МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет)__біотехнології та екологічного контролю__
Кафедра _____біотехнології і мікробіології_____

«До захисту в ЕК»	**«До захисту допущено»**
Директор інституту(декан факультету)	Завідувач кафедри
_____ Наталія ГРЕГІРЧАК	_____ Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)	(підпис) (ім'я та прізвище)
«___» _____ 20__р.	«___» _____ 20__р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності_____162 «Біотехнології та біоінженерія»_____
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна_____
на тему: _____«Культивування *Saccharomyces cerevisiae* з метою_____
_____одержання ергостерину»_____

Виконала: здобувачка_5_ курсу, групи_1_

_____ШВИДКА Олена Русланівна_____ _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _УДИМОВИЧ Віктор Миколайович___ _____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти_____ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

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

Рецензент Інна ТРОХИМЕНКО _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач_____
(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) __Біотехнології та екологічного контролю_____
Кафедра _____біотехнології і мікробіології_____
Освітній ступінь____бакалавр_____
Спеціальність____162 «Біотехнології та біоінженерія»_____
(код і назва)
Освітньо-професійна програма ____«Біотехнології: фармацевтична,_____
_____промислова, харчова, природоохоронна»_____
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
біотехнології і мікробіології

_____ Віктор СТАБНІКОВ
"_06_" ___листопада___2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

_____ШВИДКОЇ Олени Русланівни_____
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи ___«Культивування *Saccharomyces cerevisiae* з метою_____
_____одержання ергостерину»_____
керівник роботи _УДИМОВИЧ Віктор Миколайович, ст. викл., PhD_____,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 6 листопада 2023року № 915-кс
2. Строк подання здобувачем роботи__31 січня 2024 р._____
3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Saccharomyces cerevisiae* , цільовий продукт: ергостерин, об'єм ферментера 1 $м^3$, коефіцієнт заповнення 0,6_____
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика ергостерину. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми виробництва ергостерину. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля_____
5. Перелік графічного матеріалу
Технологічна схема виробництва ергостерину – 1 аркуш формату А1_____
Апаратурна схема виробництва ергостерину – 1 аркуш формату А1._____

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання____06 листопада 2023 року_____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика ергостерину	06.11.2023 – 14.11.2023	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	14.11.2023 – 18.11.2023	
3	Техніко-економічне обґрунтування	18.11.2023 – 29.11.2023	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	28.11.2023 – 07.12.2023	
5	Специфікація обладнання	09.12.2023 – 16.12.2023	
6	Опис технологічної схеми виробництва ергостерину	17.12.2023 – 31.12.2023	
7	Контроль виробництва	01.01.2024 – 10.01.2024	
8	Охорона довкілля	11.01.2024 – 22.01.2024	
9	Оформлення кваліфікаційної роботи	22.01.2024 – 28.01.2024	
10	Оформлення графічної частини кваліфікаційної роботи	23.01.2024 – 28.01.2024	

Здобувач _____ Олена ШВИДКА
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____ Віктор УДИМОВИЧ
(підпис) (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Ця кваліфікаційна робота розроблена з метою отримання субстанції ергостерину за допомогою виробничого культивування такого біологічного агента як *Saccharomyces cerevisiae* GE-2, що має максимальний вихід при біосинтезі у 1,51г/л культурадбьної рідини за віроно підібраних параметрів синтезу. Ергостерин є ключовим попередником отримання вітаміну D_2, який надважливий для попередження і профілактики таких хвороб як рахіт, остеопороз та інші, що пов'язані із засвоєнням. Також цей вітамін в подальшому надзвичайно важливий і для вагітних жінок та в період лактації у жінок.

Отримання культуральної рідини при біосинтезі *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 передбачає наявність допоміжних (навчання персоналу, миття обладнання та приміщень, підготовка миючих засобів і титрувальних агентів, підготовка поживних середовищ) і основних етапів (отримання посівного матеріалу, виробниче культивування).

Кваліфікаційна робота представленна на 96 сторінках друкованого тексту, містить 12 таблиць, 7 рисунків, має вступ, вісім розділів, список використаної літератури (54 джерела) та графічну частину (2 креслення формату А1).

