко Л.М.						20	74
Консультант								20
Н. контр.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Затверд.	Стабніков В.П.							

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

Візьмемо для розрахунку, що нам потрібно еритритолом замінити 1 % споживання цукру, в зв'язку з тим що крім еритритолу населення споживає і інші підсолоджувачі.

На діабет хворіє близько 2,5% населення України, враховуючи наявність на ринку величезної кількості цукрозамінників, врахуємо що лише 10% від потреб діабетиків, будуть покриватися еритритолом. Тому потрібно замінити 0,25% споживання цукру еритритолом. Також потрібно враховувати, що велика частка еритритолу експортується з-за кордону, тому поставимо задачу виробляти 10% від загальних потреб в еритритолі, а це буде 0,025% від споживання цукру.

Отже, для забезпечення населення еритритолом потрібно 0,025 % від 1 290 000 тон цукру, що складає 322,5 т, або ж 322 500 кг еритритолу.

Для одержання еритритолу у промислових розмірах дуже важливим є вибір підходящого штаму-продуцента, який повинен бути як економічно вигідним, так і достатньо продуктивним щоб забезпечувати високий вихід цільового продукту. У представленій роботі пропонується для синтезу еритритолу використати, виділений мутантний штам *Candida magnoliae* КССМ-10160. Продуктивність запропонованого штаму-продуценту становить 117 г/л, або 117 кг/м<sup>3</sup> [11].

Маючи такі вихідні дані, ми можемо розрахувати кількість культуральної рідини, необхідної для одержання 322 500 кг еритритолу:

$$117 \text{ кг} - 1 \text{ м}^3$$

$$322 \text{ 500 кг} - X \text{ м}^3$$

$$X = 322 \text{ 500} / 117 = 2 \text{ 757 м}^3 \text{ культуральної рідини.}$$

Також варто враховувати, що втрати під час очищення і виділення еритритолу дорівнює 10% (втрати при очищенні та кристалізації) і тому об'єм культуральної рідини повинен становити:

$$V_{\text{кр}} = 2 \text{ 757} / (1-0,2) = 2 \text{ 757} / 0,8 = 3 \text{ 446,25 м}^3 \text{ культуральної рідини.}$$

Отже, для того щоб забезпечити населення України вітчизняною субстанцією еритритолу потужність виробництва повинна становити 322 500 кг/рік, а кількість культуральної для одержання цукрозамінника з урахуванням втрат при екстракції і очищенні становить 3 446,25 м<sup>3</sup>.

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

Щоб забезпечити потреби населення в еритритолі маємо одержати (з урахуванням втрат при екстракції і очищенні) 3 446,25 м<sup>3</sup> культуральної рідини.

Розрахуємо ту кількість культуральної рідини, що необхідно отримати за цикл ферментації та розрахуємо кількість стадій, що потрібні для приготування посівного матеріалу.

Кількість робочих днів приймаємо на рік – 330. Ефективний фонд робочого часу  $Neф. = 330 \times 24 = 7920$  год.

Розрахунок циклу роботи ферментера:

$$T_{цф} = T_{ф} + T_{др} = 48 + 11 = 59 \text{ (год), де}$$

$T_{ф}$  – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

$T_{др}$  – тривалість допоміжних робіт (допоміжні допоміжні роботи в себе включають: перевірку на герметичність (2 год), огляд та миття (2 год), охолодження (1,5 год) та стерилізація (2 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1,5 год).

За рік кількість циклів складає:

$$n_{ц} = \frac{Neф}{T_{цф}} = 7920 / 59 = 134 \text{ цикла}$$

Об'єм культуральної рідини, що отримується за цикл

$$V_{кр}^{н} = V_{кр}^{р} / n_{ц} = 3\,446,25 / 134 = 25,72 \text{ м}^3$$

Вибираємо для біосинтезу біореактор об'ємом 50000 л

Коефіцієнт заповнення  $K_z = 0,6$ . Об'єм культуральної рідини складає

$V_{к.р} = 30 \text{ м}^3$ , що більше зарозрахований, тобто ферментер обраний правильно.

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Беручи інформацію із розрахунків наведених в пункті 3.3 , потрібно порахувати кількість стадій для підготовки посівного матеріалу, яку рахують, визначивши робочий об'єм апарату.

Робочий об'єм ферментера ( $V_{роб}$ ) визначається за допомогою формули:

$$V_{роб} = V_{г.ф} \times K_{зап},$$

$V_{г.ф}$  – геометричний об'єм ферментера (заданий керівником);

$K_{зап}$  – це коефіцієнт заповнення.

Виробниче культивування *Candida magnoliae* для одержання еритритолу проводять у біореакторі об'ємом  $50 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення 0,6. Робочий об'єм ферментера дорівнює:

$$V_{роб.1} = 50 \cdot 0,6 = 30 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу}$$

Стільки інокулючої речовини можна отримати під час культивування бактерій у посівному апараті об'ємом  $5 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Для засіву посівного апарату (одержання  $3 \text{ м}^3$  культуральної рідини) потребується:

$$V_{роб.2} = 3 \cdot 0,6 = 1,8 \text{ м}^3$$

Стільки інокулючої речовини можна отримати під час культивування бактерій у посівному апараті об'ємом  $0,5 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Для засіву посівного апарату (одержання  $0,3 \text{ м}^3$  культуральної рідини) необхідно:

$$V_{роб.3} = 0,3 \cdot 0,6 = 0,18 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу}$$

Стільки посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування бактерій у посівному апараті об'ємом  $0,05 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення 0,6.  $0,03 \text{ м}^3$  ( $30 \text{ л}$ ) культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{роб.4} = 0,03 \cdot 0,6 = 0,018 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Приготування данної кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом  $5 \text{ л}$  з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Для одержання  $3 \text{ л}$  культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{роб.5} = 3 \cdot 0,6 = 1,8 \text{ л посівного матеріалу}$$

Стільки інокулючої речовини можна отримати під час культивування бактерій у колбах на качалці. З п'яти етапів складається процес одержання посівного матеріалу для того щоб забезпечити виробничий біосинтез еритритолу у апараті іоб'ємом 50 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,6 .

### 3.5. Біосинтез еритритолу

Біосинтез еритритолу дріжджами це багатоетапний метаболічний шлях, який який здійснюється через пентозофосфатний шлях. Він складається з двох окремих фаз. Перша окисна фаза продуктами якої є НАДФН і рибулозо-5-фосфат. Продуктом неокисної фази є еритрозо-4 фосфат. Висока активність ключових ферментів пентозофосфатного шляху (глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, фосфоглюконатдегідрогенази, транскетолази та трансальдолази) була виміряна під час виробництва еритритолу із глюкози . Останніми етапами запропонованого шляху є дефосфорилування еритрозо-4-фосфату до еритрози і, нарешті, відновлення до еритритолу з використанням однієї молекули НАДФН[9]

#### 3.5.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у *Candida magnoliae*

Глюкоза як субстрат найбільш широко використовується в дослідженнях для виробництва еритриту.

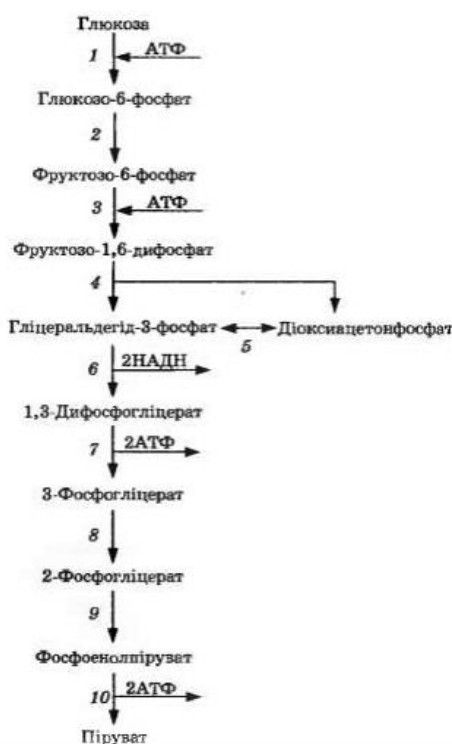
Катаболізм глюкози у процесі зброджування її до етанолу здійснюється фруктозо- 1,6-дифосфатним шляхом (гліколіз). Третя назва цього шляху катаболізму глюкози — шлях Ембдена-Мейергофа-Парнаса. Вперше гліколіз був відкритий у м'язових тканинах. Він функціонує у тварин, рослин і багатьох мікроорганізмів. При функціонуванні гліколізу глюкоза перетворюється на піруват . Процеси перетворення глюкози на гліцеральдегід-3-фосфат пов'язані з витратами енергії. Під час подальшого окиснення гліцеральдегід-3-фосфату до пірувату енергія вивільнюється. Перетворення 1,3- дифосфогліцерату на 3-фосфогліцерат спряжено з фосфорилуванням АДФ і утворенням АТФ (фермент фосфогліцераткіназа). Ця реакція є одним з

пунктів гліколізу, в яких АТФ утворюється в результаті фосфорилування на рівні субстрату.

Фосфоенолпіруват (ФЕП) - це друга сполука, яка містить фосфорильний зв'язок з високою енергією гідролізу: при утворенні пірувату з ФЕП фосфат переноситься на АДФ з утворенням АТФ (фермент піруваткіназа). Ця реакція є другим пунктом утворення АТФ на рівні субстрату у шляху Ембдена-Мейергофа-Парнаса (Рис. 3.1).

Рис. 3.1

### Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Мейергофа-Парнаса.



