



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“01” березня 2024 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ПОНОМАРЬОВА Валерія Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1.Тема роботи Синтез астаксантину культивуванням *Escherichia coli* WLGB-RPP

керівник роботи КЛЮЧКА Лілія Вікторівна, ст. викл

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

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

2.Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи геометричний об'єм ферментера 6.3 м3, коефіцієнт заповнення становить 0,6 цільовий продукт у вигляді харчового барвника астаксантину, виробничий штам *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15,pTrc-ispDF)

4.Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) характеристика цільового продукту, характеристика біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної схем, контроль виробництва.

5.Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу *Escherichia coli* WLGB-RPP формату A1 – аркушів 1

Апаратурна схема біосинтезу *Escherichia coli* WLGB-RPP формату A1 – аркушів 1

2

## 6.Консультанти розділів роботи

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

7.Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Розділ 1. Характеристика цільового продукту	01.03.24 - 03.03.24	Виконано
	Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	03.03.24- 06.03.24	Виконано
	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування.	06.03.24- 09.03.24	Виконано
	Розділ 4. Біосинтез цільового продукту	09.03.24- 11.03.24	Виконано
	Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	11.03.24- 15.03.24	Виконано
	Розділ 6. Специфікація обладнання	15.03.24- 18.03.24	Виконано
	Розділ 7. Опис технологічної схеми	18.03.24- 21.03.24	Виконано
	Розділ 8. Контроль виробництва	21.03.24- 25.03.24	Виконано
	Розділ 9. Охорона довкілля	25.03.24 - 28.05.24	Виконано

**Здобувач**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Валерія ПОНОМАРЬОВА**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

**Керівник роботи**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Лілія КЛЮЧКА**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технічної та апаратурної схем біосинтезу астаксантину культивуванням *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF).

В даній роботі було проведено огляд можливого застосування астаксантину, та обрано найкраще цільове використання, а саме: харчовий барвник який використовується при годівлі креветок. З врахуванням цільового призначення астаксантину було розраховано щорічну потребу в даному продукті що становить 13,5 кг. *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) синтезує 432,82 мг/л пігменту за 45 год культивування. Для отримання необхідної кількості пігменту культивування відбувається у ферментері об'ємом 6,3м3.

Технологічна схема біосинтезу астаксантину культивуванням *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) включає в себе допоміжні роботи (підготовка повітря, приготування титрувальних агентів, приготування розчину металів, зберігання гліцерину, приготування та стерилізація поживного середовища), а також технологічного процесу (вирощування посівного матеріалу *Escherichia coli* та виробничий синтез астаксантину, застосування колб на 260 мл, та інокуляторів на 5, 50, а також біосинтез у ферментері об'ємом 6,3м3, з коефіцієнтом заповнення 0,6).

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури, технологічної схеми (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної схеми (формат А1, 1 аркуш). Загальний обсяг роботи – 77 сторінок, 18 таблицок, 5 рисунків та 33 літературних найменувань.

**Ключові слова:** *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF), біосинтез, астаксантин, барвник.

## ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technical and hardware schemes for the biosynthesis of astaxanthin by cultivation of *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF).

In this work, we have reviewed the possible applications of astaxanthin and selected the best targeted use, namely, a food coloring used in shrimp feeding. Taking into account the intended use of astaxanthin, the annual demand for this product was calculated to be 13.5 kg. *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) synthesizes 432.82 mg/l of pigment during 45 hours of cultivation. To obtain the required amount of pigment, the cultivation is carried out in a 6.3-m<sup>3</sup> fermenter.

The technological scheme of astaxanthin biosynthesis by cultivation of *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) includes auxiliary works (air preparation, preparation of titration agents, preparation of metal solution, glycerol storage, preparation and sterilization of the culture medium), as well as the technological processes (cultivation of *Escherichia coli* inoculum and production synthesis of astaxanthin, use of 260 ml flasks and 5, 50 inoculators, and biosynthesis in a 6.3 m<sup>3</sup> fermenter with a filling factor of 0.6).

The qualification work consists of an introduction, nine chapters, a list of references, a flow chart (A1 format, 1 sheet) and a hardware diagram (A1 format, 1 sheet). The total volume of the work is 77 pages, 18 tables, 5 figures and 33 references.

*Key words:* *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF), biosynthesis, astaxanthin, dye.

## Зміст

ВСТУП .....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ .....	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	13
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	17
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	19
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	21
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	21
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	21
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	22
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.....	23
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	24
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	29
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	29
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	31
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	32
5.1. Вибір умов і способу культивування.....	32
5.2. Вибір типу ферментера.....	33
5.3. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	33
5.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	34
5.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	39
5.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН.....	46
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	47
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	50
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	62

8.1. Карта постадійного контролю.....	62
8.2. Мікробіологічний контроль.....	67
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	69
8.3.1. Концентрація біомаси.....	69
8.3.2. Контроль концентрації астаксантину.....	69
8.3.3. Контроль концентрації джерела вуглецю.....	70
8.3.4. Контроль концентрації джерела азоту.....	70
РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ .....	71
9.1. Аналіз технологічної схеми проєктованого біотехнологічного виробництва.....	71
9.2. Способи знезараження води.....	71
9.3. Способи знезараження повітря .....	72
9.4.Способи знезараження твердих відходів.....	72
Список використаної літератури.....	74

## ВСТУП

Астаксантин це природний пігмент, відомий своєю сильною антиоксидантною дією та численними перевагами для здоров'я людей і тварин. На сьогодні відомо, що його антиоксидантна активність значно вища, ніж у  $\beta$ -каротину, і приблизно в тисячу разів ефективніша, ніж вітамін Е [1]. Потенційна користь для здоров'я викликала зростаючий комерційний інтерес, згідно дослідження ринку в 2028 році світовий ринок астаксантину досягне 4,75 мільярдів доларів США, що майже в 3,5 рази більше в порівнянні з 2020 р [2].

Астаксантин природним чином міститься в багатьох морських істотах, таких як форель, креветки та мікроводорості, деяких грибах, бактеріях та квітучих рослинах, враховуючи малу ефективність виділення астаксантину з природних джерел, зростання попиту спонукало до вивчення альтернативних ланцюжків поставок. В даний час комерційне виробництво астаксантину покладається на хімічний синтез або ферментацію мікроводоростей. Перший шлях виробництва є громіздким, і продукт не дозволяється для споживання людиною через наявність кількох хіральных форм астаксантину, а також деяких інших домішок, тоді як останній є дороговартісним [3].

Зважаючи на перераховані факти на сьогодні вчені приділяють більше уваги пошукам більш дешевих альтернативних шляхів отримання астаксантину серед яких є мікробіологічний синтез.

НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ

Вступ

Кафедра БТМ

Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Літ.	Арк.	Акрушів
		Пономарьова В.				8	77
		Ключка Л.В					
		Стабніков В.П.					

Тому на сьогодні є актуальним використання *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) для синтезу астаксантину, через відносно високі показники виходу продукту (432,82 мг/л), відносно невелику вартість синтезованого мг астаксантину ( $4,59 \times 10^{-2}$  грн/мг) та найбільший вихід продукту за год (9,618 мг/год) в порівнянні з іншими продуцентами.

**Мета кваліфікаційної роботи** – проектування ділянки доферментаційних процесів та моделювання технічної та апаратурної схем для біосинтезу астаксантину культивуванням *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF).

**Новизною кваліфікаційної роботи** є можливість виробництва астаксантину з метою подальшого використання в раціоні креветок для покращення їх забарвлення і конкурентної спроможності на ринку.

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.

Астаксантин – жиророзчинний кето-каротиноїдний пігмент, який відноситься до класу ксантофілів і не є попередником вітаміну А. Ця сполука міститься переважно в організмі водних тварин (зокрема, ракоподібних, голкошкірих, лососевих), а також у клітинах рослин (мікродоростей *Haematococcus pluvialis*) і дріжджів *Phaffia rhodozyma* [4]. Також цей пігмент може бути синтезований хімічно [5]. Може перебувати як у вільній формі червоного пігмента (рис. 1.1), так і у вигляді моно-, діестеру або хромопротеїду синього, коричневого або зеленого кольору. Крім цього, існують три оптичних ізомери астаксантину (які відрізняються положеннями 3- і 3'-гідроксильних груп іононових кілець у просторі): (3S, 3'S), (3R, 3'R) і (3R, 3'S). Нині більшість астаксантину отримують хімічним синтезом (при цьому отримують суміш ізомерів (3R, 3'R), (3R, 3'S) і (3S, 3'S) у співвідношенні 1:2:1), оскільки процес культивування водоростей є складним і передбачає необхідність великих площ і високої інтенсивності освітлення [6].

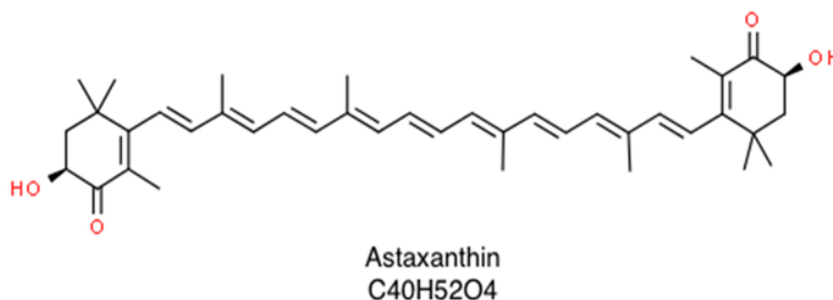


Рис. 1.1. Структура астаксантину [5]

					<b>НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ</b>		
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Пономарьова В.				Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Ключка Л.В.					10	77
Консультант					<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						
<b>Розділ 1. Характеристика цільового продукту</b>							

Фізико-хімічні властивості астаксантину наступні [4-7]:

- органолептичні властивості – порошок темно-червоного кольору;
- молекулярна формула –  $C_{40}H_{52}O_4$ ;
- молекулярна маса – 596,8;
- густина – 1,071 мг/мл;
- розчинність (25 °C) –  $7,9 \cdot 10^{-10}$  мг/л у воді, 30 г/л у дихлорометані, 10 г/л у хлороформі, 0,5 г/л у диметилсульфоксиді, 0,2 г/л в ацетоні;
- температура плавлення – у діапазоні від 182 до 183 °C;

Астаксантин застосовується в основному як барвник (E161j) [7] у кормі для форелі, лососевих і креветок з метою поліпшення забарвлення. Також існують дослідження, в яких показано, що цей пігмент може проявляти антиоксидантні, протизапальні, протипухлинні та імуномодулюючі властивості. За антиоксидантними властивостями астаксантин у 10 разів переважає зеаксантин, лютеїн, кантаксантин, бета-каротин і в 100 разів – альфа-токоферол [6]. Серед оптичних ізомерів астаксантину найбільшу антиоксидантну активність проявляє (3S, 3'S)-ізомер, який становить 95 % від загальної кількості астаксантину, що синтезується водоростями *Haematococcus pluvialis*, за допомогою яких виробляється 50 % від загального обсягу ринку природного астаксантину [6]. Також цей пігмент може зменшувати окисний стрес на  $\beta$ -клітини підшлункової залози, спричинений гіперглікемією, та підвищувати активність кілерних клітин імунної системи [7].

На сьогодні комерційний астаксантин представлений в декількох товарних формах, розглянемо декілька з них.

«Micro Ingredients» виробляє астаксантин у формі м'яких капсул які містять 12 мг астаксантину з соняшниковою олією, астаксантин отриманий з мікроводоростей [8].

«DR. HEILBRONNER» продає порошкоподібний астаксантин який виробляє з рослин, вміст астаксантину 5% [9].

«Daily Chemicals/BOC Sciences» виробляє Astaxanthin 5% який продається в рідкій формі, дана рідина містить екстракт з мікрроводоростей в яких концентрація астаксантину 5 % [10].



*Рис. 1.2. Товарні форми астаксантину*

## РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.

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

Враховуючи збільшення попиту на астаксантин вчені проводять дослід з метою збільшення його виходу, так на сьогодні відомо декілька мікроорганізмів за допомогою яких можна отримати астаксантин, а саме: *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* та *Yarrowia lipolytica*. Порівняльна характеристика біологічних агентів наведена в табл. 2.1.

З даних наведених в табл. 2.1 можна зробити висновок що *Escherichia coli* WLGB-RPP(pAX15, pTrc-ispDF) необхідно культивувати найменшу кількість часу (45 год) в порівнянні з іншими продуцентами, в той час як для *Phaffia rhodozyma* CSR19 необхідно 60 год, а для *Saccharomyces cerevisiae* AX15 – 210 год. Найбільшою концентрацією синтезованого астаксантину характеризується *Escherichia coli* WLGB-RPP(pAX15, pTrc-ispDF) (432,82 мг/л) [11], в 1,07 раза меншу кількість астаксантину синтезує *Saccharomyces cerevisiae* AX15 (404,78 мг/л) [12], а найменш продуктивним є *Phaffia rhodozyma* CSR19 (27,8 мг/л) [13]. Розглянувши порівняльну характеристику продуцентів астаксантину, в якій наведено оптимальний час культивування та максимальна концентрація синтезованого продукту, можна дійти висновку що обрати по даним показникам оптимального продуцента неможливо. Для детальнішого порівняння продуцентів необхідно розглянути, вартість поживного середовища для вирощування біологічного агента. Дані вартості 1 л поживного середовища наведено в табл.2.2

НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ

Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пономарьова В.			<b>Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Ключка Л.В					13	77
Консультант						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

## Порівняльна характеристика продуцентів астаксантину

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація астаксантину, мг/л	Умови культивування	Література
<i>Escherichia coli</i> WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF)	Гліцерин (поч./кінц.) – 30/187; Дріжджовий екстракт – 5; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (поч./кінц.) – 2/26,5; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 6,75; Лимонна кислота – 0,85; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 0,7; Розчин металів (PM) – 7,5 мл Склад PM, г/л: FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 10; ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 2,25; CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O – 1; MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O – 0,5; Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O – 0,23; CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O – 2; (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> – 0,1.	432,82	Ферментація відбувалась в 5 л ферментері 45 год, при 30 °С, рН - 6.95–7.0, при постійному перемішуванні (500-1000 об/хв), рівень розчиненого кисню – 40 %, швидкість внесення кисню 2 л/хв, При використанні гліцерину відбувається внесення підживлювального розчину для підтримання гліцерину на рівні 2 г/л	Park S. Y., Binkley R. M., Kim W. J. Metabolic engineering of <i>Escherichia coli</i> for high-level astaxanthin production with high productivity. <i>Metabolic Engineering</i> . 2018, 49: 105–115. doi:10.1016/j.ymben.2018.08.002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AX15	Глюкоза (поч./кінц.) – 20 / 157; Пептон – 20; Дріжджовий екстракт (поч./кінц.) – 10 / 40; Етанол – 5; Галактоза – 20.	404,78	Ферментація відбувалась в 5 л ферментері 210 год, при 30 °С, рН – 5,8, при постійному перемішуванні (400-600 об/хв), рівень розчиненого кисню – 40, з внесенням підживлювальних розчинів глюкози, галактози, дріжджового екстракту та етанолу	Jiang G., Yang Z., Wang Y. Enhanced astaxanthin production in yeast via combined mutagenesis and evolution. <i>Biochemical Engineering Journal</i> . 2020, 107519. doi:10.1016/j.bej.2020.107519
<i>Phaffia rhodozyma</i> CSR19	Глюкоза – 103; Дріжджовий екстракт – 8,44; Сечовина – 0,12; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 2; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 0,5.	27,8	Ферментація відбувалась в 7,5 л ферментері 60 год, при 25 °С, рН – 5,0, при постійному перемішуванні (700 об/хв), швидкість внесення кисню 10 л/хв	Chi S., He Y., Ren J. Overexpression of a bifunctional enzyme, <i>CrtS</i> , enhances astaxanthin synthesis through two pathways in <i>Phaffia rhodozyma</i> . <i>Microbial Cell Factories</i> . 2015, 14(1). doi:10.1186/s12934-015-0279-4