Ключові слова: ергостерин, вітамін D_2, продуцент, дріжджі, *Saccharomyces cerevisiae* GE-2, ферментер.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ……..... 4
ВСТУП…….……7
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту …….. 9
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору технологічної схеми
виробництва ергостерину …….....…… 13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента ……..... 14
2.2 Таксономічний статус …….....….17
2.3. Морфолого-культуральні ознаки …… 18
2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки ……..…….. 19
2.5. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт ……. 20
РОЗДІЛ 3 Техніко-економічне обґрунтування …….…… 21
3.1. Потреба у цільовому продукті……..…….…… 21
3.2. Розрахунок потужності виробництва……..23
3.3. Розрахунок об’єму ферментера та кількості виробничих циклів…25
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу……26
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва…...27
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера…… 27
4.2. Обгрунтування вибору ферментаційного обладнання …… 28
4.3. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря……..... 30
4.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів ……..…….32
4.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища… 36
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання, що використовується для
виробництва……39
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми ……44
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва…….. 63
7.1. Карта постадійного контролю під час виробництва …… 63
7.2. Мікробіологічний контроль ……..…….. 70
7.3. Визначення концентрації біомаси…….……...71

7.4. Визначення концентрації вуглецю ……..…..... 71
7.5. Визначення концентрації азоту……72
7.6. Визначення концентрації цільового продукту ……. 73
РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля ……. 75
8.1. Аналіз технологічної схеми отримання цільового продукту
на наявність емісії твердих, рідких та газоподібних відходів …… 75
8.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва …. 78
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів …….. 78
8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів ……. 79
8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів …… 79
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ……..... 81
ДОДАТКИ …….... 87

ВСТУП

З плином часу та переорієнтуванням виконуваних робіт від роботи на вулицях до робіт в офісних приміщеннях або ж приміщеннях з обмеженою можливістю потрапляння сонячних променів, у більшості країн світу спостерігається дефіцит вітаміну групи D у організмі людей. Найбільший цінний серед всіх є D_2 – вітамін жиророзчинний, котрий утворюється під дією ультрафіолетових променів з ергостерину. [1,3].

При нестачі або недостаній кількості вітамінів групи D у дітей в перші роки життя може виникнути таке захворювання як рахіт. У людей старшого віку та у вагітних жінок, знижений рівень або недостатній об'єм вітамінів групи D призводить до втрати кальцію та крихкості кісток, що ідентифіковується таким захворюванням як остеопороз. Також недостача вітамінів групи D призводить до поганого засвоєння кальцію у шлунково-кишковому тракті і негативно в подальшому впливає на роботу паращитовидних залоз і гіршому спротиву оргазму при різноманітних захворювань, наприклад при такому вірусному захворюванню як Covid-19, адже при захворюванню ним значній кількості людей призначали препарати вітамінів групи D [2,6].

Природніми джерелами ергостерину зазвичай виступають фітопланктон, зелені водорості та дріжджі. [2,3].

Більшість препаратів, що на сьогодні представлені на ринку України, мають одну діючу речовину – ергокальциферол. Але при виробництві цих препаратів в Україні, діюча і допоміжні речовини закуповуються за кордоном. А зважаючи на військову агресію проти України, обмеження та ускладнення логістичних шляхів постачання для виробників фармацевтичних препаратів, питання виготовлення субстанцій різноманітних препаратів для лікарських засобів постає гостро як ніколи.

Актуальність даної теми полягає в пошуку продуцента ергостерину на противагу тим, що зараз зазвичай використовуються, а це дріжджі виду *S. carlbergensis* або *Candida.*

Новизна проекту. Для біосинтезу ергостерину пропонується пропонується використовувати штам *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 з виходом ергостерину в 1,51 г/л [11].

РОЗДІЛ 1.
ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Ергостерин, який утворює *Saccharomyces cerevisiae*, є провітаміном вітаміну D_2. Проте треба відзначити, що це не є справжнє вироблення вітаміну D, а перетворення ергостерину дріжджового походження у активну форму під дією УФ-випромінювання. Спочатку він перетворюється на віостерол під дією ультрафіолету, а потім змінюється на ергокальциферол, форму вітаміну D, також відому як D_2. З цієї причини, коли дріжджі, або ж гриби, піддаються ультрафіолетовому опромінюванню, відбувається процес утворення вітаміну D у великих кількостях [1,2].