### 3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у еритритол

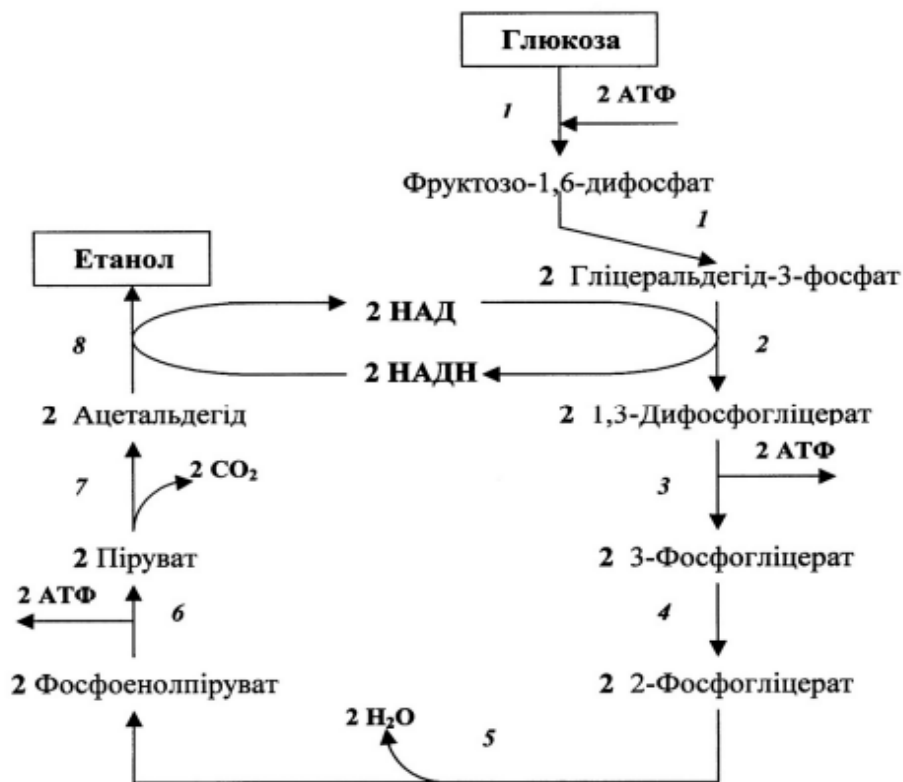
В біосинтезі еритритолу з *Candida magnoliae* ростовим субстратом виступає глюкоза. Проходять процеси бродіння. Катаболізм глюкози у процесі зброджування її до етанолу та CO<sub>2</sub> здійснюється за допомогою гліколітичного шляху. Глюкоза окиснюється до пірувату. Перетворення пірувату на етанол проходить у два етапи:

1) піруват декарбоксилюється піруватдекарбоксилазою до ацетальдегіду;

2) ацетальдегід відновлюється алкогольдегідрогеназою до етанолу за участю НАДН (Рис. 3.2).[17]

Рис. 3.2

Зброджування дріжджами глюкози з утворенням етанолу



Ферменти: **1** – ферменти шляху Ембдена–Мейєргофа–Парнаса;  
**2** – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа; **3** – фосфогліцераткіназа;  
**4** – фосфогліцератмутаза; **5** – енолаза; **6** – піруваткіназа;  
**7** – піруватдекарбоксилаза; **8** – алкогольдегідрогеназа

## РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми

### 4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Для виробництва еритритолу був обраний штам з високою продукцією еритритолу. Штам був ідентифікований як *Candida magnoliae*. З якого виділили мутантний штам *Candida magnoliae* КССМ-10160. Культивування *Candida magnoliae*, факультативного анаероба, в нашому випадку проходить на рідкому середовищі та буде здійснюватися глибинним періодичним культивуванням.

Обраний спосіб культивування ґрунтується на вирощуванні мікроорганізмів, що занурені та рівномірно розподілені у рідкому живильному середовищі. Культивування потребує вищої культури виробництва, контролю за процесами приготування і стерилізації живильного середовища, очистки повітря, що надходить на аерацію, культивування.

Глибинне культивування біологічних агентів має низку переваг перед поверхневим і дозволяє:

- повну автоматизацію процесу культивування;
- зменшити площі для виробництва;
- можливість переходу до безперервного культивування;
- покращення санітарно-гігієнічних умов праці персоналу.
- більш раціональне використання поживного середовища
- зменшення кількості відходів
- виготовлення препарату з меншим відсотком домішок

Глибинне культивування мікроорганізмів можна організувати періодичним і безперервним способами[18].

За періодичного культивування необхідні субстрати вводяться на початку бродіння, а продукт і супутні продукти вилучаються після виснаження всіх субстратів.

					НУХТ БТЕК 05.01.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив	Паляниця Л.В.				РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Буценко Л.М.						27	74
Консультант								27
Н. контр.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Затверд.	Стабніков В.П.							

Підвищення продуктивності за періодичного культивування досягається у системах з додатковим підживленням, де кількість субстрату оновлюється один чи кілька разів. Такий підхід дозволяє збільшити продуктивність і вихід еритритолу [19].

Для того щоб здійснити глибинне культивування мікроорганізмів використовують ферментери (біореактори). Ферментер – це герметичний циліндричний апарат зі сферичними кришкою й днищем. Оскільки, *Candida magnoliae* являє собою факультативний анаероб, оптимальна температура культивування становить 37 °С, та кислотність рН 7,0, можливий ризик забруднення сторонніми мікроорганізмами. Тому основною вимогою до ферментера є можливість організації процесу культивування продуцента в асептичних умовах. Для підтримання стерильних умов при біосинтезі *Candida magnoliae* апарат має бути абсолютно герметичними, а всі лінії трубопроводів повинні бути доступні до обробки гарячою парою. У ферментері мають бути штуцери для подачі середовища, стерильної води, стерильного повітря, посівного матеріалу, барботер, мішалка для перемішування і рубашка для підтримання необхідної температури культивування.

Дуже важливо для процесу переконатися, щоб у ферментері забезпечувався асептичний режим культивування, дотримувались всі параметри згідно оптимального росту продуцента і створювались сприятливі умови біосинтезу еритритолу. Для дотримання подібної вимоги ферментер має витримувати високу температуру стерилізації і працювати впродовж всього періоду культивування під надлишковим тиском.

В результаті, культивування *Candida magnoliae* проводять у ферментері який оснащено барботером для аерації культуральної рідини та перемішуючим пристроєм для додаткового масообміну [6].

#### **4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря**

Так як *Candida magnoliae*, потребує аеробних умов для інтенсивного накопичення біомаси, то для вирощування першої генерації в колбах, потрібно забезпечити постійну аерацію середовища. [7]

Культивування *Candida magnoliae*, здійснюється на рідкому середовищі глибинним періодичним культивуванням. Обраний штам здатний використовувати розчинений кисень, але його розчинність низька, тому будемо використовувати такі прийоми для підвищення швидкості розчинення - збільшення поверхні розділу газової і рідкої фаз, збільшення тиску кисню в газовій фазі. Це буде здійснюватися за рахунок барботера, також в додаток використовують турбіну мішалку закритого типу.

Згідно аналізу поживного середовища за рахунок вмісту дріжджового та м'ясного екстрактів при перемішуванні та аерації буде утворюватися піна, тому у ферментері потрібно передбачити механічні пристрої для піногасіння. Таким чином, культивування даного виду дріжджів здійснюється глибинним способом з постійною аерацією із забезпеченням асептики проведення процесу без підживлення.

Підготовку здійснюють в спеціальному приміщенні – компресорній, так як витрати аераційного повітря великі.

Підготовка аераційного повітря представляє з себе 5 етапів:

1) *Перший етап. Здійснюється забір атмосферного повітря*

На висоті 20 – 30 м реалізується оптимальний забір повітря, де кількість часток відносно стабільна та найменша. Процес відбувається за допомогою повітрозбірника, який розміщений у зоні чистого повітря, віддаленої від зон технологічних шкідливих викидів чи викидів систем витяжної вентиляції. Отвір для входу повітря закривається залізними ґратами. За допомогою вентилятора, через повітрозабірну шахту, повітря потрапляє до фільтру грубого очищення [20].

2) *Другий етап. Проходить грубе очищення повітря.*

Завдяки фільтрам попереднього очищення компресори захищені від забруднень та знижується кількість контамінантів, Попереднє грубе фільтрування повітря відбувається за допомогою використання набивних фільтрів. Вони складаються з волокнистих матеріалів. Фільтрування

відбувається за рахунок того, що частинки рухаючись з певною швидкістю затримуються на поверхні волокна інерційним механізмом осадження.

*3) Третій етап. Реалізується стабілізація термодинамічних показників повітря.*

Після стадії фільтрування потребується стабілізація термодинамічних показників, повітря стискається у компресорі, при стисненні його температура підвищується з 15 – 25 °С на вході з компресора до 250 °С на виході з неї, а далі подається в теплообмінник і охолоджується. Охолоджена вода, що подається в теплообмінник, є оборотною. Щоб стабілізувати потік повітря і попередити його пульсації потрібен ресивер. В ньому відбувається вирівнювання тиску в системі і забезпечується рівномірна подача повітря в фільтр [21].

*4) Четвертий етап. Проводиться попередня очистка повітря в головному фільтрі*

Головний фільтр виконує попереднє очищення повітря від мікроорганізмів й пилу (розмір частинок, що видаляються ,більше 1 мкм). Головний фільтр є циліндричною ємністю із сферичним дном та кришкою. В середині знаходяться дві решітки, між якими розташовують фільтрувальний матеріал. Заміну фільтрувального матеріалу здійснюють 2 рази за рік. У разі пошкодження, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу організують позачергову його заміну [22].

*5) П'ятий етап. Очистка аераційного повітря в індивідуальному фільтрі*

За допомогою мембрани відбувається видалення різного роду контамінантів (розмір частинок більше 0,2 мкм), процес засновано на ситовому ефекті. В якості фільтрувального матеріалу для індивідуального фільтру використовується скловата типу ЦФД з діаметром волокна 2,5 – 3 мкм й діаметром пор 0,2 мкм. Пористість сягає 80 %. Термостійкість скловати становить 400 °С. Ступінь очищення становить  $E = 99,999 \%$  [20].

### 4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

При необхідності проведення профілактичних, поточних і заключних дезінфекційних заходів на підприємствах ХП допускають використання лише тих дезінфекційних препаратів та мийних засобів, що внесені до Державного мийних засобів, і при умові наявності Свідоцтва про державну реєстрацію дезінфекційного засобу встановленої форми. Державний реєстр дезінфекційних засобів, затверджений 01.01.2009р., містить понад 450 найменувань дезінфекційних та мийних засобів.