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF), *Saccharomyces cerevisiae* AX15 та *Phaffia rhodozyma* CSR19**

Продуцент	Компонент поживного середовища	г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1 – 18)*	
<i>Escherichia coli</i> WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF)	Гліцерин	187	57	10,659	1	
	Дріжджовий екстракт	5	1 100	5,5	2	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	26,5	128,8	3,413	3	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,75	31	0,209	4	
	Лимонна кислота	0,85	57	0,048	5	
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,7	28	0,0196	6	
	Розчин металів (PM)	7,5 мл		0,0097		
	Розчин металів – 1,2976 грн/л					
		FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10	60	0,6	12
		ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,25	62	0,1395	13
		CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1	158	0,158	14
		MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,5	63	0,0315	15
		Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	0,23	59	0,01357	16
		CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2	65	0,13	17
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,1	2250	0,225	18
Вартість 1 л середовища – 19,8583 грн						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AX15	Глюкоза	157	64	10,048	7	
	Пептон	20	987	19,74	8	
	Дріжджовий екстракт	40	1 100	44	2	
	Галактоза	20	117	2,34	9	
	Етанол	5	120	0,6	10	
Вартість 1 л середовища – 76,728 грн						
<i>Phaffia rhodozyma</i> CSR19	Глюкоза	103	64	6,592	7	
	Дріжджовий екстракт	8,44	1 100	9,284	2	
	Сечовина	0,12	44	0,0066	11	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	31	0,062	4	
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	28	0,014	6	
Вартість 1 л середовища – 15,9586 грн						

**Примітка:** \* – Ціни вказано станом на березень 2023 р.

- [https://prom.ua/ua/p1419740206-glitserin-pischevoj-opt.html?utm\\_source=google\\_product&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=KT\\_cpc\\_1&gclid=Cj0KCQiAjbagBhD3ARIsANRrEqEv3EHIE\\_HPQ9KuKoMbl1i9I9UaTceatgNjBw1LYd9tUWeYfLXVaquNEaAptcEALw\\_wcB](https://prom.ua/ua/p1419740206-glitserin-pischevoj-opt.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=Cj0KCQiAjbagBhD3ARIsANRrEqEv3EHIE_HPQ9KuKoMbl1i9I9UaTceatgNjBw1LYd9tUWeYfLXVaquNEaAptcEALw_wcB)
- <https://kreon-d.com.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
- <https://novohim.com.ua/ru/catalog/promyshlennaya-khimiya-i-syre/ammonij-fosfornokislyj/>
- <https://soda.kiev.ua/ua/p18394377-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>
- [https://prom.ua/ua/p17985167-kislota-limonnaya-monogidrat.html?utm\\_source=google\\_product&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=KT\\_cpc](https://prom.ua/ua/p17985167-kislota-limonnaya-monogidrat.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc)

- [\\_1&gclid=Cj0KCCQiAjbAgBhD3ARIsANRrqEtzZ5vZ\\_nllKHg0\\_Iou5\\_HLXoj8x0bL-FslTEbJlfwXITpmoM37YTMaAusbEALw\\_wcB](#)
6. [https://sadvij-raj.com.ua/p646069042-sulfat-magniyu-kitaj.html?source=merchant\\_center&gclid=Cj0KCCQiAjbAgBhD3ARIsANRrqEviKHuM5tX8Iw2VuFO-rsiUERUBB\\_fbvr7Cln9fEtdjD66K-5bW5TwaAs\\_pEALw\\_wcB](https://sadvij-raj.com.ua/p646069042-sulfat-magniyu-kitaj.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCCQiAjbAgBhD3ARIsANRrqEviKHuM5tX8Iw2VuFO-rsiUERUBB_fbvr7Cln9fEtdjD66K-5bW5TwaAs_pEALw_wcB)
  7. <https://prom.ua/ua/p1519082061-dekstroza-pischevaya-glyukoza.html>
  8. <https://shop.hlr.ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html>
  9. [https://www.alibaba.com/product-detail/Nutrition-supplements-CAS-381716-33-2\\_1600592570863.html](https://www.alibaba.com/product-detail/Nutrition-supplements-CAS-381716-33-2_1600592570863.html)
  10. [https://gerimpex.com.ua/p1479641032-etanol-tehnicheskij-101.html?source=merchant\\_center&gclid=Cj0KCCQiAjbAgBhD3ARIsANRrqEtkF2wnmtNX8is\\_jrot9aFSubcAizKffyAVqiCIEFzWzCVNuRbE\\_kaAk6vEALw\\_wcB](https://gerimpex.com.ua/p1479641032-etanol-tehnicheskij-101.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCCQiAjbAgBhD3ARIsANRrqEtkF2wnmtNX8is_jrot9aFSubcAizKffyAVqiCIEFzWzCVNuRbE_kaAk6vEALw_wcB)
  11. [https://snabhim.com.ua/karbamid?gclid=Cj0KCCQiAjbAgBhD3ARIsANRrqEupHOcf0skeTN-H6PNCWdSzsp-bgwCq2AwY7bwm3yCrPq2lnldEZ\\_QaAi-oEALw\\_wcB](https://snabhim.com.ua/karbamid?gclid=Cj0KCCQiAjbAgBhD3ARIsANRrqEupHOcf0skeTN-H6PNCWdSzsp-bgwCq2AwY7bwm3yCrPq2lnldEZ_QaAi-oEALw_wcB)
  12. [https://mendelevy-shop.com.ua/p1033368518-zheleznyj-kuporos-sulfat.html?source=merchant\\_center&gclid=Cj0KCCQiAjbAgBhD3ARIsANRrqEuQx5MSsg-RHynbSI3cle53siAzD4aG\\_6XuomI2ZLbhAiw1sRetE7oaAmpXEALw\\_wcB](https://mendelevy-shop.com.ua/p1033368518-zheleznyj-kuporos-sulfat.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCCQiAjbAgBhD3ARIsANRrqEuQx5MSsg-RHynbSI3cle53siAzD4aG_6XuomI2ZLbhAiw1sRetE7oaAmpXEALw_wcB)
  13. [https://prom.ua/ua/p276188788-tsinka-sulfat-vodn.html?utm\\_source=google\\_product&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=KT\\_cpc\\_1&gclid=Cj0KCCQiAjbAgBhD3ARIsANRrqEs0\\_nNElk-19qtaAIRUSekmWI9YXUrenFgw7BZiRoI4w\\_zSASTykYaAlh1EALw\\_wcB](https://prom.ua/ua/p276188788-tsinka-sulfat-vodn.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=Cj0KCCQiAjbAgBhD3ARIsANRrqEs0_nNElk-19qtaAIRUSekmWI9YXUrenFgw7BZiRoI4w_zSASTykYaAlh1EALw_wcB)
  14. <https://ximindustry.com.ua/p15552519-sulfat-medi-meshok.html>
  15. [https://prom.ua/ua/p274731750-sulfat-margantsa-marganets.html?utm\\_source=google\\_product&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=KT\\_cpc\\_1&gclid=Cj0KCCQiAjbAgBhD3ARIsANRrqEsEKv38WhyHQ5rSVaO5y0po\\_fj6rls78AFqrPVsApHo7-nk5mkjPcEaAi0YEALw\\_wcB](https://prom.ua/ua/p274731750-sulfat-margantsa-marganets.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=Cj0KCCQiAjbAgBhD3ARIsANRrqEsEKv38WhyHQ5rSVaO5y0po_fj6rls78AFqrPVsApHo7-nk5mkjPcEaAi0YEALw_wcB)
  16. [https://prom.ua/ua/p1129751708-tetraborat-natriya-bura.html?utm\\_source=google\\_product&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=KT\\_cpc\\_1&gclid=Cj0KCCQiAjbAgBhD3ARIsANRrqEvNgau5JixqUOj0Zlvtij8L8KCCDFrsO8g41tj6IELUGf3sfbXVvAKgaAjPREALw\\_wcB](https://prom.ua/ua/p1129751708-tetraborat-natriya-bura.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=Cj0KCCQiAjbAgBhD3ARIsANRrqEvNgau5JixqUOj0Zlvtij8L8KCCDFrsO8g41tj6IELUGf3sfbXVvAKgaAjPREALw_wcB)
  17. <https://prom.ua/ua/p1740409998-hlorid-kaltsiya-1kg.html?&primelead=MS45>
  18. <https://prom.ua/ua/p1480505362-molibdat-ammoniya-ammonij.html>

В табл. 2.2 розраховано вартість 1 л поживного середовища, з наведених даних можна дійти висновку що найменшою вартістю 1 л поживного середовища для культивування характеризується, *Phaffia rhodozyma* CSR19 (15,96 грн/л), а найбільша вартість притаманна *Saccharomyces cerevisiae* AX15 (76,73 грн/л), що в 4,8 рази більше в порівнянні з *P. rhodozyma* CSR19. Для культивування *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF), використовують поживне середовище (19,86 грн/л), яке в 1,245 рази дорожче в порівнянні з *P. rhodozyma* CSR19 та в 3,86 рази дешевше ніж у *S. cerevisiae* AX15. Так як всі біологічні агенти мають різну вартість 1 л поживного середовища та різні концентрації синтезованого астаксантину необхідно визначити умовну вартість отриманого продукту. Дані умовної вартості 1 г астаксантину наведено в табл. 2.3. Обравши оптимального продуцента для промислового синтезу астаксантину проведемо перевірочний розрахунок складу поживного середовища, та визначимо

чи наведені кількісні показники поживного середовища відповідають теоретичному виходу біомаси та продукту.

## 2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Проведемо розрахунок необхідної кількості вуглецю та азоту для отримання 432,82 мг/л астаксантину та біомаси (в статті не наведено кількісне значення біомаси, але в даній роботі наявні дані що 432,82 мг астаксантину в 1 л культуральної рідини відповідає 7,12 мг з 1 г біомаси, отже кількісний показник біомаси становить  $432,82 / 7,12 = 60,8$  г/л).

### Визначення необхідної кількості вуглецю.

Концентрація астаксантину – 432,82 мг/л

$M(C_{40}H_{52}O_4) = 596$  г/моль;

$M(C_{40}) = 480$  г/моль;

$$\frac{M_{C_{40}} \times C_{40}H_{52}O_4}{M(C_{40}H_{52}O_4)} = \frac{480 \times 0,43282}{596} = 0,349$$

В біомасі вуглець становить 50 % також слід враховувати що під час синтезу біомаси клітина витрачає вуглець для холостого окислення, що приблизно становить 50 % отже для синтезу біомаси витрачається 60,8 г/л вуглецю.

Сумарно на синтез біомаси та астаксантину витрачається  $60,8 + 0,35 = 61,15$  г/л вуглецю.

### Визначення необхідної кількості азоту.

В молекулярній формулі астаксантину азот відсутній тому розрахунки загальної кількості необхідного азоту будуть відбуватись лише по біомасі. В біомасі азоту 10 % отже для синтезу біомаси необхідно  $60,8 * 0,1 = 6,08$  г/л азоту.

Дізнавшись необхідну кількість вуглецю та азоту проведемо розрахунок кількості даних елементів в компонентах поживного середовища. В якості джерела вуглецю виступає гліцерин:

Гліцерин ( $C_3H_8O_3$ ) = 187 г/л;

$M(C_3H_8O_3) = 92$  г/моль;

$M(C_3) = 36$  г/моль;

Відсоткове співвідношення вуглецю:

$$\frac{M_{C_3} \times C_3H_8C_3}{M(C_3H_8C_3)} = \frac{36 \times 197}{92} = 73,17 \text{ г/л вуглецю}$$

Враховуючи дані статті [14], до розрахунку кількості вуглецю можна додати дріжджовий екстракт який містить 40 % вуглецю,  $5 \text{ г/л} * 0,4 = 2 \text{ г/л вуглецю}$ . Отже можна дійти висновку що по наявному кількісному вмісту вуглецю дане поживне середовище відповідає необхідним вимогам.

Визначення азоту.

В якості джерела азоту слугує амоній гідроортофосфат та дріжджовий екстракт, який містить приблизно 10 % азоту [14].

$$(NH_4)_2HPO_4 = 2 \text{ г/л};$$

$$M((NH_4)_2HPO_4) = 132 \text{ г/моль};$$

$$M(N_2) = 28 \text{ г/моль};$$

Відсоткове співвідношення нітрогену:

$$\frac{M_{N_3} \times (NH_4)_2HPO_4}{M((NH_4)_2HPO_4)} = \frac{28 \times 2}{132} = 0,42 \text{ г/л азоту}$$

Дріжджовий екстракт містить  $5 * 0,1 = 0,5 \text{ г/л азоту}$ . Сумарна кількість азоту становить  $0,42 + 0,5 = 0,92 \text{ г/л}$ , що не задовольняє необхідні потреби  $6,08 \text{ г/л}$ , для синтезу біомаси не вистачає  $6,08 - 0,92 = 5,16 \text{ г/л}$ . Проведемо розрахунок кількості амоній гідроортофосфату, при додаванні якого необхідні потреби по азоту будуть задовольнятися.

$$(NH_4)_2HPO_4 = X \text{ г/л};$$

$$M((NH_4)_2HPO_4) = 132 \text{ г/моль};$$

$$M(N_2) = 28 \text{ г/моль};$$

$$\frac{M_{N_3} \times (NH_4)_2HPO_4}{M((NH_4)_2HPO_4)} = \frac{28 \times X}{132} = 5,16$$

$$28 * X = 5,16 * 132$$

$$X = 5,16 * 132 / 28$$

$$X = 24,32 \text{ г амоній гідроортофосфату}$$

Отже, початкову концентрацію солі необхідно збільшити на 24,32 г/л, тоді вона буде становити 26,32 г/л збільшимо до 26,5 г/л для забезпечення невеликого надлишку.

Підсумовуючи вище розраховану інформацію, можна дійти висновку що за кількісним показником вуглецю дане поживне середовище відповідає необхідним параметрам, а за азотом дане поживне середовище буде задовольняти потреби при збільшенні початкової концентрації амонію гідроортофосфату до 26,5 г/л.

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

*Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) – грамнегативна паличкоподібна бактерія з розмірами клітин 1-3\*0,4-0,7 мкм, які можуть розташовуватися поодиноці або парами. Рухлива, з перитрихіально розміщеними джгутиками, аспорогенна, може утворювати капсулу. На агаризованих середовищах цей мікроорганізм утворює сірувато-білі (м'ясо-пептонний агар і кров'яний агар), зелені з металевим блиском (середовище з еозином і метиленовим синім) або рожеві (агар Мак-Конкі) опуклі напівпрозорі колонії діаметром 1-3 мм, які можуть мати м'яку (молоді колонії), шорстку (через декілька повторних висівань) або слизувату (у разі утворення капсул) поверхню (рис. 3.1) [15].



**Рис. 3.1. Морфологія *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF): зліва – вигляд пофарбованих за Грамом клітин під світловим мікроскопом, справа – зовнішній вигляд колоній на кров'яному агарі**

## 2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки

*E. coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) є факультативно анаеробним мікроорганізмом. Сприятливий для росту діапазон температур: 10-40 °C (оптимум – 37 °C). Рівень pH для нормального розвитку: 4,5-9,5 (максимальний ріст спостерігається за pH 7,0) [15]. *E. coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) здатна зброджувати глюкозу, лактозу, мальтозу, рамнозу, арабінозу, маніт, трегалозу, сорбіт та гліцерин з утворенням як кислоти, так і газу, не здатна – целобіозу. Дає позитивний результат у тестах на каталазу, триптофаназу, β-глюкуронідазу, а також у тесті з метиловим червоним, негативний – у реакції Фогеса-Проскауера, тестах на сірководень, оксидазу, уреазу і цитрат [16].