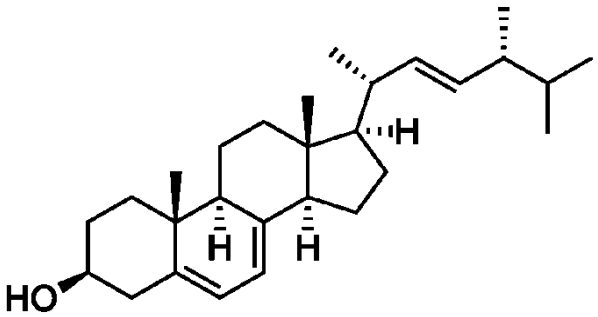


Рис. 1.1. Молекулярна та просторова формула ергостерину

Сучасні препарати на основі ергостерину мають у своєму складі лише єдину діючу речовину – 1 мл розчину ергокальциферолу в кількості 1,25 мг (50 000 МО), та як допоміжна речовина, присутня соняшникова олія. Випускається у формі 0,125% олійного розчину по 10 мл у кожному флаконі. Тобто, кожен 1 мл готової лікарської форми має у складі 12,5 мг ергокальциферолу [12].

Основні фізико-хімічні властивості.

Прозора маслянista рідина, від світло-жовтого до темно-жовтого кольору, без прогірклого смаку. Допускається наявність специфічного запаху. Активність ергокальциферолу виражається у міжнародних одиницях: 0,025 мкг

хімічно чистого вітаміну D_2 відповідає 1 МО [11,12].

Фармакологічні властивості. Ергокальциферол регулює обмін фосфору і кальцію в організмі, сприяє їх всмоктуванню в кишківнику за рахунок збільшення проникності слизової оболонки і адекватному депонуванню у кістковій тканині. Дія ергокальциферолу посилюється при одночасному надходженні сполук кальцію і фосфору.

Фармакодинаміка. Вітамін D_2 належить до групи вітамінів, розчинних у оліях, і є одним з регуляторів обміну фосфору та кальцію. Сприяє всмоктуванню останніх із кишківнику, розподілу та відкладанню у кістках при їх рості. Специфічний ефект вітаміну особливо виявляється при рахіті (протирахітичний вітамін) [12].

Фармакокінетика. Перорально прийнятий вітамін D всмоктується в кров у тонкому кишківнику, особливо добре – у його проксимальному відділі. З кров'ю вітамін надходить до клітин печінки, де він за участі 25-гідроксилази гідроксилюється з утворенням його транспортної форми, яка доставляється кров'ю у мітохондрії нирок. У нирках проходить його подальше гідроксилювання за допомогою lα-гідроксилази, внаслідок чого утворюється гормональна форма вітаміну. Уже ця форма вітаміну D транспортується кров'ю у тканини-мішені, наприклад – у слизову оболонку кишківника, де вона ініціює абсорбцію Ca^{++} [12].

Перепарат показаний для профілактики і лікування гіповітамінозу D, рахіту, а також при захворюваннях кісток, зумовлених порушенням обміну кальцію (різні форми остеопорозу, остеомаляція), при порушеннях функцій паращитовидних залоз (тетанія), туберкульозу шкіри та кісток, псоріазі, системному красному вовчаку (СКВ) шкіри і слизових оболонок [12]

Дозування. Для профілактики рахіту ергокальциферол можна призначати різними методами:

1. Фізіологічний метод – щоденно доношеним дітям, впродовж 3-х років, за винятком 3-х літніх місяців, Ергокальциферол призначають по 500 МО на добу (курсова доза на рік – 180000 МО);

2. Курсовий метод – щоденно дитині призначають ергокальциферол по 1400 МО впродовж 30 днів на 2-6-10-му місяці життя, у подальшому – до 3-річного віку по 2-3 курси на рік з інтервалами між ними у 3 місяці (курсова доза на рік – 180000 МО) [12].

Побічні ефекти.

При передозуванні та застосуванні у великих дозах можуть спостерігатися втрата апетиту, нудота, запори, загальна слабкість, головний біль, порушення сну, роздратованість, гіпертермія, зміни з боку показників сечі (лейкоцити, білок, гіалінові циліндри). Указані токсичні ефекти, які характеризують гіпервітаміноз D, супроводжуються підвищенням рівня кальцію у крові та посиленою екскрецією його із сечею. Не виключається також кальциноз м'яких тканин, легенів, нирок, кровоносних судин. При появі описаних ефектів препарат відміняють і максимально обмежують введення кальцію в організм, включаючи надходження його з їжею.

Показання:

- Підвищена чутливість до компонентів препарату;
- гіпервітаміноз D;
- активна форма туберкульозу легень;
- виразкова хвороба шлунка та дванадцятипалої кишки;
- гострі та хронічні захворювання печінки та нирок;
- захворювання серця та судин у стадії декомпенсації;
- підвищений рівень кальцію та фосфору в крові та сечі;
- саркоїдоз [12]

Умови та термін зберігання.