Засоби подібного назначення, використовуються у чіткій відповідності до затверджених інструкцій та методичних вказівок. До дезінфікуючих засобів, які останнім часом використовуються а відносять: «Мікробак Форте», «Дезактив-М», «Аніоксид 1000», «Антихлор», « Біомой», «Біоклін», «Хлорdez», «Неохлор», «Дезактин», «Дезекон», «Дезефект», та ін., більшість з них у своєму складі містять активний хлор.

При виборі дезінфікуючого та мийного засобу, слід враховувати вартість та витрати на оброблювання площі виробничого приміщення. На 1 м<sup>2</sup> витрачається 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікувального засобу.

Проаналізувавши їх вартість та врахувавши об'єми обладнання та площі приміщень, можна зробити наступні висновки:

- для миття обладнання, інвентарю, комунікацій, тари доцільно використовувати мийний засіб Біомой;
- для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей – Мікробак Форте , оскільки він є мийно-дезінфікувальним засобом, що дає змогу заощадити кошти. [23]

### 4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Поживне середовище для виробничого біосинтезу *Candida magnoliae* з метою одержання еритритолу, має наступний склад, г/л:

Клітини *Candida magnoliae* КССМ-10160 культивують у 250-мл колбі, що містить 50 мл ростового середовища (2,0% глюкози, 1,0% пептону, 1,0% дріжджового екстракту) при 240 об/хв і 30°C. протягом 48 годин. Отриману

посівну культуру переносили в 250-мл колбу для отримання еритритолу. Експерименти в колбі з ферментаційним середовищем проводили при 280°C, початковому рН 7 і 240 об/хв протягом 84 годин.

Середовище бродіння складалося з 25% глюкози як джерела вуглецю та 0,5% дріжджового екстракту, 0,2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  та 0,04%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  [10].

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

Для цієї стадії необхідно 300 мл поживного середовища, тому стерилізацію будемо проводити в колбах.

Середовище ділять на такі композиції:

*Композиція А:* глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа);

*Композиція Б:*  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,015 МПа);

*Композиція В:*  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,015 МПа).

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

Для цієї стадії необхідно 3,0 л, 30 л та 300 л поживного середовища, тому стерилізацію будемо проводити в збірниках.

Середовище ділять на такі композиції:

*Композиція А:* глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа);

*Композиція Б:*  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,015 МПа);

*Композиція В:*  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,015 МПа).

***Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу***

Стадія виробничого біосинтезу потребує 30000,0 л поживного середовища, тому стерилізацію будемо проводити в збірниках.

Середовище ділять на такі композиції:

*Композиція А:* глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа);

*Композиція Б:*  $K_2HPO_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,015 МПа);

*Композиція В:*  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $(NH_4)_2SO_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,015 МПа).



РЗ-3	Реактор-змішувач для отримання розчину Мікробак Форте	Реактор-змішувач марки CR300. Фірма «Стройторгсервіс».	1	Реактор-змішувач обладнаний паровою сорочкою та пристроєм для перемішування об'ємом 12м <sup>3</sup> . з харчової нержавіючої сталі ISI 304
РЗ-5 РЗ-11 РЗ-16	Реактор-змішувач для приготування композиції А, яка містить термолабільні компоненти	Реактор-змішувач марки SE300. Фірма «Стройторгсервіс».. Підігрів середовища реалізується за допомогою металічних ТЕНів. Система дозволяє використання одноразових компонентів, такі як мішалки.	3	Реактор-змішувач обладнаний паровою сорочкою та пристроєм для змішування. Об'єми 3 л, 30 л, 300л та 3000 л. Швидкість обертів мішалки 50-300 об/хв., сталь AISI 3116L
Н-6 Н-12 Н-17 Н-20	Насос	Насос MS1 потужність 120-7600 л/год, діаметр шлангу 4 см.	4	Насос з магнітною муфтою
ЗП-7	Пристрій для засіву	Бачок для засіву, щоб вносити	1	Нержавіюча сталь

		посівний матеріал в інокулятор в стерильних умовах.		
Ф-8 Ф-13 Ф-21	Фільтр тонкої очистки	Фільтр класу F5 для стерилізуючої фільтрації . Марка(DIN 24185) Площа фільтрувально го матеріалу 2,9 . Продуктивність– 1700 м <sup>3</sup> /год.	3	Фторопласт , як фільтруючий матеріал
ФР-14	Ферментер	Ферментер модель КQ. Об'єм 50м <sup>3</sup> Перемішування макс. 750 об/хв. Максимальна температура 150°С. Потужність привода 10 кВт.	1	Нержавіюча сталь марки 3116L.
РЗ-19	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	Реактор-змішувач марки СЕ300. Фірма «Стройторгсервіс».. В залежності від типу продукту мішалку в середині апарату можна змінювати. Підігрів відбувається за	1	Реактор-змішувач екіпований паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Швидкість обертів мішалки 50-300 об/хв., сталь AISI 3116L

		допомогою металічних ТЕНів.		
Ін-22	BIOSTAT D-DCU-50	Інокулятор.Має вигляд циліндру з еліптичним днищем. Апарат містить односекційну сорочку, з трубою перетискування, та турбінною мішалкою. Містить відбійні перегородки. Ємність 50м <sup>3</sup> Потужність складає 1,5 кВт. Наявний клапан для відбору проб . Екіпований механічним піногасником. Виробник SartoriusStedimSystems(Німеччина).	1	Матеріал конструкції: нержавіюча сталь ІSІ304

## РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.

В технологічну схему виробництва еритритолу входять допоміжні роботи такі як: підготовка виробничих приміщень, підготовка обладнання та приготування поживного середовища. Також технологічна схема включає в себе технологічний процес: підготовка посівного матеріалу, біосинтез цільового продукту.

Технологічну схему біосинтезу еритритолу *Candida magnolia* надано в графічній частині проекту.

### **ДР 1. Санітарна підготовка виробництва**

Проводиться підготовка до роботи приміщень, обладнання, комунікацій та персоналу.

#### **ДР 1.1. Підготовка персоналу**

Персонал переодягається в технологічний одяг та проводить санітарну обробку рук.

#### **ДР 1.2. Підготовка дезінфікуючих і миючих розчинів**

##### **ДР 1.2.1. Підготовка робочого розчину Біомою**

Виконують приготування миючого розчину, який використовується на подальших етапах підготовки виробництва. Для миття обирають 0,3 % розчин Біомою. Приготування: 3 г концентрату Біомою розбавляють 1 літром води

##### **ДР 1.2.2. Підготовка робочого розчину Мікробаку Форте**

Проводять приготування 1,00% розчину Мікробаку Форте, який використовується на подальших етапах підготовки виробництва. Приготування: 8 л розчину потрібно взяти 80 мл вихідного концентрованого препарату та 7,92 л води..

#### **ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень**

З використанням 0,3% розчину Біомою та 1,00% розчину Мікробаку

					НУХТ БТЕК 05.01.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив	Паляниця Д.В.				РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Буценко Л.М.						38	74
Консультант								38
Н. контр.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Затверд.	Стабніков В.П.							

форте проводиться обробка стін, підлоги та робочих поверхонь.

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

##### *ДР 1.4.1. Миття та ополіскування*

Після кожного культивування, при температурі 60°C, ферментер та інокулятори обробляють 0,3% засобом Біомою. Проводять процес, по завантажувальній лінії ферментера.

На самому початку біотехнологічного процесу, ферментатори, інокулятори миють очищеною водою та стерильним паром. Обладнання маркують. Відпрацьований розчин направляється на знешкодження відходів.

Ополіскування проводиться за допомогою очищеної води. Потрібно зняти, розібрати та очистити з'ємні частини (вузли) обладнання, які контактують з виробничою сировиною. Очистка проходить у 0,3% розчині Біомою при температурі 36 °C упродовж 30 хв. Відпрацьована вода йде до знешкодження відходів.

##### *ДР 1.4.2. Технічний огляд*

Для виявлення та усунення нещільностей виконують технічний огляд обладнання.

##### *ДР 1.4.3. Перевірка на герметичність*

Згідно технологічної інструкції, перевіряють ємнісну апаратуру на герметичність

##### *ДР 1.4.4. Стерилізація обладнання*

Стерилізація обладнання проводиться при температурі 125-130°C, P=0,28 МПа, тривалість процесу складає 1 год.

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

Процес культивування зростаючої культури в посівному апараті і ферментері потребує аерації стерильним повітрям під надлишковим тиском 0,01 – 0,03 МПа для задоволення біологічної потреби мікроорганізмів.

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

Здійснюється забір повітря з використанням повітрозбірника на висоті 20-30 м від поверхні землі.

#### ***ДР 2.2 Очищення повітря від пилу та механічних часток.***

Повітря фільтрується, видаляється основна маса пилу та механічних часток. Фільтрація виконується через фільтри попереднього очищення.

#### ***ДР 2.3. Стиснення повітря***

Турбокомпресор стискає повітря до 0,35 МПа, при температурі 120-200°C. Тиск повітря у компресорі забезпечують відповідно із розрахунку тиску на подолання опору в системі підготовки повітря.

#### ***ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи***

Після стадії стиснення, повітря охолоджується в теплообміннику до температури 26-30°C. Після чого у ресивері відбувається стабілізація вологості повітря  $W = 60 - 70\%$ .

#### ***ДР 2.5. Нагрівання повітря***

Повітря нагрівається в теплообміннику до температури 50°C, вологість становить  $W = 50 \%$ .

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

Наступний етап очищення повітря відбувається у фільтрі з діаметром пор 1 мкм. Для фільтрування застосовують синтетичні волокна. Ступінь очистки такого повітря становить  $E = 95 \%$ . Заміну фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. У випадку передчасного забруднення, інфікування фільтруючого матеріалу чи зволоження потрібно здійснити позачергову заміну.

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

Остання операція даної стадії – очищення повітря в індивідуальних фільтрах Ultra, клас U16, досягається ступінь чистоти 99,99%.