## 2.5. Таксономічний статус біологічного агента

Таксономічний статус *E. coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) наведено згідно з даними сайту [17]:

Домен	<i>Bacteria</i>
Відділ	<i>Pseudomonadota</i>
Клас	<i>Gamma</i> proteobacteria
Порядок	<i>Enterobacteriales</i>
Родина	<i>Enterobacteriaceae</i>
Рід	<i>Escherichia</i>
Вид	<i>coli</i>
Штам	WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF)

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.

### 3.1. Потреба у цільовому продукті

Астаксантин це каротиноїд ксантофілу, який присутній в мікрводоростях, грибах, рослинах, морепродуктах, фламінго та перепелах [18]. На сьогоднішній день дана речовина схвалена Управлінням з продовольства і медикаментів США для використання в кормах для тварин та риб, а Європейською комісією як харчовий барвник (E161j) для використання в харчовій промисловості та виробництві напоїв [19].

Основне призначення даного пігменту це харчова добавка для лосося, крабів, креветок, курчат та виробництва яєць яка дозволяю отримувати більш насичений колір продукції [20], окрім даного застосування через наявні властивості астаксантину, а саме: антиоксидантні, протизапальні та антиапоптозні, існують повідомлення про ряд перспективних функцій з можливим застосуванням, а саме: астаксантин стимулює імунну відповідь, шляхом збільшення синтезу інтерферону та інтерлейкіну без індукції цитотоксичності, відіграє нейропротекторну роль при неврологічних розладах, таких як ішемічне або травматичне пошкодження головного мозку та при субарахноїдальній кровотечі, демонструє кардіпротекторний потенціал, пригнічуючи індуковану гомоцистеїном кардіотоксичність шляхом полегшення мітохондріальної дисфункції та окислювального пошкодження [21]. Також астаксантин ефективно пригнічує метастазування раку товстої кишки та клітинного раку легенів, покращує ефективність стовбурових клітин шляхом збільшення проліферації нервових клітин-попередників та пригнічує перекисне окислення мембран в ендотеліальних клітинах людини та наостанок володіє ефектом проти старіння [21].

НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ

Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пономарьова В.			<b>Розділ 3. Техніко економічне обґрунтування</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Ключка Л.В					21	77
Консультант						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

З огляду на вищеперераховані можливі варіанти застосування астаксантину, на сьогоднішній день оптимальним варіантом є використання його за основним цільовим призначенням, а саме використання в якості пігмента для використання в кормах для тварин та риб, так як нині наявна мала кількість експериментальних підтверджень які б доводили можливість використання астаксантину в медичній та косметичній сферах.

Серед зазначеного списку використання: харчовий барвник для лосося, крабів, креветок та виробництва яєць, в Україні доцільно розглядати лише використання астаксантину в якості барвника для креветок та виробництва яєць, так як вирощування лосося та крабів в Україні не відбувається. Розглядаючи можливе використання астаксантину для покращення забарвлення жовтка яйця або креветок, найкращим варіантом буде використання його в раціоні креветок, через більший вплив насиченості забарвлення на конкурентоспроможність кінцевого продукту.

Отже підсумовуючи зазначену інформацію, виробництво астаксантину доцільно проводити з метою подальшого використання в раціоні креветок для покращення їх забарвлення.

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

На сьогоднішній день в Україні наявний лише одне підприємство яке займається вирощування креветок. В статистичних даних Державної служби статистики України кількість вирощених рожевих креветок не оприлюднена з з ціллю дотримання конфіденційності [22], але розглядаючи наявні повідомлення даної компанії, вона спроможна виробляти до 500 тонн креветок в рік [23].

Враховуючи що дане значення є максимально можливим для даного заводу, яке досягається в оптимальних умовах, прийmemo що в рік вони вирощують 60 % від заданого значення, тоді річна кількість вироблених креветок становить:

$$500\ 000\ \text{кг} \times 0,6 = 300\ 000\ \text{кг (креветок)}$$

Внесення астаксантину в раціон креветок відбувається разом з кормом, та залежить від кількості використовуваного корму, для цього спочатку необхідно визначити яку кількість корму необхідно використати для виробництва розрахованого річного об'єму креветок. Для вирощування 1 кг креветки необхідно 4 кг корму [24], тоді кількість корму для річного об'єму креветок становитиме:

$$300\ 000\ \text{кг (креветок)} \times 4\ \text{кг (корму)} = 1\ 200\ 000\ \text{кг (корму)}$$

Згідно досліджень, оптимальна концентрація астаксантину в кормі становить 75-100 мг/кг, тоді необхідна кількість барвника становитиме, для розрахунку прийємо мінімальне значення концентрації барвника:

$$1\ 200\ 000\ \text{кг (корму)} \times 75\ \text{мг (барвника)} = 90\ 000\ 000\ \text{мг (барвника)}$$

Враховуючи що не вся кількість вироблених креветок потребуватиме насиченого забарвлення, наприклад при реалізації мороженої креветки яскравість забарвлення не відіграватиме важливої ролі, та враховуючи наявні на ринку конкуруючі умови виробленого астаксантину, доцільно прийняти що з річної потреби можливо задовольнити лише 15 %, тоді необхідно виробити:

$$90\ 000\ 000\ \text{мг (барвника)} \times 0,15 = 13\ 500\ \text{г (барвника)}$$

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

Річна потужність виробництва астаксантину:  $G_{\text{гп}} = 13\ 500\ \text{г/рік}$ ;

Кількість робочих днів:  $T_{\text{рд}} = 31\ \text{трудодень}$  (в інші дні виробництво працюватиме над синтезом пігменту для інших сфер використання);

Частка сухих речовин в готовому продукті:  $CP_{\text{гп}} = 0,9$ ;

Концентрація астаксантину в культуральній рідині: 432,82 мг/л (синтез відбувається культивуванням *Escherichia coli* WLGB-RPP (*pAX15,pTrc-ispDF*) [25]);

Час виробничого циклу:  $T_{\text{цф}} = 52\ \text{год}$  (45 год культивування + 7 год підготовка ферментера);

Коефіцієнт запасу нестерильних операцій:  $K_1 = 1,2$ ;

Коефіцієнт заповнення ферментера:  $K_3 = 0,6$ ;

Втрата продукту при виділенні:  $E_{cb} = 0,35$ ;

Втрата культуральної рідини при краплиності:  $E_f = 0,1$ .

Враховуючи заплановану кількість трудоднів та час виробничого циклу, кількість виробничих циклів за рік становитиме:

$$N_{\text{цк}} = 24 \times T_{\text{рд}} / T_{\text{цф}} = 24 \times 31 / 52 = 14,3 \text{ циклів, тобто } 15 \text{ циклів}$$

Визначивши кількість виробничих циклів, розрахуємо кількість продукту, яка утворюється за даний один виробничий цикл:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{гп}} / N_{\text{цк}} = 13\,500 \text{ г} / 15 = 900 \text{ г/цикл}$$

Розрахувавши кількість атаксантину яку отримуємо за один цикл, врахуємо кількість культуральної рідини з врахуванням втрат при виділенні, необхідної для отримання даної кількості продукту.

$$V_{\text{кр}} = K_1 \times G_{\text{цк}} \times C_{\text{гп}} / P_{\text{кр}} (1 - E_{cb}) = 1,2 \times 900 \times 0,9 / (432,82 \times (1 - 0,35)) = 3,46 \text{ м}^3$$

За один виробничий цикл отримують  $3,46 \text{ м}^3$  культуральної рідини, так як під час ферментації відбуваються втрати культуральної рідини в результаті краплиності, кількість культуральної рідини з врахуванням даних втрат, становитиме:

$$V_f = V_{\text{кр}} / (1 - E_f) = 3,46 / (1 - 0,1) = 3,84 \text{ м}^3$$

З врахуванням коефіцієнту заповнення, приблизний геометричний об'єм ферментера становитиме:

$$V_{\text{пф}} = V_f / K_3 = 3,84 / 0,6 = 6,4 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий ферментер з стандартним геометричним об'ємом  $6,3 \text{ м}^3$ , тоді дійсний коефіцієнт заповнення становитиме:

$$K_{3\text{ф}} = V_{\text{кр}} / V_{\text{пф}} = 3,84 / 6,3 = 0,61$$

Дане значення коефіцієнту заповнення, знаходиться в допустимих межах для аеробного процесу ферментації, отже, обраний ферментер задовольняє наші вимоги.

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

За один виробничий цикл отримуємо  $V_{\text{пц}} = 3,46 \text{ м}^3$  культуральної рідини. Під час отримання культуральної рідини необхідно передбачити втрати КР в

результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря ( $E_{\phi}$ ), які становлять 10%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{пц}}}{1-E_{\phi}} = \frac{3,46}{1-0,1} = 3,84 \text{ м}^3$$

Під час виробничого біосинтезу буде відбуватись внесення підживлювального розчину, який складається з трьох кратної концентрації поживного середовища, тому слід провести розрахунок початкового об'єму культуральної рідини і розчину підживлення (за правилом хреста), розрахунок проводитимемо по концентрації меляси для зручності розрахунків:

1000            157 частин – розчину підживлення

187

30                813 частин – початкове поживне середовище

(187 – 30 = 157, 1000 – 187 = 813)

Співвідношення початкового об'єму культуральної рідини до розчину підживлення 813 до 157

1 частина культуральної рідини становить  $3,84 / (813 + 157) = 3,96$  л

Об'єм розчину підживлення  $V_{\text{ж.сум.}} = 157 \cdot 3,96 = 620$  л

Початковий об'єм культуральної рідини  $V_{\text{п.кр.}} = 813 \cdot 3,96 = 3\,220$  л

#### *Розрахунок кількості ПС та ПМ для ферментера*

Робочий об'єм ферментера складається з суми об'єму поживного середовища (ПС)  $V_{\text{пс1}}$  та об'єму посівного матеріалу (ПМ)  $V_{\text{пм1}}$ . Посівний матеріал готується в посівному апараті (ПА) та його об'єм дорівнює 10 % від об'єму поживного середовища який подається до ферментера:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 3,22 / (1 + 0,1) = 2,93 \text{ м}^3$$

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 3,22 - 2,93 = 0,29 \text{ м}^3$$

#### *Розрахунок кількості ПС та ПМ для посівних апаратів*

Посівний матеріал для виробничого біосинтезу вирощують в посівному апараті з наступним робочим об'ємом  $V_{\text{роб2}}$

$$V_{\text{роб}2} = V_{\text{пм}1} / (1 - E_{\text{пм}}) = 290 / (1 - 0,13) = 333,3 \text{ л}$$

де  $E_{\text{пм}} = 0,13$  – втрати культуральної рідини при вирощуванні посівного матеріалу в посівному апараті за рахунок краплевиносу частини культуральної рідини під час аерації середовища.

Для одержання посівного матеріалу потрібно мати наступний об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс}2}$  та кількість посівного матеріалу який становить 10% від об'єму поживного середовища  $V_{\text{пс}2}$

$$V_{\text{пс}2} = V_{\text{роб}2} / (1 + X_{\text{пм}2}) = 333,3 / (1 + 0,1) = 303 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{\text{пм}2} = V_{\text{роб}2} - V_{\text{пс}2} = 333,3 - 303 = 30,3 \text{ л}$$

Для визначення приблизного геометричного об'єму посівного апарата  $V_{\text{па}1}$  використовуємо  $V_{\text{роб}2}$  та  $K_{\text{зап}}$  – коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{\text{па}1} = V_{\text{роб}2} / K_{\text{зап}} = 333,3 / 0,6 = 555 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Escherichia coli* WLGB-RPP (*pAX15, pTrc-ispDF*) можна отримати при культивуванні в посівному апараті з геометричним об'ємом  $V_{\text{па}} = 600 \text{ л}$ .

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення буде

$$K_{\text{зап}2} = V_{\text{роб}2} / V_{\text{па}} = 333,3 / 600 = 0,55, \text{ що допустимо для аеробного біосинтезу.}$$

Посівний матеріал для інокулювання посівного апарату об'ємом 600 л вирощують в посівному апараті з наступним робочим об'ємом  $V_{\text{роб}3}$

$$V_{\text{роб}3} = V_{\text{пм}2} / (1 - E_{\text{пм}}) = 30,3 / (1 - 0,13) = 34,83 \text{ л}$$

де  $E_{\text{пм}} = 0,13$  – втрати культуральної рідини при вирощуванні посівного матеріалу в посівному апараті за рахунок краплевиносу частини культуральної рідини під час аерації середовища.

Для одержання посівного матеріалу потрібно мати наступний об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс}3}$  та кількість посівного матеріалу який становить 10% від об'єму поживного середовища  $V_{\text{пс}3}$

$$V_{\text{пс}3} = V_{\text{роб}3} / (1 + X_{\text{пм}3}) = 34,3 / (1 + 0,1) = 31,66 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб3}} - V_{\text{пс3}} = 34,83 - 31,66 = 3,17 \text{ л}$$

Для визначення приблизного геометричного об'єму посівного апарата  $V_{\text{па2}}$  використовуємо  $V_{\text{роб3}}$  та  $K_{\text{зап}}$  – коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{\text{па2}} = V_{\text{роб3}} / K_{\text{зап}} = 34,83 / 0,6 = 58,05 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Escherichia coli* WLGB-RPP (*pAX15,pTrc-ispDF*) можна отримати при культивуванні в посівному апараті з геометричним об'ємом  $V_{\text{па}} = 60$  л.

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення буде

$$K_{\text{зап3}} = V_{\text{роб3}} / V_{\text{па}} = 34,83 / 60 = 0,58, \text{ що допустимо для аеробного біосинтезу.}$$

#### *Розрахунок ПС та ПМ для інокулятора*

Посівний матеріал для засіву посівного апарату об'ємом 60 л вирощують в інокуляторі з наступним робочим об'ємом  $V_{\text{роб4}}$

$$V_{\text{роб4}} = V_{\text{пм4}} / (1 - E_{\text{пм4}}) = 3,17 / (1 - 0,05) = 3,33 \text{ л,}$$

де  $E_{\text{пм3}} = 0,05$  – це втрати КР при вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі за рахунок краплевиносу частини КР під час аерації середовища.

Для одержання посівного матеріалу  $V_{\text{пс4}}$  потрібно мати наступний об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс3}}$  та кількість посівного матеріалу, яка дорівнює 10% від об'єму поживного середовища  $V_{\text{пс4}}$

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб4}} / (1 + X_{\text{пм4}}) = 3,33 / (1 + 0,1) = 3,03 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб4}} - V_{\text{пс4}} = 3,33 - 3,03 = 0,3 \text{ л}$$

Для визначення приблизного геометричного об'єму інокулятора  $V_{\text{ін1}}$  використовуємо  $V_{\text{роб4}}$  та  $K_{\text{зап}}$  – коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{\text{ін1}} = V_{\text{роб4}} / K_{\text{зап}} = 3,33 / 0,6 = 5,55 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Escherichia coli* WLGB-RPP (*pAX15,pTrc-ispDF*) можна отримати при культивуванні в інокуляторі з геометричним об'ємом  $V_{\text{ін1}} = 5$  л.

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення буде

$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб3}} / V_{\text{ин}} = 3,33 / 5 = 0,66$ , що несильно перевищує необхідний діапазон, тому залишаємо його.