Зберігати в захищеному від світла та недоступному для дітей місці за температури від 8 до 15^{o}C. Термін придатності – 2 роки [12].

Взаємодія з іншими лікарськими засобами та інші види взаємодій.

При одночасному застосуванні з солями кальцію токсичність вітаміну D_2 підвищується. При призначенні з препаратами йоду відбувається окиснення вітаміну. При одночасному застосуванні з антибіотиками (тетрациклін,

неоміцин) спостерігається порушення всмоктування ергокальциферолу. Комбінування препарату з мінеральними кислотами призводить до його руйнування та інактивації.

Тіазидні діуретики, лікарські засоби, які містять Ca^{2+}, підвищують ризик розвитку гіперкальціємії, яка викликає зниження толерантності до серцевих глікозидів, що призводить до сповільненості елімінації препарату та його накопичування в організмі.

Під впливом барбітуратів (у т.ч. фенобарбіталу), фенітоїну та примідону потреба в вітаміні D може значно підвищуватись, що проявляється у посиленні остеомаляції або ступені тяжкості рахіту (зумовлено прискоренням метаболізму ергокальциферолу в неактивні метаболіти внаслідок індукції мікросомальних ферментів) [12].

Довготривала терапія на фоні одночасного застосування антацидів, що містять Al^{3+} та Mg^{2+}, збільшує їх концентрацію в крові та ризик виникнення інтоксикації (особливо при наявності хронічної ниркової недостатності). Кальцитонін, похідні етидронової і памідронової кислот, плікаміцин, галію нітрат та глюкокортикостероїди зменшують ефект. Холестирамін, колестіпол та мінеральні олії знижують абсорбцію у травному тракті жиророзчинних вітамінів та потребують збільшення їх дозування.

Рифампіцин, ізоніазид, протиепілептичні препарати, холестирамін знижують ефективність ергокальциферолу. Застосовувати з обережністю з кетоназолом, інгібіторами цитохрому Р450. Збільшує абсорбцію препаратів, що містять фосфор, та ризик виникнення гіперфосфатемії. Одночасне застосування з іншими аналогами вітаміну D (особливо кальцифедіолом) підвищує ризик розвитку гіпервітамінозу (не рекомендується) [12].

РОЗДІЛ 2.
ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЕРГОСТЕРИНУ

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту

Ергостерин, в основному, можна синтезувати двома різними шляхами. Перший: ергостерин може бути отриманий із залишків міцелію пеніцилових грибів чи при ферментації лимонної кислоти. Другий: синтез ергостерину шляхом ферментації дріжджів. Варто зазначити, що з економічної точки зору перший шлях є дешевшим, проте вміст ергостерину в міцелії є значно нижчим, що обмежує використання цього методу для одержання вітаміну D_2 у необхідних кількостях [11, 13].

Для отримання ергостерину промисловим шляхом використовують дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* чи *Saccharomyces carlbergensis* [14]. Крім того, відомі шляхи застосування дріжджів роду *Candida*. У результаті порівняльних досліджень було встановлено, що найбільш перспективні продуценти здатні накопичувати в біомасі 2,0–3,5 % ергостерину [14,15]. Тому обираємо штам дріжджів *S. cerevisiae* GE-2 для дослідження й штам *S. cerevisiae* No. A-3 для порівняння [11].

Крім того, вітаміни групи D, каротиноїди, стерини, убіхінони та величезне число інших природних сполук об’єднують на основі спільних початкових стадій біосинтетичного шляху в одну групу – терпенів чи терпеноїдів. На основі даного твердження до одного із перспективних продуцентів ергостерину можна віднести *Blakeslea trispora*, більш відомий як продуцент лікопіну та β-каротину. Тому для порівняння також обираємо штам гриба *B. trispora* ATCC14271 (+) та ATCC14272 (–) [11].

Узагальнену характеристику технологічних особливостей одержання ергостерину з використанням різних штамів продуцентів наведено у *табл. 2.1*.