### **ДР 3. Приготування і стерилізація поживних середовищ**

***ДР 3.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці***

#### ***ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А***

Розрахунок компонентів для приготування 300 мл середовища представлено в таблиці 4.1. За допомогою лабораторних вагів зважують 75 г глюкози й на аналітичних вагах зважують 1,5 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають в колбу об'ємом 500 мл і додають 50 мл питної води, ретельно перемішують до повного розчинення всіх компонентів поживного середовища. Доводять об'єм приготованого розчину до 200 мл водою питною та контролюють рН отриманого поживного середовища. рН повинен бути 5,0-5,5. У разі невідповідності значення рН, його корегують додаванням 0,1 М розчину сульфатної кислоти або 0,1 М розчином NaOH. Отриману композицію закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклав при температур 112°C упродовж 30 хвилин.

*ДРЗ.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б.*

За допомогою аналітичних вагів зважують 1,5 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл і додають 20 мл води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 50 мл питною водою. Готовий розчин закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хвилин.

*ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції В.*

За допомогою аналітичних вагів зважують 0,12 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  й 0,06 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , наважку поміщають в колбу об'ємом 100 мл і додають 10 мл води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 50 мл питною водою. Готовий розчин закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хвилин

*Розрахунок компонентів для приготування 300 мл середовища*

<b>Склад поживного середовища</b>	<b>Концентрація, г/л</b>	<b>Кількість компонента у 300 мл поживного середовища, г</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції, мл</b>
глюкоза	250	75	А	200
дріжджовий екстракт	5	1,5		
$\text{KН}_2\text{PО}_4$	5	1,5	Б	50
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,4	0,12	В	50
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	0,6		
Вода	935,2 мл	300 мл	Разом	300

Після закінчення стерилізації потрібно провести контроль середовища на стерильність. Посіви інкубують у термостаті при  $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$  протягом 24 годин.

У контрольних посівах повинен бути відсутній ріст мікроорганізмів.

***ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища отримання посівного матеріалу в колбі 5 л.***

*ДР3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А.*

Розрахунок компонентів для приготування 3 л середовища представлено в таблиці 4.2. За допомогою лабораторних вагів зважують 750 г глюкози та на аналітичних вагах зважують 15 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у колбу реактор об'ємом 5000 мл і додають 1500 мл питної води, ретельно перемішують до повного розчинення всіх компонентів поживного середовища. Доводять об'єм приготованого розчину до 2000 мл питною водою і контролюють рН отриманого поживного середовища. рН повинен бути 5,0-5,5. У випадку невідповідності значення рН, його корегують додаванням 0,1

М розчину сульфатної кислоти чи 0,1 М розчином NaOH. Готову композицію стерилізують при температурі 112°C протягом 30 хвилин.

*ДРЗ.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б.*

За допомогою аналітичних вагів зважують 15 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , наважку поміщають у колбу об'ємом 1000 мл і додають 200 мл питної води, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 500 мл питною водою. Готовий розчин закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хвилин.

*ДР 3.2.3. Приготування і стерилізація композиції В.*

За допомогою аналітичних вагів зважують 1,2 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  і 0,6 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , наважку поміщають у колбу об'ємом 1000 мл і додають 100 мл питної води, ретельно перемішують до повного розчинення. Об'єм приготованого розчину доводять до 500 мл питною водою. Готовий розчин закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хвилин.

*Таблиця 6.2.*

*Розрахунок компонентів для приготування 300 мл середовища*

<b>Склад поживного середовища</b>	<b>Концентрація, г/л</b>	<b>Кількість компонента у 3000 мл поживного середовища, г</b>	<b>Компози ція</b>	<b>Об'єм композиції ,мл</b>
глюкоза	250	750	А	2000
дріжджовий екстракт	5	15		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5	15	Б	500
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,4	1,2	В	500

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	0,6		
Вода	935,2 мл	3000 мл	Разом	3000

По закінченню стерилізації проводять контроль середовища на стерильність. Посіви інкубують у термостаті при  $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$  протягом 24 годин.

У контрольних посівах не має бути росту мікроорганізмів.

***ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища отримання посівного матеріалу в інокуляторі 50 л.***

*ДР3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А.*

Розрахунок компонентів для приготування 30 л середовища представлено в таблиці 4.3. . За допомогою лабораторних вагів зважують 7500 г глюкози і на аналітичних вагах зважують 150 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у реактор об'ємом 30 л й додають 15 л питної води, ретельно перемішують до повного розчинення всіх компонентів поживного середовища. Доводять об'єм приготованого розчину до 20 л питною водою та контролюють рН отриманого поживного середовища. рН повинен бути 5,0-5,5. У випадку невідповідності значення рН, його корегують додаванням 0,1 М розчину сульфатної кислоти чи 0,1 М розчином NaOH. Готову композицію стерилізують при температурі  $112^\circ\text{C}$  протягом 30 хвилин.

*ДР3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б.*

На вагах зважують 150 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , наважку поміщають у реактор об'ємом 10 л і додають 3 л питної води, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 5 л питною водою. Готовий розчин стерилізують при температурі  $131^\circ\text{C}$  протягом 40 хвилин.

*ДР 3.3.3. Приготування і стерилізація композиції В.*

За допомогою аналітичних вагів зважують 12 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  і 6 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , наважку поміщають у колбу об'ємом 10 л й додають 3 л питної води, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 5 л водою питною. Готовий розчин стерилізують при температурі  $131^\circ\text{C}$  протягом 40 хвилин.

Таблиця 6.3.

## Розрахунок компонентів для приготування 30 л середовища

Склад поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість компонента у 30 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
глюкоза	250	7500	А	20
дріжджовий екстракт	5	150		
$\text{KН}_2\text{PО}_4$	5	150	Б	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	12	В	5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	6		
Вода	935,2 мл	30 л	Разом	30

Після закінчення стерилізації проводять контроль середовища на стерильність. Посіви інкубують у термостаті при  $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$  протягом 24 годин.

У контрольних посівах повинен бути відсутній ріст мікроорганізмів.

***ДР 3.4. Приготування і стерилізація поживного середовища отримання посівного матеріалу в інокуляторі 500 л.***

***ДР3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А.***

Розрахунок компонентів для приготування 300 л середовища представлено в таблиці 4.4. За допомогою лабораторних вагів 75000 г глюкози та на аналітичних вагах зважують 1500 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у реактор об'ємом 300 л і додають 150 л питної води, ретельно перемішують до повного розчинення всіх компонентів поживного середовища. Доводять об'єм приготованого розчину до 200 л водою питною і контролюють рН отриманого поживного середовища. рН повинен бути 5,0-5,5.

У разі невідповідності значення рН, його корегують додаванням 0,1 М розчину сульфатної кислоти чи 0,1 М розчином NaOH. Готову композицію стерилізують при температурі 112°C протягом 30 хвилин.

*ДРЗ..42. Приготування і стерилізація композиції Б.*

За допомогою вагів зважують 1500 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , наважку поміщають у реактор об'ємом 100 л та додають 30 л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 50л питною водою. Готовий розчин стерилізують при температурі 131°C протягом 40 хвилин.

*ДР 3.4.3. Приготування істерилізація композиції В.*

За допомогою аналітичних вагів зважують 120 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  і 6 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , наважку поміщають у колбу об'ємом 100 л та додають 30 л питної води, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 50 л питною водою. Готовий розчин стерилізують при температурі 131°C протягом 40 хвилин.

*Таблиця 6.4.*

*Розрахунок компонентів для приготування 300 л середовища*

<b>Склад поживного середовища</b>	<b>Концентрація, г/л</b>	<b>Кількість компонента у 30 л поживного середовища, г</b>	<b>Компо зиція</b>	<b>Об'єм композиції,л</b>
глюкоза	250	75000	А	200
дріжджовий екстракт	5	1500		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5	1500	Б	50
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,4	120	В	50
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	60		
Вода	935,2 мл	300 л	Разом	300

Після закінчення етапу стерилізації проводять контроль середовища на стерильність. Посіви інкубують у термостаті при  $(38\pm 1)^\circ\text{C}$  протягом 24 годин.

У контрольних посівах повинен бути відсутній ріст мікроорганізмів

***ДР 3.5. Приготування і стерилізація поживного середовища отримання посівного матеріалу в інокуляторі 5000 л.***

*ДР3.5.1. Приготування і стерилізація композиції А.*

Розрахунок компонентів для приготування 30000 л середовища представлено в таблиці 4.5. За допомогою вагів зважують 75000 г глюкози й на аналітичних вагах зважують 15000 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у реактор об'ємом 3000 л і додають 1500 л питної води, ретельно перемішують до повного розчинення всіх компонентів поживного середовища. Доводять об'єм приготованого розчину до 2000 л питною водою та контролюють рН отриманого поживного середовища. рН повинен бути 5,0-5,5. У разі невідповідності значення рН, його корегують додаванням 0,1 М розчину сульфатної кислоти чи 0,1 М розчином NaOH. Готову композицію стерилізують при температурі  $112^\circ\text{C}$  упродовж 30 хвилин.

*ДР3.5.2. Приготування і стерилізація композиції Б.*

За допомогою вагів зважують 15000 г  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , наважку поміщають у реактор об'ємом 10000 л та додають 300 л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 500 л водою питною. Готовий розчин стерилізують при температурі  $131^\circ\text{C}$  протягом 40 хвилин.

*ДР 3.5.3. Приготування і стерилізація композиції В.*

За допомогою аналітичних вагів зважують 1200 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  і 60 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , наважку поміщають у колбу об'ємом 1000 л і додають 300 л питної води, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 500 л питною водою. Отриманий розчин стерилізують при температурі  $131^\circ\text{C}$  протягом 40 хвилин.

Таблиця 6.5.

## Розрахунок компонентів для приготування 3000л середовища

Склад поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість компонента у 3000 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
глюкоза	250	750000	А	2000
дріжджовий екстракт	5	15000		
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	5	15000	Б	500
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,4	1200	В	500
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	600		
Вода	935,2 мл	3000 л	Разом	3000

По закінченню стерилізації проводять контроль середовища на стерильність. Посіви інкубують у термостаті при  $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$  протягом 24 годин.