*Розрахунок кількості ПС та ПМ для качалочних колб*

Об'єм посівного матеріалу, який необхідно отримати в колбах на качалці становить  $V_{\text{пм4}} = 0,3$  л. Втрати при культивуванні в колбах нехтуємо, оскільки вони малі.

$$V_{\text{роб5}} = V_{\text{пм4}} = 0,3 \text{ л}$$

Для одержання посівного матеріалу потрібно мати наступний об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс4}}$  та кількість посівного матеріалу, що дорівнює 10% від об'єму поживного середовища  $V_{\text{пс5}}$

$$V_{\text{пс5}} = V_{\text{роб5}} / (1 + X_{\text{пм5}}) = 0,3 / (1 + 0,1) = 0,27 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{\text{пм5}} = V_{\text{роб5}} - V_{\text{пс5}} = 0,3 - 0,27 = 0,03 \text{ л}$$

Для культивування використовуємо колби об'ємом  $V_{\text{кол}} = 0,75$  л та коефіцієнтом заповнення  $K_{\text{зап}} = 0,2$

Кількість колб

$$N_k = V_{\text{роб5}} / V_{\text{кол}} \times K_{\text{зап}} = 0,3 / 0,75 \cdot 0,2 = 2 \text{ колби}$$

Підсумовуючи можна зазначити, що процес одержання посівного матеріалу для виробничого синтезу астаксантину культивуванням *Escherichia coli* WLGB-RPP (*pAX15,pTrc-ispDF*) у ферментері об'ємом  $6,3 \text{ м}^3$  і з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи.

*Таблиця 3.1*

**Об'єми апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу *Escherichia coli* WLGB-RPP (*pAX15,pTrc-ispDF*) та виробничого біосинтезу астаксантину**

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_f$ , л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$ , частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{\text{роб}}$ , л	Об'єм ПС, $V_{\text{пс}}$ , л	Об'єм ПМ, $V_{\text{пм}}$ , л
1	$0,750 \times 2$ колби	0,2	0,3	0,27	0,03
2	5	0,66	3,33	3,03	0,3
3	60	0,58	34,83	31,66	3,17
4	600	0,55	333,3	303	30,3
5	6 300	0,61	3 840	3 220	290

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

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

*E. coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) в якості джерела вуглецю використовує гліцерин. Схему метаболізму *E. coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) у KEGG не наведено, тому розглянемо метаболізм спорідненого мікроорганізму – *Escherichia coli* K-12 MG1655 [13].

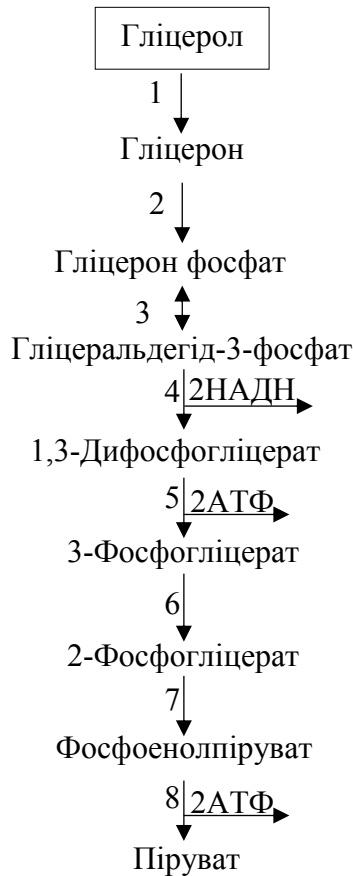


Рис.4.1 Шлях катаболізму гліцеролу *Escherichia coli* K-12 MG1655.

НУХТ БТЕК 04.03 КР ПЗ				
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Пономарьова В		
Перевір.		Ключка Л.В		
Консультант				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
<b>Розділ 4. Біосинтез цільового продукту</b>				
		Літ.	Арк.	Акрушів
		29	77	
<b>Кафедра БТМ</b>				

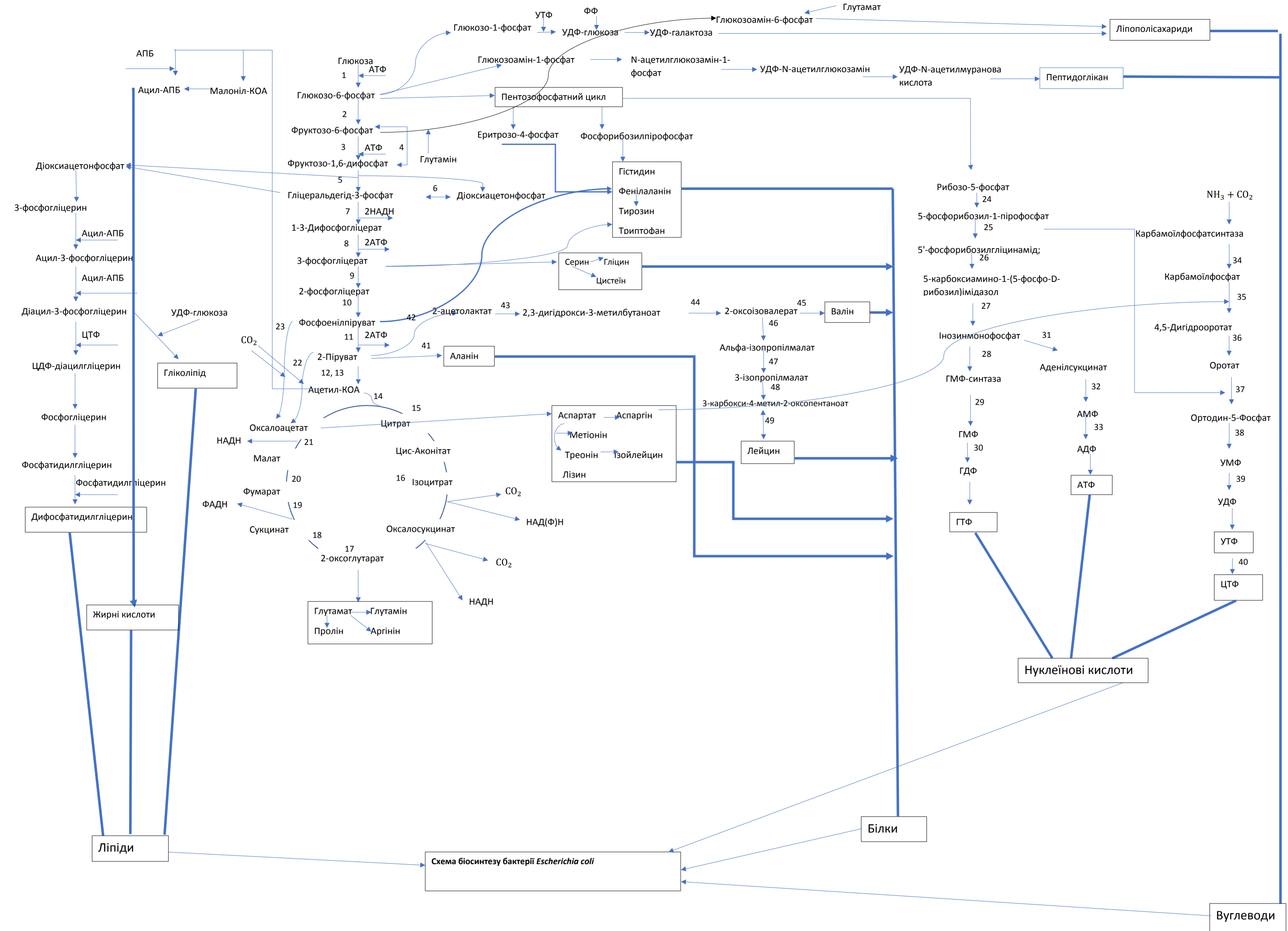
Ферменти: 1 – гліцеролдегідрогеназа [КФ: 1.1.1.6], 2 – дигідроксиацетонкіназа [КФ: 2.7.1.121], 3 – тріозофосфат ізомераза (ТІМ) [КФ: 5.3.1.1], 4 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа [КФ: 1.2.1.12]; 5 – фосфогліцераткіназа [КФ: 2.7.2.3]; 6 – 2,3-бісфосфогліцерат-залежна фосфогліцерат-мутаза [КФ: 5.4.2.11]; 7 – енолаза [КФ: 4.2.1.11]; 8 – піруваткіназа [КФ: 2.7.1.40].

#### **4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт**

У процесі біосинтезу із пірувату утворюється Ацетил-КОА, який залучається до ЦТК.

##### **Утворення амінокислот:**

- Амінокислоти аспартатної родини (аспартат, аспарагін, метіонін, треонін, ізолейцин) утворюються з оксалоацетату, який є інтермедіатом ЦТК.
- Амінокислоти глутаматної родини (глутамат, глутамін, пролін, аргінін) утворюються з 2-оксоглутарату (інтермедіату ЦТК).
- Глюкозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу, в якому утворюються попередники ароматичних амінокислот – фосфорибозилпірофосфат (попередник гістидину) і еритрозо-4-фосфат. Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват – попередники фенілаланіну, тирозину і триптофану.
- 3-Фосфогліцерат є попередником серину, гліцину і цистеїну. Піруват – попередник аланіну, валіну і лейцину.



**Ферменти:**

1— гексокіназа (КФ:2.7.1.1), 2- глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ:5.3.1.9), 3- 6-фосфоглюкокіназа (КФ:2.7.1.11), 4- фруктозо-1,6-бісфосфатаза I (КФ:3.1.3.11), 5- фруктозо-дифосфат альдолаза I класу (КФ:4.1.2.13), 6- триозофосфат Ізомераза (КФ:5.3.1.1), 7- – гліцеральдегід 3-фосфат дегідрогеназа (КФ:1.2.1.12), 8- фосфогліцерат кінназа (КФ:2.7.2.3), 9 2,3, бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ: 5.4.2.11), 10 енoлаза (КФ: 4.2.11), 11- піруваткіназа (КФ:2.7.1.40), 12- – піруватдегідрогеназа K1 компонент (КФ 1.2.4.1), 13- піруватдегідрогеназа K2 компонент (КФ 2.3.1.12); 14 –цитрат синтаза (КФ 2.3.3.1), ); 15 - ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 16 - 2 - оксoглутаратдегідрогеназа (КФ 1.2.4.2); 17 - сукцинаттіокіназа (КФ 6.2.1.4); 18 - сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); 19 - фумараза (КФ 4.2.1.2); 20 - малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37), 21 - 3- дезоксиарабіногептулозо-7-фосфатсинтаза (КФ 2.5.1.54); 22 - піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1), 23 - фосфоенілпіруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31, 24 - рибозо-фосфат-пірофосфокіназа [КФ: 2.7.6.1 ], 25 - фосфорибозиламін---гліциніліаза [КФ: 6.3.4.13 ], 26 - 5-(карбоксиаміно)імідазол рибонуклеотидсинтаза [КФ: 6.3.4.18 ], 27 - IMP циклогідролаза [КФ: 2.1.2.3 3.5.4.10 ], 28 - IMP дегідрогеназа (КФ: 1.1.1.205 ], 29 - GMP синтаза (гідролізуюча глютамін) [КФ: 6.3.5.2 ], 30 - гуанілаткіназа [КФ: 2.7.4.8 ], 31 - аденілукуцинатсинтаза [КФ: 6.3.4.4 ], 32 - аденілукуцинатліаза [КФ: 4.3.2.2 ], 33 - аденілаткіназа [КФ: 2.7.4.3 ], 34 - велика субодиниця карбамоїл-фосфатсинтази [КФ: 6.3.5.5 ], 35 - дигідрооротаза [КФ: 3.5.2.3 ], 36 - дигідрооротатдегідрогеназа (фумарат) [КФ: 1.3.98.1 ], 37 - оротатфосфорибозилтрансфераза [КФ: 2.4.2.10 ], 38 - оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза [КФ: 4.1.1.23 ], 39 - уридилаткіназа [КФ: 2.7.4.22 ], 40 - ЦТФ-синтаза [КФ: 6.3.4.2 ], 41 - аланінсинтезуюча трансаміназа [КФ: 2.6.1.66 2.6.1.2 ], 42 - велика субодиниця ацетолактатсинтази I/II/III [КФ: 2.2.1.6 ], 43 - редуктоізомераза кетолової кислоти [КФ: 1.1.1.86 ], 44 - дигідрокисла дегідратаза [КФ: 4.2.1.9 ], 45 - аміотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом [КФ: 2.6.1.42 ], 46 - 2-ізопропілмалатсинтаза [КФ: 2.3.3.13 ], 47 - Мала субодиниця 3-ізопропілмалат/(R)-2-метилмалатдегідратази [КФ: 4.2.1.33 4.2.1.35 ], 48 - 3-ізопропілмалатдегідрогеназа [КФ: 1.1.1.85 ], 49 -

## РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.

### 5.1. Вибір умов і способу культивування

Вибір умов культивування залежить від морфолого-культуральної характеристики продуцента. Виробничий синтез астаксантину відбувається культивуванням *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF), оптимальні умови росту якої 30 °С та рН 7,0, що означає що даний мікроорганізм є мезофільним нейтрофілом. З даного факту можна зробити висновок, що умови культивування є сприятливими для більшості мікроорганізмів, що сприяє великому ризику контамінації. Тому, для усунення можливої контамінації процес культивування пропонується проводити в асептичних умовах.

Також враховуючи що астаксантин є вторинним метаболітом, тобто накопичується поза клітинами, а максимальний синтез спостерігається в стаціонарній фазі росту, для способу культивування оптимально обрати глибинний метод з періодичним культивуванням.

По відношенню до кисню представники *Escherichia coli* є факультативними аеробами, що означає що даний продуцент може рости як з доступом кисню так і без нього, але враховуючи дані переглянуті під час обрання оптимального продуцента, а саме наявність аерації, можна зробити висновок що для синтезу астаксантину необхідна постійна аерація. Так як культивування буде відбуватись в асептичних умовах, слід передбачити очищення повітря та його подальшу подачу в ферментер.

Також слід врахувати що процес виробничого синтезу відбувається з дробним внесенням гліцерину.

НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ

Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пономарьова В.			<b>Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Ключка Л.В.					32	77
Консультант						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Підсумовуючи вище наведену інформацію, можна зробити висновок що процес виробничого біосинтезу астаксантину культивуванням *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) буде відбуватись періодично глибинним методом в асептичних умовах з постійним внесенням стерильного повітря та подачею гліцерину.

## **5.2. Вибір типу ферментера**

Вибір типу ферментера в основному залежить від умов культивування, тому слід врахувати обрані умови культивування в попередньому пункті.

Для біосинтезу було встановлено необхідність постійного внесення стерильного повітря, так як процес культивування буде відбуватись глибинним методом, необхідно передбачити наявність в ферментері барботера (через який будуть подавати стерильне повітря), а також необхідно встановити над барботером мішалку, яка буде покращувати розподіл повітря в товщі води.

Процес культивування слід проводити з постійним підтриманням оптимальної температури, отже, ферментер повинен бути оснащений сорочкою, в яку буде подаватись пара для нагріву, або холодна вода для охолодження культуральної рідини всередині.

Також під час культивування необхідно підтримувати певний рівень температури (30 °C) та рівень рН (7,0), для цього необхідно передбачити встановлення датчиків рівня рН та температури.

Отже, виробничий ферментер повинен оснащуватись датчиками рівня рН, температури та розчиненого кисню, сорочкою, барботером та мішалкою.

## **5.3. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря**

*Escherichia coli* є факультативно анаеробною бактерією, яка здатна рости як при наявності кисню так і його відсутність, з огляду на статтю [26] в якій описується процес синтезу астаксантину, можна зробити висновок що для синтезу пігменту необхідно забезпечити аеробні умови, бо процес культивування а згаданому дослідженні проводили з подачею кисню.