Таблиця 2.1

Особливості синтезу ергостерину різними продуцентами

Біологічний агент	**Склад поживного середовища:**		**Тривалість культивування, год**	**Концентрація рибофлавіну, мг/л**	**Особливості процесу біосинтезу**	**Використана література**
	компонент	**концентрація, г/л**				
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*
B. trispora ATCC14271 (+) та ATCC14272 (–)	Крохмаль соєва макуха кукурудзяний гідролізат KH_2PO_4 $MgSO_4$ тіамін	40 20 25 1 0,1 0,01	120	400	pH 6.5	13
S. cerevisiae (Y-E-1)	Глюкоза кукурудзяний екстракт $NaNO_3$ KH_2PO_4 $MgSO_4$ $CuSO_4 \times 5H_2O$ $FeSO_4 \times 7H_2O$ $ZnSO_4 \times 7H_2O$	600 15 7 6 3 0,0002 0,001 0,01	96	2000	Підтримка рівнів pH 5.5±0.1; етанолу нижче 1%; концентрації іону амонію нижче 0,1 мол/л;	16
Saccharomyces cerevisiae GE-2	глюкози патоки дріжджового екстракту кукурудзяний екстракт $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ KH_2PO_4	70 28 10 16 9 4 2	48	1510	Температура 29,5±0,5°C, pH – 5,4±0,1	11

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для вирощування продуцентів ергостерину

Продуцент	**Компонент поживного середовища**	**Концентрація у ПС, г/л**	**Ціна компонента, грн/кг**	**Вартість компонента (грн) на 1 л середовища**	**Джерело інформації (1, 2, 3)***
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
B. trispora ATCC14271 (+) та ATCC14272 (–)	Крохмаль гідролізат	40	330	13,2	
	соєва макуха	20	350	7	
	Кукурудзяний екстракт	25	65	1,63	3
	KH_2PO_4	1	97	0,097	4
	$MgSO_4$	0,1	19	0,0019	4
	тіамін	0,01	3060	0,306	2
	Вартість 1 л середовища – 22,24 грн				
S. cerevisiae (Y-E-1)	Глюкоза	600	51	30,6	1
	кукурудзяний екстракт	15	65	0,975	3
	$NaNO_3$	7	145	1,015	
	KH_2PO_4	6	97	0,582	4
	$MgSO_4$	3	19	0,057	4
	$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,0002	160	0,032	3
	$FeSO_4 \times 7H_2O$	0,001	46	0,000046	
	$ZnSO_4 \times 7H_2O$	0,01	1700	0,017	
	Вартість 1 л середовища –33,28 грн.				
Saccharomyces cerevisiae GE-2	Глюкоза	70	51	0,867	1
	Патока	28	44	1,232	
	дріжджовий екстракт	10	1100	11	3
	кукурудзяний екстракт	16	65	1,04	3
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4	19	0,076	4
	KH_2PO_4	2	97	0,194	4
	Вартість 1 л середовища – 14,41грн.				

Примітка. * – Ціни наведено станом на березень 2023 р. 1 – https://www.chemsale.com.ua/, 2 – https://bigl.ua/ua/, 3 – https://prom.ua/ua/, 4 – https://flagma.ua/, 5 – https://7sotok.com.ua/ua/, 6 – https://tabletki.ua/uk/, 7 – https://ximindustry.com/ua/, 8 – https://him-component.com.ua/.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г рибофлавіну, одержаного при рості на середовищах різного складу

Біологічний агент	**Концентрація рибофлавіну, г/л**	**Тривалість культивування, год**	**Кількість синтезованого рибофлавіну за годину, г/год**	**Вартість 1 л середовища, грн/л**	**Умовна вартість 1 г рибофлавіну, грн/г**
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
B. trispora ATCC14271 (+) та ATCC14272 (–)	0,4	120	0,003	22,24	55,6
S. cerevisiae (Y-E-1)	2	96	0,02	33,28	16,64
Saccharomyces cerevisiae GE-2	1,51	48	0,03	14,41	9,54

Як видно з таблиці, при культивування суміші штамів *B. trispora* ATCC14271 (+) та ATCC14272 (–), за умови дотримання всіх особливостей процесу, отримуємо результати виходу 0,68% та 400 мг/л ергостерину від біомаси, що є низьким результатом, як відсотковий вихід, так й у кількісному співвідношенні. Крім того, весь процес займає 120 годин – найтриваліше культивування серед усіх представлених штамів.

У свою чергу, штами *S. cerevisiae* (Y-E-1) та *S. cerevisiae* GE-2 показали кращі результати, у порівнянні з *B. trispora* у кількісному виході ергостерину: у 4 та 3 рази більший вихід, відповідно. Більше того, тривалість культивування обох штамів дріжджів триває у 2 та 3 рази менше, ніж у *B. trispora*. Але з огляду на вищий вихід цільового продукту (1,51 г/л) та менший час культивування, обираємо штам *S. cerevisiae* GE-2 як основний продуцент ергостерину.