У контрольних посівах повинен бути відсутній ріст мікроорганізмів

***ДР 3.6. Приготування та стерилізація поживного середовища для біосинтезу еритритолу в ферментері.***

***ДР3.6.1. Приготування та стерилізація композиції А.***

Розрахунок компонентів для приготування 30 м<sup>3</sup> середовища представлено в таблиці 4.6. На вагах зважують 750000 г глюкози та на аналітичних вагах зважують 150000 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у реактор об'ємом 30000 л та додають 15000 л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення всіх компонентів поживного середовища. Доводять об'єм приготованого розчину до 20000 л питною водою

і контролюють рН отриманого поживного середовища. рН повинен бути 5,0-5,5. У разі невідповідності значення рН, його корегують додаванням 0,1 М розчину сульфатної кислоти або 0,1 М розчином NaOH. Готову композицію стерилізують при температурі 112°C протягом 30 хвилин.

*ДРЗ.6.2. Приготування і стерилізація композиції Б.*

За допомогою вагів зважують 150000 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , наважку поміщають у реактор об'ємом 100000 л і додають 3000 л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 5000л водою питною. Готовий розчин стерилізують при температурі 131°C протягом 40 хвилин.

*ДР 3.6.3. Приготування і стерилізація композиції В.*

На аналітичних вагах зважують 120000 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  та 60 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , наважку поміщають у колбу об'ємом 10000 л і додають 3000 л питної води, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 5000 л водою питною. Готовий розчин стерилізують при температурі 131°C протягом 40 хвилин.

*Таблиця 6.6.*

*Розрахунок компонентів для приготування 30 м<sup>3</sup> середовища*

<b>Склад поживного середовища</b>	<b>Концентрація, г/л</b>	<b>Кількість компонента у 30м<sup>3</sup> поживного середовища, г</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції,л</b>
глюкоза	250	7500000	А	20000
дріжджовий екстракт	5	150000		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5	150000	Б	5000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,4	12000	В	5000
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	6000		

Вода	935,2 мл	30000 л	Разом	30000
------	----------	---------	-------	-------

По закінченню стерилізації проводять контроль середовища на стерильність. Посіви інкубують у термостаті при  $(38\pm 1)^\circ\text{C}$  протягом 24 годин.

У контрольних посівах повинен бути відсутній ріст мікроорганізмів

#### **ТП 4. Підготовка посівного матеріалу.**

##### ***ТП 4.1. Підтримання колекційної культури.***

Колекційну культуру *Candida magnoliae* зберігають у пробірках з скошеним сусло-агаром в холодильнику при температурі 2-8°C. Пересіви здійснюють кожні 2-3 місяці. Роботи з культурою відбувається в строго асептичних умовах.

##### ***ТП 4.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах.***

Колекційну культуру *Candida magnoliae*, яка зберігається у пробірках з скошеним сусло-агаром, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з сусло-агаром після чого вирощують в термостаті при температурі 30°C протягом 24 годин.

##### ***ТП 4.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах.***

Отримані ізольовані колонії *Candida magnoliae* за допомогою петлі (від ТП 4.2.) висівають на пробірки з скошеним сусло-агаром (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки) і вирощують в термостаті при 30°C протягом 24 годин.

##### ***ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах з рідким поживним середовищем на качалках.***

Для вирощування інокуляту отримані стерильні композиції для приготування поживного середовища (від ДРЗ.1.3) в стерильних умовах з'єднують, перемішують та розливають по 300 мл в качалочну колбу об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Candida magnoliae*, вирощену на скошеному м'ясо-пептонному бульйоні, вносять 5 мл фізіологічного розчину та суспендують клітини в розчині, піпеткою відбирають одержану дріжджову

суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію отриману з однієї пробірки.

Інокулянт вирощують протягом 24 годин при температурі 30°C та швидкості перемішування 33 об/хв. Через 20-22 год виконується мікробіологічний контроль, а також визначають кількість живих клітин за методом Коха (має бути не нижче  $10^9$  КУО/мл).

#### ***ТП4.5. Вирощування інокуляту в колбі об'ємом 5л.***

Перший етапу біосинтезу відбувається в колбі об'ємом 5 л, що містить 3 л стерильного поживного середовища (від ДР 3.3.3). В колбу вносять посівний матеріал з інокулятора (від ТП 4.4.) Починають процес культивування при швидкості перемішування 33 об/хв. та витратах повітря 2л/л. Тривалість культивування - 24 години. Через 20-22 год виконують мікробіологічний контроль, а також визначають кількість живих клітин за методом Коха (має бути не нижче  $10^9$  КУО/мл).

#### ***ТП4.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 500л.***

Другий етап біотехнологічного синтезу здійснюють в інокуляторі об'ємом 500 л, що містить 300 л стерильного поживного середовища (від ДР 3.4.3). В ферментер вносять посівний матеріал з колб (від ТП 4.5.) Проводять процес культивування при швидкості перемішування 33 об/хв. та витратах повітря 2л/л. Тривалість культивування складає 24 годин. Через 20-22 год виконують мікробіологічний контроль, а також визначають кількість живих клітин за методом Коха (має бути не нижче  $10^9$  КУО/мл).

#### ***ТП4.7. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 5000л.***

Третій етапу біосинтезу здійснюють в інокуляторі об'ємом 5000 л, що містить 3 л стерильного поживного середовища (від ДР 3.5.3). В ферментер вносять посівний матеріал з колб (від ТП 4.6.) Проводять процес культивування при швидкості перемішування 33 об/хв. та витратах повітря 2л/л. Тривалість культивування складає 24 годин. Через 20-22 год виконують мікробіологічний контроль, а також визначають кількість живих клітин за методом Коха (має бути не нижче  $10^9$  КУО/мл).

## **ТП 5. Біосинтез**

### ***ТП 5.1. Виробниче культивування***

Для цього етапу біосинтезу в ферментатор об'ємом 50 м<sup>3</sup>, що містить 30 л стерильного поживного середовища (від ДР 3.6.3). вносять посівний матеріал з ферментеру з попереднього етапу біосинтезу (від ТП 4.6.). Процес культивування проводять при швидкості перемішування 33 об/хв. та витратах повітря 2л/л. Тривалість культивування складає 72 годин. Періодично (кожні 5 годин) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси та цільового продукту, а також вмісту джерел вуглецю та азоту.

## РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва

### 7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
<i>ДР 2.1</i> Забір атмосферного повітря К <sub>т</sub>	повітрозабірник висота повітрозабірника	–	під час встановлення обладнання	H = 30 м
<i>ДР 2.2</i> Грубе очищення повітря К <sub>т</sub>	повітря на виході з фільтра грубої очистки ступінь очистки	згідно паспорту фільтра	Після проходження фільтра грубого очищення	E = 80 % тиск - вільповідно паспорту
<i>ДР 2.3</i> Стиснення повітря К <sub>т</sub>	стиснене повітря тиск, температура	манометр термометр	після стиснення повітря	P = 0,35 МПа t° = 120 – 250 °C
<i>ДР 2.4</i> Охолодження повітря та видалення вологи К <sub>т</sub>	охоложене повітря температура, вологість	термометр, психрометр	після охолодження повітря	t° = 26–30 °C W = 60–70 %
<i>ДР 2.5</i> Нагрівання повітря К <sub>т</sub>	нагріте повітря температура, вологість	термометр, психрометр	після нагрівання повітря	t° = 50 °C W = 50 %
<i>ДР 2.6</i> Очищення повітря в головному фільтрі К <sub>т</sub>	повітря на виході з головного фільтра ступінь очищення	згідно паспорту фільтра	після проходження через головний фільтр	E = 95 %

<b>НУХТ БТЕК 05.01.14 КР ПЗ</b>				
Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата
Розробив	Паляниця Л.В.			
Перевір.	Буценко Л.М.			
Консультант				
Н. контр.				
Затверд.	Стабніков В.П.			
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва			Літ.	Арк.
				53
			Аркушів 74	
			53	
			<b>Кафедра БТМ</b>	

<p><i>ДР 2.7</i> Очищення повітря в індивідуальному фільтрі <math>K_T</math></p>	<p>повітря на виході з індивідуального фільтра ступінь очищення</p>	<p>згідно паспорту фільтра</p>	<p>після проходження фільтра індивідуальної очистки</p>	<p><math>E = 99,99 \%</math></p>
<p><i>ДР 3.1.1</i> Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту Приготування та стерилізація композиції А <math>K_T, K_M</math></p>	<p>композиція А температура, час, стерильність рН</p>	<p>Датчик рН манометр годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тиск, час та рН визначаємо безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>РН = 5-5.5 <math>P = 0,05 \text{ МПа}</math> <math>t = 30 \text{ хв}</math> <math>t^\circ = 112 \text{ }^\circ\text{C}</math> стерильність</p>
<p><i>ДР 3.1.2</i> Приготування та стерилізація композиції Б <math>K_T, K_M</math></p>	<p>композиція Б температура, час, стерильність</p>	<p>Датчик температури, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p><math>P = 0,15 \text{ МПа}</math> <math>t = 40 \text{ хв}</math> <math>t^\circ = 131 \text{ }^\circ\text{C}</math> стерильність</p>
<p><i>ДР 3.1.3</i> Приготування та стерилізація композиції В <math>K_T, K_M</math></p>	<p>композиція Б температура, час, стерильність</p>	<p>Датчик температури, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p><math>P = 0,15 \text{ МПа}</math> <math>t = 40 \text{ хв}</math> <math>t^\circ = 131 \text{ }^\circ\text{C}</math> стерильність</p>
<p><i>ДР 3.2.1, 3.3.1, 3.4.1, 3.5.1, 3.6.1</i> Приготування і</p>	<p>композиція А час і температура стерилізації, тиск,</p>	<p>Датчик рН манометр, датчик температури, годинник, мікробіологічний</p>	<p>Тиск, час та рН визначаємо безперервно під час стерилізації, мікробіологічний</p>	<p>РН = 5-5.5 <math>P = 0,05 \text{ МПа}</math> <math>t^\circ = 112 \text{ }^\circ\text{C}</math> <math>t = 30 \text{ хв}</math> стерильність</p>

стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу  Приготування та стерилізація композиції А К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub>	стерильність рН	контроль	й контроль – після стерилізації	
ДР 3.2.2, 3.3.2, 3.4.2, 3.5.2, 3.6.2 Приготування та стерилізація композиції Б К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub>	композиція Б температура, тиск, час, стерильність	Датчик температури, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск, час , температура– під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	P = 0,15 МПа t° = 131 °C t = 40 хв стерильність
ДР 3.2.3, 3.3.3, 3.4.3, 3.5.3, 3.6.3 Приготування та стерилізація композиції В К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub>	композиція В ,температура, тиск, час, стерильність	Датчик температури, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск, час , температура – під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	P = 0,15 МПа t° = 131 °C t = 40 хв стерильність
ТП 4.1 Підтримання колекційної культури К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub>	колекційна культура <i>Candida magnoliae</i> КССМ-10160 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій температура,	датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура – безпосередньо при зберіганні, мікробіологічний контроль та пересів – кожні 2-3 місяці	t° = 2-8 °C мікробіологічна чистота
ТП 4.2 Одержання робочої культури К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub>	робоча культура <i>Candida magnoliae</i> КССМ-10160 в колбах температура, час, мікробіологічна чистота	датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль – після вирощування	t° = 30 °C t = 24 год мікробіологічна чистота

<p>ТП 4.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах K<sub>T</sub>, K<sub>M</sub></p>	<p>робоча культура <i>Candida magnoliae</i> KCCM-10160 на чашках петрі температура, час, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура - під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль – після вирощування</p>	<p>t° = 30 °C t = 24 год мікробіологічна чистота</p>
<p>ТП 4.4 Вирощування інокуляту в колбах у термостаті K<sub>T</sub>, K<sub>M</sub></p>	<p>посівний матеріал температура, час, мікробіологічна чистота частота обертів качалки</p>	<p>Термометр тахометр годинник мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікробіологічний контроль – кожні 22 годин</p>	<p>t° = 30 °C n = 33 об/хв t = 24 год мікробіологічна чистота</p>
<p>ТП 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 Вирощування культури в інокуляторах об'ємом 5 л, 50 л, 500 л, 5000 л K<sub>T</sub>, K<sub>M</sub></p>	<p>посівний матеріал температура, час, швидкість перемішування, витрата аераційного повітря, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури та рН, годинник, тахометр, ротаметр, фотометричний зчитувач оптичної густини, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, частота обертів мішалки та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації живих клітин та мікробіологічний контроль – кожні 20-22 год і після культивування</p>	<p>pH = 7,5 t° = 30 °C t = 24 год v = 2 л/(л*год) n = 33 об/хв X = 117 г/л г/л на кінець культивування; мікробіологічна чистота</p>
<p>ТП 5.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 50 м<sup>3</sup> K<sub>T</sub>, K<sub>M</sub></p>	<p>культуральна рідина температура, час, швидкість перемішування, рН, концентрація біомаси, концентрація живих клітин, мікробіологічна чистота</p>	<p>фотометричний зчитувач оптичної густини, датчик температури, рН, годинник, тахометр, ротаметр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, частота обертів мішалки та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації біомаси та мікробіологічний контроль – кожні 5 год і після</p>	<p>pH = 7,5 t° = 30 °C t = 72 год n = 33 об/хв v = 2 л/(л*год) X = 117 г/л на кінець культивування мікробіологічна чистота</p>

			культивування	
--	--	--	---------------	--

## 7.2. Мікробіологічний контроль

### 7.2.1. Контроль чистоти культури.

Для того щоб отримати чисту культури, ізольовані колонії вирощують у чашці Петрі, яка містить поживне середовище. Процес проходить в стерильних умовах.

Для отримання чистої культури роблять посів розбавленої суспензії клітин накопичуваної культури на щільне середовище з метою отримання із кожної клітини окремої колонії. Колонія складається із клітин, які розвиваються від однієї клітини, і являються чистою культурою[24].

У нашому випадку, для отримання чистої культури *Candida magnoliae*, ми вибираємо середовище , яке містить в собі 20% глюкози, 1,0% дріжджового екстракту та 2,0% агару [9]. Штам *Candida magnoliae* інкубували на середовищі для росту, що містить 2,0% глюкози, 1,0% дріжджового екстракту та 1,0% пептону. Після росту бульйон розносили на чашку з агаром, що містила 10 % глюкози, 0,8 % дріжджового екстракту, 0,3 % пептону і 2,0 % агару, і отриману колонію переносили на середовище для споруляції, що містило 0,1 % глюкози, 1,0 % дріжджового екстракту і 2,0% агару.

Новоутворену спору збирали автоклавною дистильованою водою і відбирали шляхом додавання 10 мМ 2-меркаптоетанолю протягом 30 хвилин і обробки літіказою 0,5 мг/мл протягом 4 годин.

Відібрані спори обробляли EMS (етилетанолсульфонат) і інкубували на середовищі, що містить 30% глюкози, 18% KCl, 0,1% дріжджового екстракту і 2,0% агару. Одну колонію було обрано як швидко зростаючі мутанти для

відбору мутанта з високою стійкістю до солі.

Відібрану колонію переносили на ферментаційне середовище для перевірки активності продукування еритритолу у колбі для струшування.

Після інкубації при 30°C і 240 об/хв протягом 72 годин був відібраний мутант з високим вмістом еритритолу[11].

### **7.2.2.Контроль стерильності поживних середовищ**

В біотехнології застосовують три групи методів стерилізації: фізичні; хімічні; біологічні.

Для контролю нашого поживного середовища, використовується фізичний метод .

Фізичні способи стерилізації. Представлені:

- Теплова (термічна) стерилізація:
- Парою під тиском;
- Радіаційна стерилізація;
- Тіндалізація;
- Ультразвукова стерилізація;
- Повітряна;
- Стерилізація струмами високої та надвисокої частоти;
- Стерилізація ультрафіолетовим випромінюванням;
- Стерилізація ІЧ- та лазерним випромінюванням

В нашому випадку, поживне середовище стерилізують термічним способом. . Суть методу в тому, що при впливі високих температур гинуть бактерії та спори мікроорганізмів . Також, даний спосіб найбільше відповідає техніко-економічним вимогам виробництва. Маючи на меті знезараження поживного середовища, ми використаємо метод термічної стерилізації. [25]

Стерилізація буде проводитись в збірниках.

Середовище ділять на такі композиції:

*Композиція А:* глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа);

*Композиція Б:*  $K_2HPO_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,015 МПа);

*Композиція В:*  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $(NH_4)_2SO_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,015 МПа).

Після закінчення стерилізації виконують відбір проб середовища для проведення перевірки стерильності. Контроль стерильності здійснюють шляхом витримування проб у термостаті протягом декількох днів за температури 37 °С. Після цього здійснюють візуальну оцінку середовища, за допомогою мікроскопіювання. У випадку виявлення помутніння, середовище є не стерильним.

### **7.2.3. Контроль стерильності аераційного повітря**

Враховуючи промисловий масштаб виготовлення еритритолу, для вилучення мікрофлори, більш прийнятним є метод фільтрування .

Повітря проходить декілька стадій фільтрації:

-Очищення повітря від пилу та механічних включень через фільтри попереднього очищення.

-Очищення повітря в головному фільтрі. Ступінь очистки складає  $E = 95 \%$ .

-Очищення повітря в індивідуальному фільтрі. Ступінь чистоти складає  $E = 99,99\%$ . [20]

### **7.2.4. Методики виявлення контамінації в процесі культивування**

Для того щоб запобігти контамінації при роботі з клітинами, необхідно притримуватись асептичних умов та проводити тести для оцінювання їх ефективності.

Контроль стерильності для виявлення можливого забруднення бактеріями та грибами використовуються наступні середовища: тіогліколеве середовище (ТГС), м'ясопептонний бульйон (МПБ), м'ясопептонний агар (МПА), середовище Сабуро рідке. В нашому випадку це МПБ.

1. Підготовка середовищ для контролю. м'ясопептонний бульйон розлити по 10 мл в бактеріологічні пробірки та закупорити ватно-марлевими пробками.

2. Контроль стерильності.

- Потрібно відібрати декілька пробірок із МПБ (4-5), в кожену пробірку внести по 0,5 мл середовища, сироватки або клітинної суспензії. Зробити посів піпеткою об'ємом 1,0 мл, рівномірно випускаючи її вміст, починаючи зі дна до поверхні.

- Пробірки інкубують при температурі 37С° і спостерігають впродовж 5 днів.

3. Облік результатів. Облік проводять за допомогою огляду пробірок, що були засіяні. Ознаки бактеріального росту на МПБ – утворення осаду, рівномірне помутніння середовища, або поява плівки на поверхні поживного середовища..

4. Якщо спостерігається ріст мікроорганізмів культури клітин викидають, не проводячи лікування. [26]

### **7.3. Показники росту і синтезу еритритолу**

#### **7.3.1. Концентрація біомаси**

Концентрацію біомаси визначають непрямим методом за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка.

Для контролю відбирають 0,5 мл культуральної рідини та розводять в 10 разів стерильною питною водою та вимірюють в кюветі розміром 2,5мм на спектрофотометрі при світлофільтрі з довжиною хвилі  $\lambda=590$  нм. Як розчин порівняння використовують розведене в 10 разів стерильною питною водою стерильне середовище. Результат отриманий на спектрофотометрі множать на 20, враховуючи розведення та довжину кювети. [27]

#### **7.3.2. Концентрація еритритолу**

Нашим цільовим продуктом є еритритол, який був виділений з мутованого штаму *Candida magnoliae* КССМ-10160. Концентрацію

еритритолу в культуральному розчині вимірюють за допомогою методу ВЕРХ (високоєфективної рідинної хроматографії). Принцип рідинної хроматографії полягає в розділенні компонентів сумішей, засновуючись на відмінності в рівноважному розподілі їх між двома фазами, що не змішуються, одна з яких нерухома, а інша рухома. Завдяки своїй полярності та розміру суміші нерівно розподіляються між 2-ма фазами. Особливістю методики ВЕРХ є використання високого тиску і дрібнозернистих сорбентів (зазвичай 3-5 мкм, часто до 1,8 мкм). Саме це дає змогу розділяти складні суміші речовин швидко і повністю (середній час аналізу від 3 до 30 хвилин).