Зважаючи на необхідність асептичних умов, аераційне повітря необхідно попередньо підготувати, процес отримання очищеного повітря для виробничого культивування передбачає наступні етапи:

1. Забір атмосферного повітря (здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником у найвищій точці  $H \sim 18$  м (висота поверху – 6 м, кількість поверхів – 2, висота поверхів – 12 м, разом з косим дахом будівлі (+3 м) – 15, відбір повітря повинен відбуватися на 2-3 метри вище найвищої точки), де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря);

2. Очищення повітря від пилу (здійснюють за допомогою тканинних фільтрів грубого очищення)

3. Стиснення повітря (проводять в компресорах або турбоповітродувках, в результаті повітря нагрівається до температури 120 – 200 °С);

4. Охолодження стисненого повітря до температури «точки роси» для конденсації вологи;

5. Видалення конденсованої вологи (проводять у ресивері, який також зменшує пульсації руху повітря, які можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря);

6. Стабілізація тиску та температури підігріванням до 45–50 °С паром у відповідних теплообмінниках;

7. Очищення в головних ємнісних набивних фільтрах (установлених поблизу ферментаційних відділень, ступінь очищення на виході  $E=95\%$ );

8. Очищення в індивідуальних фільтрах (ступінь очищення на виході  $E=99,995\%$ , фільтри установлені на ферментаційному обладнанні, повітря подається безпосередньо від головних фільтрів через трубопроводи).

#### **5.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

Підприємство містить відділення приготування поживного середовища, отримання посівного матеріалу, відділення виробничої ферментації, відділення, в яких відбувається очищення цільового продукту від домішок.

Для зменшення накопичення пилу і полегшення прибирання в приміщеннях не має бути заглиблень, що не піддаються очищенню, і має бути як-найменше країв, які виступають, полиць, шаф і обладнання. Двері мають бути сконструйовані без заглиблень, недоступних для очищення; з цієї ж причини небажано використовувати розсувні двері.

Підвісні стелі мають бути герметизовані з метою запобігання контамінації з простору над ними.

Труби, канали та інші комунальні споруди мають бути встановлені таким чином, щоб не утворювалися заглиблення і незакриті отвори, а також були відсутні поверхні, не доступні для очищення.

При асептичному виробництві найбільш критична операція, тобто наповнення флаконів стерильною суспензією інсуліну, забезпечується ламінарним потоком повітря (клас А). У приміщенні класу В відбувається підготовка суспензії препарату та її стерилізуюча фільтрація. В приміщенні класу С відбувається мийка флаконів, приладів, а також підготовка до стерилізації пересувних ємностей.

Персонал входить до чистих приміщень через двокаскадні шлюзи. До приміщення класу А вхід персоналу через шлюзи персоналу С та В, а до приміщення класу В – через шлюзи Д та С. Матеріал надходить до чистих приміщень через шлюзи матеріалу С та В.

Надлишковий тиск забезпечує потік повітря з приміщення з вищим класом чистоти до приміщення з меншим рівнем чистоти. Згідно вимог GMP перепад тиску між окремими класами чистоти 10-15 МПа. Проектний надлишковий тиск:

- 30-45 Па для приміщень з класом чистоти В;
- 20-30 Па для приміщень з класом чистоти С.

Двері між приміщеннями забезпечені оптичною та акустичною сигналізацією відкриття дверей в приміщення з іншим класом чистоти. Перепади тиску між окремими приміщеннями контролюють за допомогою манометрів, розташованих на зовнішніх сторонах перегородок.

Санітарна підготовка виробництва інсуліну у флаконах є критично важливою для забезпечення якості та безпеки продукції. Основні стадії санітарної підготовки:

Очищення обладнання та приміщень.

Перед початком виробництва необхідно очистити всі обладнання, контейнери, приміщення та інші поверхні від попередніх забруднень або залишків попередньої продукції. Це може включати мийку та дезінфекцію устаткування та приміщень за допомогою спеціальних засобів.

Мийка.

Після очищення обладнання проводиться мийка. Вона видаляє бруд, жири, бактерії та інші забруднення з поверхонь обладнання. Під час мийки важливо використовувати підходящі мийні засоби, які ефективно видаляють забруднення, але не залишають залишків, які можуть вплинути на якість продукції.

Дезінфекція.

Після мийки необхідно провести дезінфекцію поверхонь для знищення залишкових мікроорганізмів. Для цього використовують спеціальні дезінфікуючі засоби, які ефективно вбивають бактерії, віруси та грибки. Важливо враховувати, що дезінфікуючі засоби повинні бути безпечними для використання у виробничому середовищі та не залишати залишків, які можуть негативно вплинути на продукцію.

Перевірка ефективності.

Після мийки та дезінфекції важливо перевірити ефективність процесу. Це може включати використання тестових стрічок або інших методів контролю за чистотою поверхонь та виявленням залишкових мікроорганізмів.

Щодо вибору мийних та дезінфікуючих засобів, важливо враховувати наступне:

1. Засоби повинні бути ефективними в видаленні забруднень та знищенні мікроорганізмів.

2. Вони повинні бути безпечними для використання у виробничому середовищі та не містити шкідливих речовин, які можуть негативно вплинути на продукцію або здоров'я працівників.

3. Засоби повинні бути сумісними з матеріалами, з яких виготовлені устаткування та контейнери, щоб уникнути пошкоджень або забруднень.

4. Важливо, щоб після використання засоби залишали мінімальні або нульові залишки, щоб уникнути впливу на якість продукції.

Вибір конкретних мийних та дезінфікуючих засобів може залежати від конкретних умов виробництва, типу забруднень та вимог до чистоти продукції. Важливо провести аналіз ризиків та вибрати оптимальні засоби з урахуванням всіх вищезазначених факторів.

Щоб обрати мийний та дезінфікувальний засіб, необхідно врахувати його вартість та витримати на оброблюванню потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м<sup>2</sup> затрачається 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікувального засобу.

Каустична сода добре розчиняється у воді. Водні розчини мають лужну реакцію. Гарячі (1–2) % розчини каустичної соди добре обмилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи.

Кальцинована сода у водних розчинах частково розкладається з утворенням їдкого луку та гідрокарбонату, які зумовлюють мийні властивості. Гарячі (55±5) °C розчини кальцинованої соди добре обмилюють жирові забруднення на поверхнях та руйнують білки. При зменшенні температури розчинів до (45±5) °C їх мийна здатність різко падає. Розчини кальцинованої соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію.

Хлорне вапно. Для виготовлення 1 чи 2% розчину хлорного вапна спочатку готують 10% розчин. У скляній ємкості розчиняють 1 кг хлорного вапна в 10 л води. Воду додають поступово, розмішуючи розчин дерев'яним шпателем. Після розчинення хлорного вапна розчин перемішують ще кілька хвилин і дають відстоятися протягом доби.

Дезактін – дезінфекційний засіб з мийним ефектом. Дезактін виявляє бактерицидні, туберкулоцидні та фунгіцидні властивості.

Розчин «Сокрена». Склад: додецилдиметиламонію хлорид, ПАР, інгібітор корозії, комплексоутворювачі, піногасники, вода. Використовують для поточної та остаточної дезінфекції приміщень, устаткування, посуду. Виявляє бактерицидну, фунгіцидну, віруліцидну дію. Термін придатності робочого розчину — 30 днів, концентрату — 3 роки.

Перекис водню – негорюча рідина, сильний окислювач. Розкладається на воду та кисень, змішується з водою в будь-якому співвідношенні. Перекис водню виявляє бактерицидні, віруліцидні та спороцидні властивості.

Гембар добре розчинний у воді. Не ушкоджує об'єкти, виготовлені з металу, скла, полімерних матеріалів та гуми. Гембар виявляє бактерицидні та віруліцидні властивості.

Таблиця 5.1 - Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва астаксантину.

Назва мийного або дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття або дезінфекції	Концентрація робочого розчину %	Загальна площа (об'єм) миття або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва (л)	Вартість 1л мийного або дезінфікуючого засобу, грн	Загальна вартість миття або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Кальцинована сода	Приміщення, устаткування, комунікації	2.0	500 000	50 000	9.50	9 500
Каустична сода	Приміщення, устаткування, комунікації	2.0	500 000	50 000	31.00	31 000
Гембар	Стіни, підлога, інвентар, вікна, двері	0.5	56 940	5 694	275.00	7 972
Дезактін	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0.3	56 940	5 694	212.00	2 392
Розчин спирту 76%	Устаткування, руки персоналу	75.0	45 500	4 500	31.00	103 000
Перекис водню	Тара, устаткування	6.0	350 000	3 500	121.00	17 800

### 5.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Поживне середовище для отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу має різний компонентний та кількісний склад, тому умови підготовки даних середовищ будуть різні. Для отримання посівного матеріалу використовують середовище Лурія-Бертані, яке має наступний компонентний склад (г/л):

Дріжджовий екстракт – 24;

Триптон – 20;

Монофосфат калію – 2,3;

Гідроортофосфат калію – 12,5;

Гліцерин – 4 мл.

Виробничий біосинтез відбувається з дробним внесенням гліцерину, для виробничого біосинтезу використовують поживне середовище, яке має наступний компонентний склад (г/л):

Гліцерин (поч./кінц.) – 30/187;

Дріжджовий екстракт – 5;

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 26,5;

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 6,75;

Лимонна кислота – 0,85;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,7;

Розчин металів (РМ) – 7,5 мл

Розчин металів має наступний компонентний склад, г/л:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 10;

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 2,25;

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 1;

$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  – 0,23;

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 2;

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  – 0,1.

Розглянемо більш детально процес приготування та стерилізації поживного середовища в залежності від стадії виробничого процесу.

#### *Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці*

На стадію вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці необхідно приготувати 0,27 л поживного середовища, враховуючи що об'єм поживного середовища невеликий стерилізацію доцільно провести в автоклаві. Поділ компонентів на композиції відбувається з врахуванням відношення компонентів до температури.

*Композиція А:* Триптон та дріжджовий екстракт (112 °С, 0,05 МПа, 20 хв);

*Композиція Б:* Монофосфат калію та гідроортофосфат калію (131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

*Композиція В:* Гліцерин.

Дріжджовий екстракт та триптон є термолабільними речовинами тому їх об'єднують в одну композицію та стерилізують впродовж 20 хв при температурі 112 °С. Фосфатні солі об'єднують в одну композицію поміщають в колбу розчиняють водою та стерилізують в автоклаві впродовж 40 хв при температурі 131 °С. Гліцерин не потребує стерилізації тому його вносять окремо. Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці наведено в табл. 5.2.

*Таблиця 5.2*

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,27 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	24	6,48	А	0,1
Триптон	20	5,4		
Вода		100 (мл)		
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	2,3	0,621	Б	0,169
К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	12,5	3,375		
Вода		169 (мл)		
Гліцерин	4 мл	1,08 (мл)	В	0,001
Разом				0,27

*Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л*

На стадію вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л необхідно приготувати 3,03 л поживного середовища, враховуючи що об'єм поживного середовища невеликий стерилізацію доцільно провести в

автоклаві. Поділ компонентів на композиції відбувається з врахуванням відношення компонентів до температури.

*Композиція А:* Триптон та дріжджовий екстракт (112 °С, 0,05 МПа, 20 хв);

*Композиція Б:* Монофосфат калію та гідроортофосфат калію (131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

*Композиція В:* Гліцерин.

Дріжджовий екстракт та триптон є термолабільними речовинами тому їх об'єднують в одну композицію та стерилізують впродовж 20 хв при температурі 112 °С. Фосфатні солі об'єднують в одну композицію поміщають в колбу розчиняють водою та стерилізують в автоклаві впродовж 40 хв при температурі 131 °С. Гліцерин не потребує стерилізації тому його вносять окремо. Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л наведено в табл. 5.3.

*Таблиця 5.3*

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,03 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	24	72,72	А	1,5
Триптон	20	60,6		
Вода		1,5 (л)		
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	2,3	6,97	Б	1,52
К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	12,5	37,875		
Вода		1,52 (л)		
Гліцерин	4 мл	12,12 (мл)	В	0,01
Разом				2,63

*Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 60 л*

На стадію вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 60 л необхідно приготувати 31,66 л поживного середовища, з огляду на компонентний склад поживного можна зазначити що поділ компонентів на композиції відбуватиметься як і на попередній стадії, основна відмінність на даній стадії полягає в приготуванні та стерилізації композицій в реакторах.

*Композиція А:* Триптон та дріжджовий екстракт (112 °С, 0,05 МПа, 20 хв);

*Композиція Б:* Монофосфат калію та гідроортофосфат калію (131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

*Композиція В:* Гліцерин.

Дріжджовий екстракт та триптон є термолабільними речовинами тому їх об'єднують в одну композицію, приготування та стерилізацію проводять в реакторі об'ємом 10 л, стерилізацію проводять гострою парою впродовж 20 хв при температурі 112 °С. Солі поміщають в реактор об'ємом 5 л вносять частину воду та розчиняють після розчинення солей розчин подають в посівний апарат та вносять іншу частину води, стерилізації проводять гострою парою в інокуляторі впродовж 40 хв при температурі 131 °С. Гліцерин не потребує стерилізації тому його вносять окремо. Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 60 л наведено в табл. 5.4.

#### *Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 600 л*

На стадію вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 600 л необхідно приготувати 303 л поживного середовища, поділ компонентів на композиції та особливості приготування даних композицій відбуватиметься як і на попередній стадії.

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 60 л**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 31,66 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	24	759,84	А	7
Триптон	20	633,2		
Вода		7 (л)		
Конденсат		0,7 (л)		0,7
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	2,3	72,82	Б	21,67
К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	12,5	395,75		
Вода		21,67 (л)		
Конденсат		2,17 (л)		2,17
Гліцерин	4 мл	126,6 (мл)	В	0,12
Разом				31,66

*Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 600 л*

На стадію вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 600 л необхідно приготувати 303 л поживного середовища, поділ компонентів на композиції та особливості приготування даних композицій відбуватиметься як і на попередній стадії.

*Композиція А:* Триптон та дріжджовий екстракт (112 °С, 0,05 МПа, 20 хв);

*Композиція Б:* Монофосфат калію та гідроортофосфат калію (131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

*Композиція В:* Гліцерин.

Дріжджовий екстракт та триптон є термолабільними речовинами тому їх об'єднують в одну композицію, приготування та стерилізацію проводять в реакторі об'ємом 100 л, стерилізацію проводять гострою парою впродовж 20 хв при температурі 112 °С. Солі поміщають в реактор об'ємом 40 л вносять частину воду та розчиняють після розчинення солей розчин подають в посівний апарат та вносять іншу частину води, стерилізації проводять

гострою парою в посівному апараті впродовж 40 хв при температурі 131 °С. Гліцерин не потребує стерилізації тому його вносять окремо. Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 600 л наведено в табл. 5.5.

Таблиця 5.5

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 600 л**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 303 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	24	7 272	А	70
Триптон	20	6 060		
Вода		70		
Конденсат		7		7
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	2,3	696,9	Б	204,4
К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	12,5	3 787,5		
Вода		204,4		
Конденсат		20,4		20,4
Гліцерин	4 мл	1,212 (л)	В	1,2
Разом				303

*Виробничий синтез в ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>*

На стадію виробничого синтезу атаксантину в ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> необхідно приготувати 3,22 м<sup>3</sup> поживного середовища, через великий об'єм поживного середовища стерилізація відбуватиметься в реакторах гострою парою, поділ компонентів на композиції відбувається з врахуванням відношення компонентів до температури.