#### **Обладнання:**

*-Колонки* - представляють сталю трубку діаметром 5-25 мм наповнену нерухомою фазою (напр. модифікованим силікагелем) й закрити з обох боків перехідниками, які дають можливість підключити її до вхідної та вихідної ліній. Колонки розраховують на тиск порядку 150 атм.

*-Передколони* - схожі на основну колонку коротші за розміром, розміщуються перед нею й захищають від забивання зразками. Найбільше корисні в препаративній хроматографії.

*-Насоси*

*-Детектори.*

Міуга Філіп, Міхаела Власа, Вірджинія Комана, Адела Халмагьї розробили та валідували метод ВЕРХ із визначенням показника заломлення для одночасного визначення глюкози, фруктози, сахарози та сорбіту в зразках листя та/або яблучної шкірки з дев'яти сортів яблук і підщеп, отриманих із зародкової плазми колекція. Для оптимізації методу вони застосували методологію конструкції поверхні відгуку Бокса–Бенкена. Використовували колонку Carbosep Coregel 87H3, рухомою фазою був 0,005 моль л<sup>-1</sup> розчин H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> зі швидкістю потоку 0,3 мл хв<sup>-1</sup> і колонка температура 35°C. Межі виявлення становили 2,67–4,83 мкг мл<sup>-1</sup>, а вихід – 93,94–103,06%. [28] Грембецька та ін. вперше повідомили про простий, чутливий і точний метод одночасного визначення глюкози, фруктози, сахарози, мальтози, еритриту,

маніту, мальтиту, сорбіту та ксиліту за допомогою ВЕРХ у поєднанні з коронним зарядом аерозольного детектора. Метод був розроблений з використанням колонки Shodex Asahipak, NH2P-50 4E, наповненої частинками оболонки розміром 5 мкм і рухомої фази градієнта ацетонітрил–вода при 25 °С. Метод показав широкий діапазон концентрацій і добру точність. Межі виявлення для дев'яти аналітів були в діапазоні 0,12–0,44 мкг мл<sup>-1</sup> відповідно. [29]

Хроматограф під'єднаний до мас-спектрометра. Найчастіше застосовують УФ-детектори. Більшість органічних речовин поглинає світло на 210 нм (C=O) та 250 нм. В рідкісних випадках (наприклад аналіз суміші вуглеводнів) необхідно застосовувати детектування зміни показника заломлення світла. Ще рідше застосовують детектори флуоресценції. Порівняно дорогими є детектори-мас-спектрометри. Останнім часом розроблено хроматографічні системи, де детектування відбувається також ЯМР-спектрометром[30].

### **7.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту**

#### **Визначення концентрації джерела вуглецю**

Концентрацію глюкози визначають в супернатанті культуральної рідини. Для його одержання культуральну рідину (100 мл) центрифугують 20 хв при 3000 об/хв для видалення біомаси.

**Визначення проводять глюкозооксидазним методом.**

**Принцип методу:** в присутності ферменту глюкозооксидази глюкоза окислюється киснем повітря, після чого утворюється перекис водню. Перекис водню в присутності ферменту пероксидази окиснює ортотолідин з утворенням забарвленої сполуки, чим інтенсивніше забарвлення, тим більший вміст глюкози.

**Робочий реактив:** в ацетатного буфері (80 мл) розчиняють глюкозооксидазу (2 мг) та пероксидазу (1 мг), додають 1%-ний розчин ортотолідину (1 мл), перемішують і доводять об'єм буферним розчином до 100 мл.

До супернатанту (1 мл) додають робочий реактив (3 мл) і обережно перемішують. Поступово починає з'являтися забарвлення, яке при кімнатній температурі досягає максимуму через 13-15 хв. Фотометрують при довжині хвилі 625 нм проти контрольного розчину (замість культуральної рідини містить фізіологічний розчин).

Розрахунок проводять за калібрувальним графіком, на одній осі якого відкладено концентрацію глюкози (ммоль/л), а на іншій – величину екстинкції. [31].

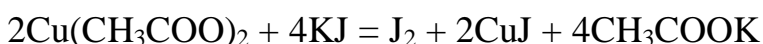
### **Визначення концентрації амінного азоту**

Амінний азот визначають мідним способом.

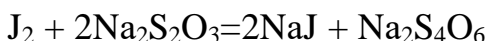
В основі методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю (кількість міді визначають йодометричним титруванням).

Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні з'єднання. Суміш фільтрують для відділення від нерозчинного ортофосфату міді. Потім до фільтрату прибавляють оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді.

Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину добавляють йодид калію:



В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентному кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитрують розчином тіосульфату натрію:



1 см<sup>3</sup> 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту, оскільки один атом міді реагує з двома молекулами амінокислот, утворюючи з'єднання типу  $\text{Cu}(\text{RCHNH}_2\text{COO})_2$ . [32]

## РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля

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

**1. Санітарна підготовка виробництва.** Етап містить в собі щоденне прибирання приміщення з використанням миючих засобів «Біомой» та «Мікробак Форте». Непридатний розчин зливається в каналізацію. Ємнісне обладнання миють за допомогою СІР-мийки та засобу «Біомой». Після миття розчин потрапляє до збірника та може використовуватись повторно, а промивна вода надходить до каналізації. На цьому етапі утворюються великі об'єми рідких відходів.

**2. Підготовка і стерилізація розчинів для корегування рН.** Розчини луку та сірчаної кислоти стерилізуються в окремому збірнику та подаються у ферментер під час виробничого культивування за потреби. Відходи розчинів для корегування рН не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів.

**3. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу.** Перед приготуванням середовища проводить перевірку сировини. Сировину яка не відповідає нормам не допускають. Стандартними твердими відходами є пакувальні матеріали від сировини. На цьому етапі утворюються тверді відходи.

**4. Підготовка посівного матеріалу .** В процесі етапа відбувається нарощування посівного матеріалу в інокуляторах.

Так як посівний матеріал використовується для засіву наступного ферментатора, відходи посівного матеріалу не враховуються. Так як *Candida magnoliae* є являється факультативним анаеробом, виникає необхідність в аерації, тому під час культивування буде утворюватись великий об'єм відпрацьованого повітря.

					НУХТ БТЕК 05.01.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив	Паляниця Д.В.				РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Буценко Л.М.						64	74
Консультант								64
Н. контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.							

На цьому етапі утворюються великі об'єми газоподібних відходів .

**5.Виробничий біосинтез.** *Candida magnoliae* культивується для отримання культуральної рідини з еритритолом. Відпрацьоване повітря після аерації також утворюється в великих об'ємах. Після завершення біосинтезу культуральна рідина надходить до збірника перед виділенням еритритолу, тому рідкі відходи на даному етапі не враховуються. На цьому етапі утворюються великі об'єми газоподібних відходів.

## 8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

### 8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

**Розрахунок об'ємів відходів.** Для щоденного прибирання готують розчини «Біомою» концентрацією 0,3% та дезинфікувального засобу «Мікробак Форте» концентрацією 1%. За один цикл виробництва витрачається 588 л робочого розчину «Біомою», який після миття зливається у каналізацію. Обладнання миють з використанням розчину «Біомою» та СІР-мийки, об'єм відходів за один цикл 11482 л. Мийний засіб

«Біомою» відноситься до класу IV безпеки, а тому є безпечним для навколишнього середовища. Узагальнена характеристика рідких відходів виробництва наведена у *табл. 8.1*.

*Таблиця 8.1*

*Характеристика рідких відходів під час виробництва еритритолу*

Назва складової рідких відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (л)	Клас небезпеки
0,3 % розчин «Біомою»	алкілбензосульфонат натрію, лужна протеаза, натрій карбонат, натрій триполіфосфат, натрій хлористий	11482	IV

**Заходи для зменшення об'ємів відходів.** Для миття використовують СІР-мийки, що дозволяє зменшити об'єми стічних вод та витрати миючого засобу.

**Утилізація рідких відходів.** Біологічне очищення стічних вод пропонується проводити в реакторах періодичної дії (SBR-реакторах). Такі реактори займають менше місця, ніж аеротенки та інші конструкції водоочисних споруд, але мають високу та стабільну якість очищення стічних вод. Принцип дії установки базується на чергуванні процесів аеробної та анаеробної очистки, завдяки чому, в одному апараті відбуваються два типи очищення.

Процес очищення стічних вод складається з таких стадій:

1). Анаеробна (подача води відбувається, в анаеробних умовах, через нижню частину реактора, починається виділення фосфатів та заміна стічних вод з киснем та нітратами на вихідну воду)

2). Аноксидна стадія (в реакторі перемішують мулову суміш, відбувається інтенсифікація процесів денітрифікації)

3). Аеробна стадія (починається інтенсивна аерація, що забезпечує процеси нітрифікації та накопичення фосфатів у клітинах активного мулу)

4). Відстоювання (активний мул осаджується та накопичується в нижній частині реактора)

5). Видалення очищеної води та надлишкового активного мулу (очищена вода відкачується деканторами з верхньої частини ректора) [33].

Схема роботи SBR-реактора



### 8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

**Розрахунок об'ємів відходів.** На етапах санітарної підготовки виробництва та приготування поживного середовища твердими відходами є упаковка, в якій поставляються мийні засоби та компоненти середовища. Упаковка засобу «Мікробак форте» виготовлена з поліетилену високої щільності і піддається вторинній переробці. Упаковки від «Біомою» (20 кг) та дріжджового екстракту (20 кг), глюкози, пептону та солей складаються з мішкового паперу, який також піддається вторинній переробці. Упаковка компонентів поживного середовища виготовлена з полівінілхлориду, який відрізняється від звичайного пластику і потребує окремої вторинної переробки.

## Характеристика твердих відходів під час виробництва еритритолу

Назва складової твердих відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (кг)	Клас небезпеки
Упаковка «Мікробак Форте»	Поліетилен високої щільності (HDPE)	0,21	IV
Упаковка «Біомою» та дріжджового екстракту	Мішковий папір (марка БМ)	6,6	IV
Упаковка компонентів поживного середовища	Полівінілхлорид (PVC-3)	0,77	IV
Залишки біомаси	Біомаса культури <i>Candida magnoliae</i>	110	IV
Всього		117,6	

**Утилізація твердих відходів.** Упаковки від м'яких засобів та компонентів середовища сортують (окремо поліетилен, полівінілхлорид та папір) та відправляють до пунктів прийому вторинної сировини для переробки.