*Композиція А:* Дріжджовий екстракт (112 °С, 0,05 МПа, 20 хв);

*Композиція Б:* Гідрофосфат амонію, монофосфат калію, лимонна кислота, сульфат магнію, сульфат заліза, сульфат цинку, сульфат міді, сульфат мангану, тетраборат натрію, хлорид кальцію та гептамолібдат амонію (131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

Композиція В: Гліцерин.

Дріжджовий екстракт є термолабільною речовиною тому його приготування та стерилізацію проводять в реакторі об'ємом 500 л, стерилізацію проводять гострою парою впродовж 20 хв при температурі 112 °С. Солі поміщають в реактор об'ємом 500 л вносять частину воду та розчиняють після розчинення солей розчин подають в ферментер та вносять іншу частину води, стерилізації проводять гострою парою в ферментері впродовж 40 хв при температурі 131 °С.

Таблиця 5.6

**Поділ компонентів на композицій для стерилізації поживного середовища на стадію виробничого біосинтезу астаксантину в ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,22 м <sup>3</sup> середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	5	16 100	А	422
Вода		422 (л)		
Конденсат		42,2 (л)		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	26,5	85 330	Б	2 436
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,75	21 735		
Лимонна кислота	0,85	2 737		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,7	2 254		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,075	241,5		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0168	54,34		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0075	24,15		
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,00375	12,08		
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	0,001725	5,55		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,015	48,3		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,00075	2,42		
Вода		2 436 (л)		
Конденсат		244		
Гліцерин	30	96,6 (кг) 76,65 (л)	В	75,65
Разом				3 220

Компоненти розчину металів готують та стерилізують разом з композицією солей. Гліцерин не потребує стерилізації тому його вносять окремо. Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування поживного середовища на стадію виробничого синтезу атаксантину в ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> наведено в табл. 5.6.

### 5.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Під час приготування композиції солей на стадію виробничого біосинтезу атаксантину, композиція солей містить сульфат магнію та фосфатні солі, які при нагріванні можуть утворити небажаний осад ортофосфату магнію. Щоб уникнути випадіння осаду перед нагріванням рівень рН розчину солей необхідно зменшити до 4,0-4,5, для цього вносять 6 % розчин хлоридної кислоти. Після стерилізації розчину його охолоджують та змішують з іншими стерильними композиціями для отримання поживного середовища, на якому має рости біологічний агент, оптимальним значенням рівня рН для *Escherichia coli* WLGB-RPP (*pAX15,pTrc-ispDF*) є рН 7,0, тому доцільно після стерилізації розчину солей збільшити рівень рН з 4,0-4,5 до 7,0, з цією метою в стерильний розчин вносять 6 % розчин гідроксиду натрію. Розрахунок необхідної кількості титрувальних агентів наведено в табл. 5.7.

Таблиця 5.7

#### Розрахунок титрувальних агентів

Об'єм середовища, м <sup>3</sup>	Гідроксид натрію (6%)		Хлоридна кислота (6%)	
	Об'єм, л	Реактор, л	Об'єм, л	Реактор, л
3,22	6,44	10 л	6,44	10 л

## РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевою сіткою, для вилучення механічних частинок-забруднювачів
Ф-2	Фільтр грубого очищення	1	Фільтр кишеньковий класу очищення G3 («Техно-Партс», Україна) з рамкою, виготовленою з нержавіючої сталі AISI 304. Початковий перепад тиску становить 40 Па, кінцевий – 250 Па [13].
К-3	Компресор	1	Компресор поршневий Scherppach HC 100DC («Scherppach», Німеччина). Продуктивність до 412 л/хв, робочий тиск – 8 бар, споживана потужність – 2,2 кВт [14].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник кожухотрубний ОРЕКС-3-ST («ОПЕКС Енергосистеми», Україна). Виготовлений з нержавіючої сталі. Номінальний тиск – від 6 до 40 бар, робочі температури – від -60 до 400 °С [15]
Рс-5	Ресивер	1	Ресивер місткістю 100 л, постачається в комплекті з компресором [14]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Калорифер паровий з нержавіючої сталі, виконаний на замовлення фірмою «ОПЕКС Енергосистеми» (Україна). Тиск робочого середовища – від 10 до 25 бар, максимальна робоча температура 400 °С [16].
Ф-7	Фільтр тонкого очищення	1	Фільтр кишеньковий класу очищення G4-F9 («Техно-Партс», Україна) з каркасом, виготовленим з оцинкованого металу. Початковий перепад тиску становить 40 Па, кінцевий – 250 Па [17].
ІФ-8 ІФ-12 ІФ-17 ІФ-30	Індивідуальний фільтр	3	Фільтр НЕРА класу очищення H14 («Техно-Партс», Україна). Фільтрувальний матеріал – мікротонкі скляні волокна, упаковані мінігофрамаи та розділені термопластичними сепараторами [18].

НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ

Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<b>Розділ 6. Специфікація обладнання</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Пономарьова В.						47	77
Перевір.	Ключка Л.В					<b>Кафедра БТМ</b>		
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Закінчення табл. 6.1

Ін-9	Інокулятор	1	Ферментер BLBIO-5SJ, об'ємом 5 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою, мішалкою, датчиком рН, температури та розчиненого кисню, габаритні розміри 890×660×1600 мм [19].
P-10 P-19 P-20	Реактор	3	Реактор XHSG-10L об'ємом 10 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою та мішалкою [20].
P-11	Реактор	1	Реактор SS-5L об'ємом 5 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою та мішалкою, габаритні розміри 600*550*1800 мм [21].
ПА-13	Посівний апарат	1	Ферментер BioPilot 60 L, об'ємом 60 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою, мішалкою, датчиком рН, температури та розчиненого кисню [22].
P-14	Реактор	2	Реактор T-40L об'ємом 40 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою та мішалкою [23].
P-15	Реактор	1	Реактор Ai ETL C1D1 об'ємом 100 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою та мішалкою, габаритні розміри 762x740x 1830 мм [24].
H-16	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний MP-8118.12, продуктивністю 352 л/год [25].
ПА-18	Посівний апарат	1	Ферментер об'ємом 600 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою, мішалкою, датчиком рН, температури та розчиненого кисню [26].
ДЗ-21 ДЗ-24	Дозатор	2	Дозатор сипучих матеріалів ДВ-06, максимальна межа дозування 50 кг, дискретність: 0,005 г [27].
P-22 P-25	Реактор	2	Реактор об'ємом 500 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою та мішалкою [28].
H-23 H-29	Насос перистальтичний	2	Насос перистальтичний HELIOS AS 25 FX-672, продуктивністю 672 л/год [29].
H-26 H-32	Насос відцентровий	2	Відцентровий насос WETRON JETS80, продуктивністю 3,6 м <sup>3</sup> /год [30].
ДЗ-27	Об'ємно ваговий дозатор	1	Бункерний дозатор рідин [31].
P-28	Реактор	1	Реактор об'ємом 800 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою та мішалкою [32].
Фр-31	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 6,3 м <sup>3</sup> , виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою, мішалкою, датчиком рН, температури та розчиненого кисню, габаритні розміри 2630*2630*5880 [33].

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічний процес синтезу астаксантину культивуванням *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) складається з допоміжних робіт (приготування титрувальних агентів для регулювання рівня рН поживного середовища, приготування розчину металів, зберігання гліцерину, приготування та стерилізація поживного середовища) та технологічного процесу (отримання посівного матеріалу *Escherichia coli* та виробничий синтез астаксантину). Схема технологічного процесу наведена в графічній частині роботи.

### ***ДР 1. Приготування титрувальних агентів для регулювання рівня рН поживного середовища***

#### ***ДР 1.1. Приготування розчину 6%-ї хлоридної кислоти для підкислення поживного середовища***

Для підкислення поживного середовища під час технологічного процесу необхідно приготувати 6,2 л 6 % хлоридної кислоти, для цього реактор-змішувач об'ємом 10 л заповнюють 5,2 л питної води та при постійному перемішуванні вносять 1 л 36%-ї хлоридної кислоти, яка попередньо відміряна мірним циліндром.

#### ***ДР 1.2. Приготування і стерилізація розчину 6-% натрію гідроксиду для підлуження поживного середовища***

Для підлуження поживного середовища на виробничий біосинтез необхідно приготувати 6,2 л розчину 6%-го натрію гідроксиду. На технічних вагах формують наважку кристалічного натрію гідроксиду, масою 372 г.

НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ

Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пономарьова В.			<b>Розділ 7. Опис технологічної схеми</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Ключка Л.В					50	77
Консультант						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Отриману наважку поміщають в реактор-змішувач об'ємом 10 л та вносять 6,8 л води питної, вмикають перемішувач (100 об/хв), після повного розчинення в даному реакторі проводять стерилізацію впродовж 40 хв, при 131°C (0,15 МПа).

## ***ДР 2. Приготування розчину металів***

### ***ДР 2.1. Приготування та стерилізація розчину металів***

Необхідно приготувати 23,76 л розчину металів, враховуючи об'єм розчину стерилізація буде відбуватись гострою парою, під час даного процесу утворюється конденсат в кількості 10 % від об'єму розчину, тому необхідно врахувати дану кількість конденсату та зменшити необхідну кількість води для приготування розчину. Необхідна кількість компонентів для приготування розчину наведена в табл. 7.1.

*Таблиця 7.1*

### **Кількість компонентів розчину металів для приготування необхідної кількості розчину на весь технологічний процес**

<b>Компоненти поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 23,76 л розчину, г</b>	<b>Композиції</b>	<b>Об'єм композиції, л</b>
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10	237,6	А	21,6
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,25	53,46		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1	23,76		
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,5	11,88		
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	0,23	5,46		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2	47,52		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,1	2,38		
Вода		21,6 (л)		
Конденсат		2,16 (л)		2,16
Разом				23,76

За допомогою технічних ваг формують наважки сульфату феруму масою 237,6 г, сульфату цинку – 53,46 г, сульфату купруму – 23,76 г, сульфату мангану – 11,88 г, тетраборату натрію – 5,46 г, хлориду кальцію – 47,52 г та гептамолібдату амонію – 2,38 г. Сформовані наважки поміщають в реактор-змішувач об'ємом 40 л та вносять 21,6 л води питної. Після завантаження компонентів розчину вмикають перемішувач до

повного розчинення компонентів. В подальшому в даний реактор подають гостру пару для стерилізації розчину. Стерилізація відбувається 40 хв при температурі 131 °С. Отримавши стерильний розчин мікроелементів його зберігають в даному реакторі до використання на наступних етапах.

### ***ДР 3. Зберігання гліцерину***

#### ***ДР 3.1. Зберігання гліцерину на технологічний процес***

На технологічний процес необхідно 1,512 л та 75,428 л гліцерину для приготування поживного середовища для отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 0,63 м<sup>3</sup> та ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>, відповідно, а також 612 л гліцерину внести дробно під час виробничого синтезу. Отже, для технологічного процесу в реактор об'ємом 1 м<sup>3</sup>, за допомогою об'ємного дозатора поміщають 689 л гліцерину, де відбувається його зберігання при кімнатній температурі та постійному перемішуванні (25 об/хв).

### ***ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища***

#### ***ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в колбах на качалці***

Під час отримання посівного матеріалу в колбах на качалці потрібно приготувати 378 мл поживного середовища. Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 7.2.

##### ***ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А***

На технічних вагах важать 9,07 г дріжджового екстракту та 7,56 г триптону, зважені компоненти поміщають в колбу об'ємом 0,1 л та вносять попередньо відміряної за допомогою мірного циліндра питної води в кількості 50 мл. Вміст колби перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевим корком і розміщують в автоклаві, де протягом 20 хв проводять стерилізацію при 112 °С (0,05 МПа).

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 378 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, мл
Дріжджовий екстракт	24	9,07	А	50
Триптон	20	7,56		
Вода		50 (мл)		
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	2,3	0,87	Б	326,5
К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	12,5	4,73		
Вода		326,5 (мл)		
Гліцерин	4 мл	1,51 (мл)		1,5
Разом				378

***ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

На технічних вагах важать 0,87 г монофосфату калію та 4,73 г гідроортофосфату калію, сформовані наважки поміщають в колбу об'ємом 1 л та вносять попередньо відміряної за допомогою мірного циліндра питної води в кількості 326,5 мл. Вміст колби перемішують до повного розчинення солей, закривають ватно-марлевым корком і розміщують в автоклаві, де протягом 40 хв проводять стерилізацію при 131 °С (0,15 МПа).

***ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6 л***

Під час отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6 л потрібно приготувати 3,78 л поживного середовища. Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 7.3.

***ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А***

На технічних вагах важать 90,72 г дріжджового екстракту та 75,6 г триптону, зважені компоненти поміщають в колбу об'ємом 2 л та вносять попередньо відміряної за допомогою мірного циліндра питної води в кількості 770 мл. Вміст колби перемішують до повного розчинення,

закривають ватно-марлевым корком і розміщують в автоклаві, де протягом 20 хв проводять стерилізацію при 112 °С (0,05 МПа).

Таблиця 7.3

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6 л**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,78 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	24	90,72	А	0,77
Триптон	20	75,6		
Вода		0,77 (л)		
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	2,3	8,69	Б	3,0
К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	12,5	47,25		
Вода		3 (л)		
Гліцерин	4 мл	15,12 (мл)		0,015
Разом				3,78

***ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

На технічних вагах важать 8,69 г монофосфату калію та 47,25 г гідроортофосфату калію, сформовані наважки поміщають в колбу об'ємом 5 л та вносять попередньо відміряної за допомогою мірного циліндра питної води в кількості 3 л. Вміст колби перемішують до повного розчинення солей, закривають ватно-марлевым корком і розміщують в автоклаві, де протягом 40 хв проводять стерилізацію при 131 °С (0,15 МПа).

***ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 63 л***

Під час отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 63 л потрібно приготувати 37,8 л поживного середовища, так як стерилізація буде відбуватись гострою парою необхідно зменшити кількість внесеної води через утворення конденсату (10%). Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 7.4.

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 63 л**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 37,8 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	24	907,2	А	7
Триптон	20	756		
Вода		7 (л)		
Конденсат		0,7 (л)		0,7
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	2,3	86,9	Б	27,2
К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	12,5	472,5		
Вода		27,2 (л)		
Конденсат		2,7 (л)		2,7
Гліцерин	4 мл	151,2 (мл)		0,15
Разом				37,8

***ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А***

На технічних вагах важать 907,2 г дріжджового екстракту та 756 г триптону, зважені компоненти поміщають в реактор-змішувач об'ємом 10 л та через лічильник подають 7 л води питної. Помістивши компоненти в реактор вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) до повного розчинення компонентів, та в подальшому в реактор подають гостру пару для стерилізації композиції. Стерилізація відбувається впродовж 20 хв при 112 °С (0,05 МПа).

***ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

На технічних вагах важать 86,9 г монофосфату калію та 472,5 г гідроортофосфату калію, сформовані наважки поміщають в колбу об'ємом 5 л та вносять попередньо відміряної за допомогою мірного циліндра питної води в кількості 3,2 л. Вміст колби перемішують до повного розчинення солей, після розчинення розчин солей поміщають в інокулятор об'ємом 63 л та доливають 24 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій, для

рівномірного розподілу компонентів та проводять стерилізацію гострою парою при 131 °С (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

***ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 630 л***

Для отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 630 л потрібно приготувати 378 л поживного середовища, так як стерилізація буде відбуватись гострою парою необхідно зменшити кількість внесеної води через утворення конденсату (10%). Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 7.5.

*Таблиця 7.5*

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 630 л**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 378 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	24	9 072	А	50
Триптон	20	7 560		
Вода		50		
Конденсат		5		5
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	2,3	869	Б	292,5
К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	12,5	4 725		
Вода				
Конденсат				29
Гліцерин	4 мл	1,512 (л)		1,5
Разом				378

***ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А***

За допомогою об'ємно-вагового дозатора в реактор-змішувач об'ємом 60 л поміщають 9,07 кг дріжджового екстракту та 7,56 кг триптону, та подають воду питну, подача води відбувається поки на лічильнику не покаже 50 л. Помістивши компоненти в реактор вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) до повного розчинення компонентів, та в подальшому в реактор

подають гостру пару для стерилізації композиції. Стерилізація відбувається впродовж 20 хв при 112 °С (0,05 МПа).

#### ***ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

На технічних вагах важать 869 г монофосфату калію та 4 725 г гідроортофосфату калію, сформовані наважки поміщають в реактор-змішувач об'ємом 25 л та вносять за допомогою об'ємно-вагового дозатора 17,5 л води питної. Помістивши компоненти в реактор вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) до повного розчинення компонентів, після розчинення розчин подають в посівний апарат об'ємом 630 л та через лічильник подають 275 л води питної. Вмикають перемішуючий пристрій, для рівномірного розподілу компонентів та проводять стерилізацію гострою парою при 131 °С (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

#### ***ДР 4.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу астаксантину в ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>***

Для виробничого біосинтезу астаксантину необхідно приготувати 3,168 м<sup>3</sup> поживного середовища, так як стерилізація буде відбуватись гострою парою необхідно зменшити кількість внесеної води через утворення конденсату (10%). Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 7.6.

##### ***ДР 4.5.1. Приготування та стерилізація композиції А***

За допомогою об'ємно-вагового дозатора в реактор-змішувач об'ємом 100 л поміщають 15,84 кг дріжджового екстракту та через лічильник подають 70 л води питної. Помістивши компоненти в реактор вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) до повного розчинення компонентів, та в подальшому в реактор подають гостру пару для стерилізації композиції. Стерилізація відбувається впродовж 20 хв при 112 °С (0,05 МПа).

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію виробничого біосинтезу астаксантину в ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,168 м <sup>3</sup> середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	5	15,84	А	70
Вода		70		
Конденсат		7		7
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	26,5	83,95	Б	2720
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,75	21,38		
Лимонна кислота	0,85	2,69		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,7	2,22		
Вода		2 720		
Конденсат		272		272
Розчин металів	7,5 мл	23,76 (л)	В	23,76
Гліцерин	30	95,04 (кг) 75,43 (л)	Г	75,43
Разом				3,168

***ДР 4.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

За допомогою об'ємно-вагового дозатора в реактор-змішувач об'ємом 1 м<sup>3</sup> поміщають 83,25 кг гідрофосфату амонію, 21,38 кг гідроортофосфату калію, 2,69 кг лимонної кислоти, 2,22 кг сульфату магнію та через лічильник подають 720 л води питної. Після завантаження компонентів вмикають перемішувач (100 об/хв) до повного розчинення компонентів. Після перемішування розчин подають в ферментер об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> та через лічильник подають 2 м<sup>3</sup> води питної. Після внесення компонентів в ферментер (від ДР 1.1) подають 6 % розчин хлоридної кислоти для досягнення рівня рН 4,0 та в подальшому проводять стерилізацію гострою парою при температурі 131 °С (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

## ***ТП 5. Отримання посівного матеріалу *Escherichia coli****

### ***ТП 5.1. Підтримання колекційної культури***

Колекційну культуру *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) зберігають на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА) при температурі 5 °С. Через кожні 3 місяці проводять пересіви культури в строго асептичних умовах.

### ***ТП 5.2. Отримання робочої культури***

Для отримання ізольованих колоній в строго асептичних умовах, бактеріологічною петлею культуру *E. coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) розсівають методом виснажувального штриха на чашки Петрі з агаризованим середовищем (МПА). Чашки Петрі ставлять в термостат, інкубують протягом 12 год при 30 °С.

### ***ТП 5.3. Отримання посівного матеріалу на агаризованих поживних середовищах***

Ізольовані колонії, (від ТП 5.2), в асептичних умовах, пересівають бактеріологічною петлею у пробірки з МПА (для засіву однієї пробірки використовують одну ізольовану колонію). Для пересіву відбирають колонії які знаходяться на відстані не менше 1 см. Інкубують в термостаті при 30 °С протягом 12 год.

### ***ТП 5.4. Отримання посівного матеріалу в колбах на качалці***

В асептичних умовах до колби з стерильною композицією Б вносять стерильну композицію А (від ДР 4.1.1) та гліцерин відміряний мірним стаканом, вміст колби перемішують для рівномірного розподілу компонентів та розливають по 126 мл в три стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл. В асептичних умовах до пробірки з робочою культурою *E. coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) додають 5 мл фізіологічного розчину для суспендування клітин. Одержану суспензію за допомогою піпетки вносять у колбу з отриманим стерильним поживним середовищем, для однієї колби використовують суспензію отриману з однієї пробірки.

Посівний матеріал вирощують в колбах на качалці (220 об/хв) протягом 12 год при 30 °С. По завершенню культивування відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ( $C_{\text{біомаси}} = 10$  г/л). Отриманий посівний матеріал з 3 колб в асептичних умовах об'єднують в одній стерильній засівній колбі об'ємом 1 л.

#### ***ТП 5.5. Отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6 л***

В асептичних умовах в інокулятор об'ємом 6 л вносять стерильну композицію А (від ДР 4.2.1), Б (від ДР 4.2.2) та гліцерин, помістивши компоненти поживного середовища вмикають перемішуючий пристрій для рівномірного розподілу компонентів. Після перемішування вносять посівний матеріал (від ТП 5.4).

Посівний матеріал вирощують в інокуляторі протягом 12 год при 30 °С, з постійним перемішуванням (220 об/хв) та з швидкістю подачі стерильного аераційного повітря 2 л/(л·хв). Впродовж культивування кожні 4 год, а також по завершенню культивування відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ( $C_{\text{біомаси}} = 10$  г/л).

#### ***ТП 5.6. Отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 63 л***

До інокулятора об'ємом 63 л з стерильною композицією Б вносять стерильну композицію А (від ДР 4.3.1) і гліцерин та вмикають перемішуючий пристрій для рівномірного розподілу компонентів. Після перемішування вносять посівний матеріал (від ТП 5.5).

Посівний матеріал вирощують в посівному апараті протягом 12 год при 30 °С, з постійним перемішуванням (220 об/хв) та з швидкістю подачі стерильного аераційного повітря 2 л/(л·хв). Впродовж культивування кожні 4 год, а також по завершенню культивування відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ( $C_{\text{біомаси}} = 10$  г/л).

#### ***ТП 5.7. Отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 630 л***

До посівного апарату об'ємом 630 л з стерильною композицією Б вносять стерильну композицію А (від ДР 4.4.1) і гліцерин (від ДР 3.1) та вмикають перемішувач для рівномірного розподілу компонентів. Після перемішування вносять посівний матеріал (від ТП 5.6).

Посівний матеріал вирощують в посівному апараті протягом 12 год при 30 °С, з постійним перемішуванням (220 об/хв) та з швидкістю подачі стерильного аераційного повітря 2 л/(л·хв). Впродовж культивування кожні 4 год, а також по завершенню культивування відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ( $C_{\text{біомаси}} = 10$  г/л).

### **ТП 6. Виробничий синтез астаксантину**

#### **ТП 6.1. Виробничий біосинтез астаксантину в ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>**

В ферментер об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> з стерильною композицією Б за допомогою перистальтичними насосами вносять стерильну композицію А (від ДР 4.5.1), розчин металів (від ДР 2.1), гліцерин (від ДР 3.1) та 6 % розчин гідроксиду натрію (від ДР 1.2). Після внесення компонентів вмикають перемішувач (100 об/хв) та після перемішування за допомогою труби перетискування вносять посівний матеріал (від ТП 5.7).

Виробничий синтез відбувається в аеробних умовах тому після внесення поживного середовища та посівного матеріалу, в ферментер подають стерильне аераційне повітря з швидкістю подачі 2 л/(л·хв).

Під час виробничого синтезу починаючи з 5 год кожні 4 год дробно вносять гліцерин (від ДР 3.1).

Вирощування *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) відбувається до досягнення кінцевої концентрації біомаси (60 г/л) та концентрації астаксантину (432,82 мг/л), впродовж 45 год при температурі 30 °С з постійним перемішуванням (500 об/хв).

Впродовж виробничого синтезу кожні 8 год, а також по завершенню культивування, відбирають проби культуральної рідини для визначення

концентрації джерел вуглецю та азоту, астаксантину та біомаси для проведення мікробіологічного контролю.

## РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### 8.1. Карта постадійного контролю

Номер контролю ної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
Кх 1.1. Приготування 6% розчину NaOH	Концентрація NaOH,	Хімічний метод, технічний	Концентрацію визначають після приготування розчину.	C=6%
Кт, Км, Кх 1.2 Приготування та стерилізація 6% розчину HCl	Концентрація HCl, температура, час, тиск, стерильність	Хімічний метод, технічний, термометр, таймер, манометр, мікробіологічний контроль	Концентрацію визначають після приготування розчину.	C=6%, t=131°C, T – 40 хв. P – 0,15 Мпа, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт 1.3 Зберігання гліцерину	Температура, швидкість	Термометр, тахометр		t = 25 °C, w = 25 об/хв

### НУХТ БТЕК 04.03 КР ПЗ

Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пономарьова В.			<b>Розділ 8. Контроль виробництва</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Ключка Л.В					62	77
Консультант						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Продовження таблиці 8.1

<p>Кт, Км 4.1.1., 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А</p>	<p>Композиція А, температура, час, стерильність, тиск</p>	<p>Термометр, манометр, таймер, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тиск та температура визначається безперервним методом під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю</p>	<p><math>t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>t = 20\text{ хв}</math>, <math>P = 0,05\text{ МПа}</math>, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.1.2., 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б</p>	<p>Композиція Б, температура, час, стерильність, тиск</p>	<p>Термометр, манометр, таймер, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тиск та температура визначається безперервним методом під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю</p>	<p><math>t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>t = 40\text{ хв}</math>, <math>P = 0,15\text{ МПа}</math>, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.3.1., 4.4.1., 4.5.1. Приготування та стерилізація композиції А</p>	<p>Композиція А, температура, час, стерильність, тиск, швидкість</p>	<p>Термометр, манометр, таймер, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тиск та температура визначається безперервним методом під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю</p>	<p><math>w = 100\text{ об/хв}</math>, <math>t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>t = 20\text{ хв}</math>, <math>P = 0,05\text{ МПа}</math>, відсутність мікробіоти</p>

Продовження таблиці 8.1

<p>Кт, Км 4.3.2., 4.4.2., 4.5.2</p> <p>Приготування та стерилізація композиції Б</p>	<p>Композиція Б, температура, час, стерильність, тиск, швидкість</p>	<p>Термометр, манометр, таймер, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тиск та температура визначається безперервним методом під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю</p>	<p><math>w = 100</math> об/хв, <math>t = 131</math> <math>^{\circ}\text{C}</math>, <math>t = 40</math> хв, <math>P = 0,15</math> МПа, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.1</p> <p>Підтримка колекційної культури</p>	<p>Колекційна культура, мікробіологічна чистота, температура</p>	<p>Холодильник</p>	<p>Мікробіологічний контроль</p>	<p><math>t = 5^{\circ}\text{C}</math>, <math>T -</math> Зміс., відсутня стороння мікробіота</p>
<p>Кт, Км 5.2</p> <p>Отримання робочої культури</p>	<p>Пересіяна культура, чашки Петрі з м'ясопептонним агаром, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термостат, мікроскоп, мікробіологічний контроль</p>	<p>Мікробіологічний контроль після вирощування культури</p>	<p><math>t = 30^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 12</math> год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

Кт, Км 5.3 Отримання посівного матеріалу на агаризованих поживних середовищах	Пересіяна культура, пробірки Петрі зі скошеним м'ясопептонним агаром, тривалість її вирощування, $t$ , мікробіологічна чистота культури	Мікроскоп, термостат, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після виробничого культивування	$t=30^{\circ}\text{C}$ , $\tau=12$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці	Посівний матеріал, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури температура, швидкість перемішування	Технічний термометр, мікробіологічний контроль таймер, тахометр	Після вирощування інокуляту у колбах на качалці	$t=30^{\circ}\text{C}$ , $\tau=12$ год, $\omega=220$ об/хв, відсутня стороння мікробіота
Кт, Км 5.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 6 л	Мікробіологічна чистота культури посівний матеріал, тривалість культивування,	Термометр технічний, таймер, тахометр, мікробіологічний контроль, датчик	Під час вирощування інокуляту і у кінці процесу культивування	$t=30^{\circ}\text{C}$ , $\tau=12$ год, $\omega=220$ об/хв, $v - 2$ л/л*хв., відсутня стороння мікробіота

	температура, аерація, швидкість перемішування	розчиненого кисню		
Кт, Км 5.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 63 л	Температура, посівний матеріал, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, аерація, швидкість перемішування	Термометр технічний, таймер, тахометр, мікробіологічний контроль, датчик розчиненого кисню	Під час вирощування інокуляту і у кінці процесу культивування	$t=30^{\circ}\text{C}$ , $\tau=12$ год, $\omega=220$ об/хв, $v - 2$ л/л*хв., відсутня стороння мікробіота
Кт, Кх, Км 5.7 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 630 л	Температура, посівний матеріал, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, аерація, швидкість перемішування	Термометр технічний, таймер, тахометр, мікробіологічний контроль, датчик розчиненого кисню	Під час вирощування інокуляту і у кінці процесу культивування	$t=30^{\circ}\text{C}$ , $\tau=12$ год, $\omega=220$ об/хв, $v - 2$ л/л*хв., відсутня стороння мікробіота

Кт, Кх, Км 6.1 Виробничий синтез у ферментері	Тривалість культивування, температура, рН, мікробіологічна чистота, аерація, швидкість перемішування	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль, рН-датчик, датчик розчиненого кисню	Мікробіологічний контроль проводиться кожні 8 год	t=30°C, τ=45 год, ω=500 об/хв, рН – 7.0, ν – 2 л/л*хв., С (астаксантин) – 432,82 мг/л, С (біомаси) – 60 г/л., відсутня стороння мікробіота
---	--	---	---	--

63

## 8.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль включає контроль стерильності поживних середовищ і контроль чистоти культури біологічного агента. Контроль стерильності поживних середовищ здійснюють методом поверхневого висівання на агаризовані середовища в чашках Петрі. Для визначення бактерій використовують м'ясо-пептонний агар (МПА), для визначення дріжджів і грибів – сусло-агар (СА). Аналізований зразок об'ємом 1 мл відбирають стерильною піпеткою, переносять на поверхню поживного середовища в чашці Петрі та рівномірно розподіляють по поверхні агаризованого середовища за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або стерильного шпателя Дригальського. Далі чашки загортають у папір, поміщають у термостат, де їх витримують за температури від 32 до 34 °С протягом 1-2 діб (у випадку МПА) та за 24-26 °С протягом 3-5 діб (у випадку СА). Аналіз посівів здійснюють візуально, починаючи з 24 години. [27]. На м'ясо-пептонному агарі *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF)

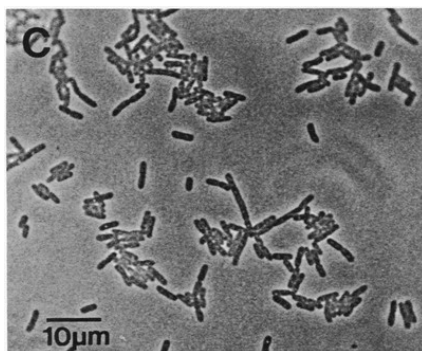
утворює круглі опуклі гладенькі напівпрозорі колонії діаметром від 1 до 3 мм сірувато-білого кольору (рис. 5.1). Іноді можуть утворюватися слизуваті колонії [28].