Враховуючи, що міцельна маса, яка залишилась після фільтрування, містить велику кількість поживних речовин білкової природи у вигляді клітин продуцента, пропонується утилізувати її як біодобавку до кормів. У клітинах *Candida magnoliae* міститься приблизно 57% білка до сухої маси.

Процес приготування білкової добавки буде виглядати так:

- 1). відфільтрована біомаса змішується з зерновою сировиною;
- 2). екструдуються за температури 110-130°C протягом 1-2 хв;

- 3).оохолодження до температури близько 10°C;
- 4).подрібнення до необхідного розміру за рецептом відповідного комбікорму [34].

### 8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

**Розрахунок об'ємів відходів.** Газоподібні відходи утворюються на етапах підготовки посівного матеріалу та виробничого культивування. Тривалість підготовки посівного матеріалу в інокуляторах становить 48 год, а виробничий біосинтез займає 24 год. Аерацію здійснюють зі швидкістю 1 л/лКР/хв. Для підготовки інокуляту використовують 3 ферментера з робочим об'ємом 3000 л, а для виробничого біосинтезу 1 ферментер з робочим об'ємом 30000 л. Отже, приблизний об'єм відпрацьованого повітря за цикл ферментації становить:

$$3 \cdot (3000 \cdot 48) + (30000 \cdot 24) = 86\,400 \text{ л} = 864 \text{ м}^3$$

**Заходи для зменшення об'ємів відходів.** Відпрацьоване аераційне повітря після фільтрування можна використовувати як теплоагент.

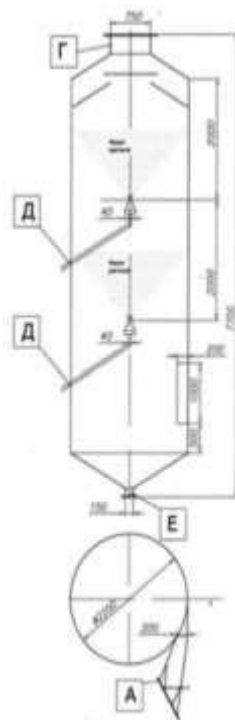
Таблиця 8.3

Характеристика газоподібних відходів під час виробництва еритритолу

Назва складової газоподібних відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (м <sup>3</sup> )	Клас небезпеки
Відпрацьоване повітря після ферментації	Вуглекислий газ	475,2	IV

**Утилізація газоподібних відходів.** Для очищення відпрацьованого аераційного повітря, на виході повітря з ферментерів встановлюють фільтри тонкої очистки класу F5, що затримують спори грибів [35].

Схема відцентрового скрубера



#### 8.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Під час виробництва еритритолу з використанням продуцента *Candida magnoliae* виділяється досить велика кількість відходів, але вони не становлять загрози навколишньому середовищу. Рідкі відходи складаються зі стічних вод, що утворюються на стадії санітарної підготовки виробництва. Очищення цих вод можна проводити в реакторах періодичної дії, що включають стадії анаеробного та аеробного очищення, відстоювання та видалення очищеної води.

Найбільшу кількість твердих відходів становить біомаса продуцента, що залишається після фільтрування. Утилізацію біомаси пропонується проводити шляхом додавання її до кормів у якості білкової добавки, після попередньої підготовки.

Найбільший об'єм становлять газоподібні відходи, а саме відпрацьоване аераційне повітря. Відпрацьоване аераційне повітря після очищення у фільтрі та відцентровому скрубєрі пропонується використовувати у розпилювальній сушарці.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Динний цукор "еритритол". [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://ketoketo.com.ua/uk/blog/dynnyu-tsukor-erytritol-klyuchovyy-inhrediyent-korysnykh-solodoshchiv-5a265824>
2. Еритрит. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://fitomarker.com.ua/fitoblog/jeritrit-lunchshij-podslastitel-ili-novomodnij-trend>
3. Еритритол. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://1000.menu/table/25167-eritritol-zamenitel-saxara-novogo-pokoleniya>
4. Recent advances in biological production of erythritol. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388551.2017.1380598>
5. Україна у цифрах у 2017 році. Державна служба статистики України. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.ukrstat.gov.ua/druk>
6. Штангеева Н.І. Використання натуральних цукрозамінників у харчовій промисловості. Харчова наука і технологія. 2011. №2(15). С.53—55.
7. Goossens J., Gonze M. Erythritol // *Manuf. Confect.* — 2000. — № 80;
8. Ohmori S., Ohno Y., Makino T., Kashihara T. Characteristics of erythritol and formulation of a novel coating with erythritol termed thin-layer sugarless coating // *Int. J. Pharm.* — 2004. — № 278.
9. Recent advances in biological production of erythritol. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388551.2017.1380598>
10. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel erythrose reductase from *Candida magnolia*. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2902421/>
11. Fermentation process for preparing erythritol by a high salt tolerant mutant of *Candida* sp. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://patents.justia.com/patent/20010055796>

12. Candida. [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://uk.wikipedia.org/wiki/Candida>.
13. Morphological features of *Candida magnoliae*. [Електронний ресурс] //Режим доступу: [https://www.researchgate.net/figure/Morphological-features-of-Candida-magnoliae-on-cornmeal-agar-at-7-days-of-growth-at\\_fig1\\_6187233](https://www.researchgate.net/figure/Morphological-features-of-Candida-magnoliae-on-cornmeal-agar-at-7-days-of-growth-at_fig1_6187233)
14. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. – К.: НУХТ, 2004. – 471 с.
15. *Candida magnoliae*. [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/name/Candida%20magnoliae>
16. Sawada K, Taki A, Yamakawa T, et al. Key role for transketolase activity in erythritol production by *Trichosporonoides megachiliensis* SN-G42. *J Biosci Bioeng.* 2009;108:385–390.
17. Пирог Т.П. Біохімічні основи мікробного синтезу [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»/ Т.П. Пирог, Л.В.Ключка. – К.: НУХТ, 2019. – 81 с.
18. Глибинне культивування мікроорганізмів у виробничих умовах. [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://studopedia.org/6-21632.html>
19. Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О.Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 252
20. Kobayashi Y, Yoshida J, Iwata H, et al. Gene expression and function involved in polyol biosynthesis of *Trichosporonoides megachiliensis* under hyper-osmotic stress. *J Biosci Bioeng.* 2013;115:645–650.

21. Lee JK, Kim SY, Ryu YW, et al. Purification and characterization of a novel erythrose reductase from *Candida magnoliae*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:3710–3718.
22. Janek T, Dobrowolski A, Biegalska A, et al. Characterization of erythrose reductase from *Yarrowia lipolytica* and its influence on erythritol synthesis. *Microb Cell Fact.* 2017;16:118.
23. Санітарія і гігієна. [Електронний ресурс] //Режим доступу: [https://lnu.edu.ua/life-safety/wp-content/uploads/2020/03/SG\\_PR-4\\_SR\\_2020.pdf](https://lnu.edu.ua/life-safety/wp-content/uploads/2020/03/SG_PR-4_SR_2020.pdf)
24. Чиста культура. [Електронний ресурс] //Режим доступу: [https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A7%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B0\\_%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%83%D1%80%D0%B0](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A7%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B0_%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%83%D1%80%D0%B0)
25. «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П. , Гуляєв В.М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.
26. ВИКОРИСТАННЯ КУЛЬТУР КЛІТИН ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ У ВІРУСОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ. . [Електронний ресурс] //Режим доступу:<https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Kafedry/Virusol/Library/Cell Culture.pdf>
27. Ріст бактерій у бактеріальній популяції. [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://studfile.net/preview/9761425/page:6/>
28. Filip M, Vlassa M, Coman V, Halmagyi A. Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose and sorbitol in the leaf and fruit peel of different apple cultivars by the HPLC-RI optimized method, *Food Chem* 2016; 199:653-659.
29. Grembecka M, Lebiezinska A, Szefer P. Simultaneous separation and determination of erythritol, xylitol, sorbitol, mannitol, maltitol, fructose, glucose, sucrose and maltose in food products by high performance liquid chromatography coupled to charged aerosol detector, *Microchem J* 2014; 117:77- 82

30. Високоєфективна рідинна хроматографія.

[Електронний ресурс] // Режим доступу: [https://www.wiki-data.uk-ua.nina.az/%D0%92%D0%B8%D1%81%D0%BE%D0%BA%D0%BE%D0%B5%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%B2%D0%BD%D0%B0\\_%D1%80%D1%96%D0%B4%D0%B8%D0%BD%D0%BD%D0%B0\\_%D1%85%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D1%84%D1%96%D1%8F.html](https://www.wiki-data.uk-ua.nina.az/%D0%92%D0%B8%D1%81%D0%BE%D0%BA%D0%BE%D0%B5%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%B2%D0%BD%D0%B0_%D1%80%D1%96%D0%B4%D0%B8%D0%BD%D0%BD%D0%B0_%D1%85%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D1%84%D1%96%D1%8F.html)

31. Принцип глюкозооксидазного методу визначення глюкози. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://meduk.net.ua/archives/23315>

32. Визначення вмісту амінного азоту у пивному суслі йодометричним методом по Попу і Стівенсу (мідним способом). [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://studfile.net/preview/9033163/page:15/>

33. Акментина А.В., Рекомендации по расчету реакторов циклического действия с восходящим потоком сточной воды и последовательной нитриденитрификацией, Вестник гражданских инженеров, 2015, №5 (58), с. 110-113

34. Єгоров Б.В., Кананихіна О.М., Турпурова Т.М., Технологія виробництва білково-вітамінної добавки біотехнологічним методом, ScientificWorks, 82(2), 4-9. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://doi.org/10.15673/swonaft.v82i2.1168>

35. Бризекс, Разница между классами НЕРА-фильтров [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://xn--90aifdm6al.xn--p1ai/blog/raznica-mezhdu-klassami-hepa-filtrov-h10-h11-h12-h13-h14>