**Рис. 5.1. Зовнішній вигляд колоній *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) на м'ясо-пептонному агарі**

Мікробіологічний контроль чистоти культури біологічного агента здійснюється висіванням на агаризовані середовища (для визначення культуральних ознак продуцента, а також для виявлення можливої контамінації сторонніми мікроорганізмами) та мікроскопіюванням (для визначення морфології клітин). Пробу культуральної рідини об'ємом 1 мл висівають мікробіологічною петлею на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром для виявлення бактерій, а також із сусло-агаром – для виявлення дріжджів і грибів. Мікроскопіювання здійснюють за допомогою світлового мікроскопа з імерсією, використовуючи препарат «роздавлена крапля». Для його приготування на чисте знежирене предметне скло в асептичних умовах за допомогою стерильної мікробіологічної петлі наносять краплину культуральної рідини, яку розподіляють по склу таким чином, щоб діаметр мазка становив близько 1 см. Отриманий мазок висушують без нагрівання за кімнатної температури, після чого на сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1-2 краплини імерсійної олії (гліцерину) та здійснюють мікроскопіювання, використовуючи об'єктив зі збільшенням 90x (імерсійний об'єктив). По закінченню роботи з імерсійного об'єктива прибирають залишки гліцерину шматочком вати, змоченим етиловим спиртом [27]. Клітини *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) – паличкоподібні з

заокругленими кінцями, розміром 1,1-1,5\*2,0-6,0 мкм, розташовані поодиноці або парами (рис. 4.2), можуть бути рухливими (з перитрихіально розміщеними джгутиками) або нерухливими [29].



*Рис. 5.2. Зовнішній вигляд клітин Escherichia coli WLGB-RPP (рAX15, рTrec-ispDF) під мікроскопом*

### **8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту**

#### **8.3.1. Концентрація біомаси**

Контроль концентрації біомаси здійснюється колориметрично. У пробірку послідовно вносять 9 мл води очищеної та 1 мл проби культуральної рідини. Утворену суміш збовтують, після чого здійснюють вимірювання її оптичної густини на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 540 нм. Вимірне значення перераховують на абсолютно суху біомасу за допомогою калібрувального графіка [30].

#### **8.3.2. Контроль концентрації астаксантину**

Контроль концентрації астаксантину здійснюється методом високоефективної рідинної хроматографії ацетонового екстракту астаксантину. Оскільки астаксантин є внутрішньоклітинним продуктом, то перед аналізом необхідно здійснити руйнування клітин продуцента. Пробу культуральної рідини об'ємом 5 мл центрифугують за швидкості 10000g протягом 10 хв для відділення біомаси. Далі супернатант декантують, а біомасу ресуспендують в 1 мл ацетону. Отриману суспензію піддають впливу ультразвуку протягом 30 хв за температури менше 4 °C за допомогою приладу SD200H. Залишки клітин вилучають центрифугуванням за 15000g протягом 10 хв. Отриманий супернатант аналізують на рідинному

хроматографі з колонкою YMC Carotenoid C<sub>30</sub> та діодним детектором за довжини хвилі світла 450 нм і температури 25 °С. Рухома фаза складається з буфера А – суміш 90 %-го метанолу та дистильованої води (1:2), і буфера Б – трет-бутилметилетер. Подача рухомої фази відбувається зі швидкістю 0,6 мл/хв. Аналізований зразок інжектують у колонку в кількості 10 мкл [10].

### **8.3.3. Контроль концентрації джерела вуглецю**

Контроль концентрації джерела вуглецю (гліцерину) здійснюється в ацетоновому екстракті, отриманому під час аналізу вмісту астаксантину, методом високоефективної рідинної хроматографії. Використовують колонку MetaCarb 87H, температуру в якій підтримують на рівні 25 °С, і рефрактометричний детектор Waters 2414. Рухомою фазою є 0,01 н. розчин сірчаної кислоти, який подають зі швидкістю 0,5 мл/хв. Аналізований зразок інжектують у колонку в кількості 10 мкл [10].

### **8.3.4. Контроль концентрації джерела азоту**

У поживному середовищі присутні кілька джерел азоту – дріжджовий екстракт (амінокислоти) і гідроортофосфат амонію (амонійний азот). Оскільки концентрація дріжджового екстракту є невеликою (5 г/л), цей компонент поживного середовища буде використовуватися продуцентом передусім як джерело амінокислот та інших факторів росту. Саме тому під час біосинтезу буде контролюватися лише концентрація амонійного азоту, колориметричним методом [31]. Спершу пробу культуральної рідини об'ємом 40 мл центрифугують за 10000g протягом 10 хв для відділення клітин. Отриманий супернатант переносять у конічну колбу об'ємом 50 мл, після чого додають 1 М розчин натрію гідроксиду для доведення рН до рівня 9,5. Підлужений розчин переносять у колбу К'ельдаля об'ємом 100 мл і додають 2,5 мл боратного буфера. Здійснюють перегонку отриманого розчину в конічну колбу об'ємом 50 мл, що містить 5 мл 2 %-го розчину борної кислоти. До отриманого дистиляту додають розчини феноляту натрію (0,1 %), гіпохлориту натрію (вміст хлору 3 %) та натрію нітропрусиду (0,05 %) при перемішуванні для отримання зеленувато-синього забарвлення (у

результаті утворення індофенолу). Отриманий розчин аналізують на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 660 нм, після чого визначають концентрацію іонів амонію за калібрувальним графіком (у мг/л) [32].

## РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

### 9.1 Аналіз технологічної схеми проєктованого біотехнологічного виробництва.

Згідно схеми біотехнологічного виробництва маємо місце емісії відходів:

- Рідких – промивна вода та залишки миючих засобів після миття обладнання, випарена волога після вакуум-випарки, залишки рідкого продукту після фасування.
- Твердих – коробки, макулатура та інші паперові відходи
- Газоподібних – повітря після культивування

### 9.2 Способи знезараження води:

Ультрафільтрація – це метод мембранного розділення, який використовується для видалення з води вірусів, бактерій, інших дрібних мікроорганізмів, колоїдних частинок та макромолекул. Враховуючи специфічність нашого виробництва доцільно використовувати ультрафільтраційні модулі: GE Zenon Z-Series.[33].

Вода, яка буде очищатися, подається на мембрани модуля під тиском. Тиск може варіюватися залежно від типу води та рівня забруднення. Мембрани модуля GE Zenon Z-Series виготовлені з поліефірсульфону (ПЕС). ПЕС - це матеріал з високою механічною стійкістю, хімічною стійкістю та стійкістю до біологічного обростання. Вони широко використовуються в різних галузях промисловості, включаючи фармацевтичну, хімічну та харчову. Вони здатні очищати воду різної якості, включаючи стічні води, промислові води та питну воду.

					НУХТ БТЕК 04.03 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пономарьова В.			Розділ 9. Охорона довкілля	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Ключка Л.В					71	77
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Ультрафільтрація не потребує використання хімічних реагентів, що робить її екологічно чистим методом знезараження води.

### **9.3 Способи знезараження повітря:**

Забір атмосферного повітря здійснюють на висоті 18 м використовуючи вертикальну трубу з повітрязабірником (ПЗ-1).

Повітря подають на фільтр грубого очищення (Ф-2), для видалення крупних частинок бруду та пилу (розмір часток до 1 мкм). Ступінь очищення – 90 %.

Після грубого очищення подається в компресор (К-3), де відбувається стиснення повітря до тиску 0,4 МПа та збільшення температури повітря до 200°C. Перед подачею повітря в посівні апарати та виробничий ферментер його пропускають через індивідуальні фільтри (ІФ-8, ІФ-12, ІФ-17, ІФ-30) для досягнення ступеня очищення  $E=99,995\%$ .

#### Способи знезараження повітря:

Для нашого підприємства вигідніше всього використання адсорбентів, таких як активоване вугілля, для видалення з повітря газів та парів. Використання активованого вугілля для очищення викидів від виробничих процесів дозволить знизити рівень шкідливих речовин у повітрі, що відповідає екологічним нормам і стандартам.

Використання систем очищення повітря з активованим вугіллям у виробничих приміщеннях покращить якість повітря, що позитивно вплине на здоров'я працівників та підвищить їх продуктивність. Метод є екологічно чистим, оскільки він не утворює шкідливих відходів.

### **9.4 Способи знезараження твердих відходів:**

Для забезпечення ефективного знезараження та утилізації твердих відходів на виробництві атаксантину можна розробити інтегровану систему, що включає кілька етапів обробки з використанням біотехнологічних методів на основі культивування *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF).

Збір та сортування відходів -> 2. Подрібнення -> 3. Аеробне компостування з інокуляцією *E. coli* -> 4. Аеробне біологічне знезараження у біореакторах -> 5. Анаеробне біологічне знезараження для виробництва біогазу -> 6.

Біофільтрація для додаткового очищення -> 7. Ферментативне знезараження для специфічних забруднювачів

Переваги системи

Ефективність: Інтегрований підхід забезпечує всебічне знезараження та утилізацію відходів.

Економічність: Зниження витрат на утилізацію відходів та можливість використання отриманих продуктів, таких як біогаз.

Екологічність: Зменшення шкідливого впливу на довкілля за рахунок біологічної обробки та зниження кількості відходів.

Ця система забезпечує безпечне та ефективне управління відходами на підприємстві з виробництва атаксантину, сприяючи зменшенню екологічного навантаження та оптимізації виробничих процесів.

### Список використаної літератури:

1. Fakhri S., Abbaszadeh F. Astaxanthin: A Mechanistic Review on its Biological Activities and Health benefits. *Pharmacological Research*. 2018. doi:10.1016/j.phrs.2018.08.012
2. Astaxanthin Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Oil, Softgel, Liquid), By Source (Natural, Synthetic), By Application (Aquaculture & Animal Feed, Nutraceuticals), By Region, And Segment Forecasts, 2021 – 2028. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.researchandmarkets.com/reports/5450246/astaxanthin-market-size-share-and-trends>
3. Li J., Zhu D., Niu J. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*. 2011, 29(6): 568–574. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.04.001
4. Astaxanthin [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281224>.
5. Ambati R., Phang S.-M., Ravi S., Aswathanarayana R. (2014). Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Marine Drugs*, 12(1), 128–152. doi: 10.3390/md12010128.
6. Basoni M., Ouyang L., Wang D., Yu J., Zhou L. et al. (2022). Optimization of microbial cell factories for astaxanthin production: Biosynthesis and regulations, engineering strategies and fermentation optimization strategies. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 7, 689–704. doi: 10.1016/j.synbio.2022.01.002.
7. Astaxanthin [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://en.wikipedia.org/wiki/Astaxanthin>.
8. Natural Astaxanthin 12mg [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.amazon.com/Ingredients-Astaxanthin-Supplements-Cardiovascular-Antioxidant/dp/B08MWZQ4S6>

9. Organic Astaxanthin PUR – Powder [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.dr-heilbronner.de/en/organic-astaxanthin-pur-powder/BIO202210021-20>
10. Astaxanthin 5% [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://dailychem.bocsci.com/product/astaxanthin-5-cas-472-61-9-62809.html?gclid=CjwKCAjwgqejBhBAEiwAuWHioB6JY7zi4sXtA3UwtuCQkPLHWr3APfQVTRFwkct8hLjcJMghXrVVHBoCOGgQAvD\\_BwE](https://dailychem.bocsci.com/product/astaxanthin-5-cas-472-61-9-62809.html?gclid=CjwKCAjwgqejBhBAEiwAuWHioB6JY7zi4sXtA3UwtuCQkPLHWr3APfQVTRFwkct8hLjcJMghXrVVHBoCOGgQAvD_BwE)
11. Park S. Y., Binkley R. M., Kim W. J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-level astaxanthin production with high productivity. *Metabolic Engineering*. 2018, 49: 105–115. doi:10.1016/j.ymben.2018.08.002
12. Jiang G., Yang Z., Wang Y. Enhanced astaxanthin production in yeast via combined mutagenesis and evolution. *Biochemical Engineering Journal*. 2020, 107519. doi:10.1016/j.bej.2020.107519
13. Chi S., He Y., Ren J. Overexpression of a bifunctional enzyme, *CrtS*, enhances astaxanthin synthesis through two pathways in *Phaffia rhodozyma*. *Microbial Cell Factories*. 2015, 14(1). doi:10.1186/s12934-015-0279-4
14. Thompson K. A., Summers R. S. Development and experimental validation of the composition and treatability of a new synthetic bathroom greywater (SynGrey). *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* 2017, 3(6): 1120–1131. doi:10.1039/c7ew00304h
15. Morphology and culture characteristics of *Escherichia coli* (*E. coli*) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://paramedicsworld.com/escherichia-coli/morphology-culture-characteristics-of-escherichia-coli/medical-paramedical-studynotes>.
16. *Escherichia coli* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.vetbact.org/index.php?Artid=68&vbsearchstring=escherichia%20coli>.
17. *Escherichia coli* K-12 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://bacdive.dsmz.de/strain/4414>.
18. Seabra, L. M. J., & Pedrosa, L. F. C. (2010). Astaxanthin: structural and

functional aspects. *Revista de Nutrição*, 23(6), 1041–1050. doi:10.1590/s1415-52732010000600010

19. Solymosi, K., Latruffe, N., Morant-Manceau, A., & Schoefs, B. (2015). Food colour additives of natural origin. *Colour Additives for Foods and Beverages*, 3–34. doi:10.1016/b978-1-78242-011-8.00001-5

20. Ambati, R., Phang, S.-M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. (2014). Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Marine Drugs*, 12(1), 128–152. doi:10.3390/md12010128

21. Brotosudarmo, T. H. P., Limantara, L., Setiyono, E., & Heriyanto. (2020). Structures of Astaxanthin and Their Consequences for Therapeutic Application. *International Journal of Food Science*, 2020, 1–16. doi:10.1155/2020/2156582

22. Добування водних біоресурсів [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2023/sg/dvb/dvb\\_22.xlsx](https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2023/sg/dvb/dvb_22.xlsx)

23. Креветкова ферма [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.epravda.com.ua/publications/2022/01/25/681413/>

24. Креветки [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://shotam.info/krevetky-zi-zhmerynky-iaak-pratsiuie-iedyna-ukrains-ka-krevetkova-ferma/>

25. Park S. Y., Binkley R. M., Kim W. J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-level astaxanthin production with high productivity. *Metabolic Engineering*. 2018, 49: 105–115. doi:10.1016/j.ymben.2018.08.002

26. Park S. Y., Binkley R. M., Kim W. J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-level astaxanthin production with high productivity. *Metabolic Engineering*. 2018, 49: 105–115. doi:10.1016/j.ymben.2018.08.002

27. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання / Уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010. – 129 с.

28. Basavaraju M., B.S. Gunashree. 'Escherichia Coli: An Overview of Main Characteristics'. *Escherichia Coli - Old and New Insights. IntechOpen*. 2022. doi:10.5772/intechopen.105508.
29. Scheutz F., Strockbine, N.A. *Escherichia. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2015, 1–49. doi:10.1002/9781118960608.gbm01147
30. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. / Т. П. Пирог. – К.: НУХТ, 2010. – 217 с.
31. DETERMINATION OF AMMONIA NITROGEN BY SEMI-AUTOMATED COLORIMETRY [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-06/documents/epa-350.1.pdf>
32. Mendes-Ferreira A., Mendes-Faia A., Leao C. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, 97(3): 540–545. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02331.x
33. Water Treatment Systems [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.gea.com/en/products/liquid-processing/water-treatment-systems/>