2.2.Таксономічний статус

Дріжджі не утворюють конкретні таксономічні або філогенетичні групи. В даний час вважається, що тільки 1% всіх видів дріжджів є описаним.

Термін "*дріжджі*" часто сприймається як синонім *Saccharomyces cerevisiae*, однак філогенетична різноманітність дріжджів зумовлює їх розміщення в двох підрозділах *Ascomycota* і *Basidiomycota*. "Справжні дріжджі" класифікуються в порядку *Saccharomycetales* [8,17]:

Класифікація *Saccharomyces cerevisiae* за Н.Дж.В.Кретер-ван Рієм (1984 р.)

Клас	*Hemiascomycetes*
Порядок	*Saccharomycetales*
Родина	*Saccharomycetaceae*
Рід	*Saccharomyces*
Вид	*Saccharomyces cerevisiae*

Положення *Saccharomyces cerevisiae* у класифікації Куртцмана (2000 р.)

Відділ	*Eumykota*
Підвідділ	*Ascomycotina*
Клас	*Hemiascomycetes*
Порядок	*Saccharomycetales*
Родина	*Saccharomycetaceae*
Рід	*Saccharomyces*
Вид	*Saccharomyces cerevisiae*

2.3. Морфолого-культуральні ознаки

Хлібопекарські дріжджі роду *Saccharomyces cerevisiae* являють собою біомасу дріжджових клітин *(рис 2.1)*, що містять багатий комплекс біологічно активних речовин та володіють ферментативною активністю, яка забезпечує інтенсивне зброджування цукрів борошна і розпушування тіста. Дріжджі багаті вітамінами (рибофлавін, ергостерин, пантотенова, нікотинова та фолієва кислоти) і тому являються цінним продуктом для вітамінізації хлібобулочних виробів [8].

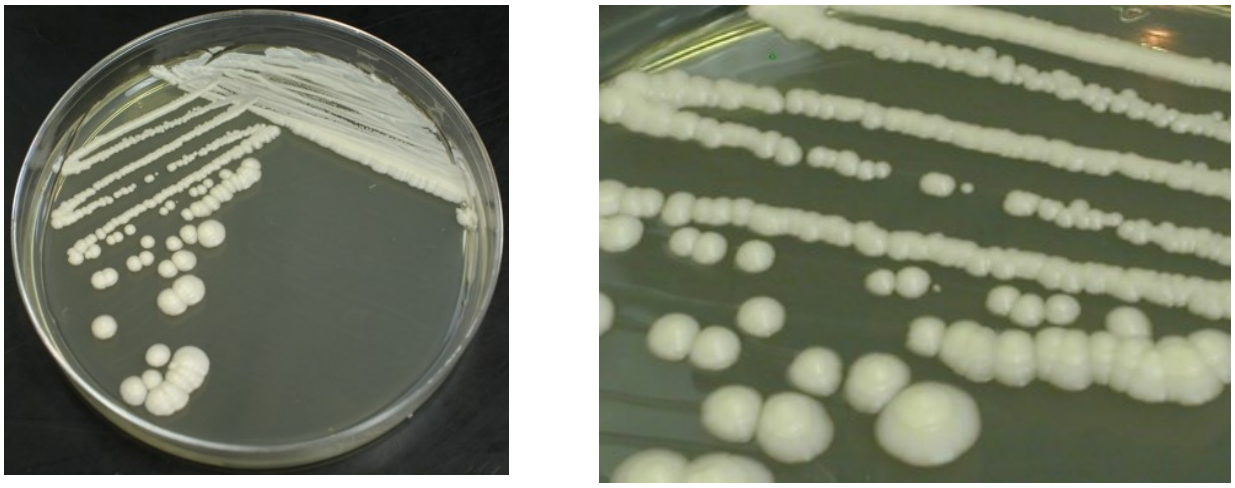


Рис. 2.1. Колонії *Saccharomyces cerevisiae* на сусло-агарі

Клітини *S. cerevisiae* мають округлу, яйцеподібну або еліпсоїдну форму *(рис. 2.2.)*, а їх розмір коливається від 2,5 до 10 мкм в діаметрі та від 4,5 до 21 мкм в довжину. Розмір і форма клітин одного і того ж штаму визначаються генетично і можуть варіюватися в певних межах залежно від умов культивування та операцій отримання комерційних дріжджів (зневоднення) [8].

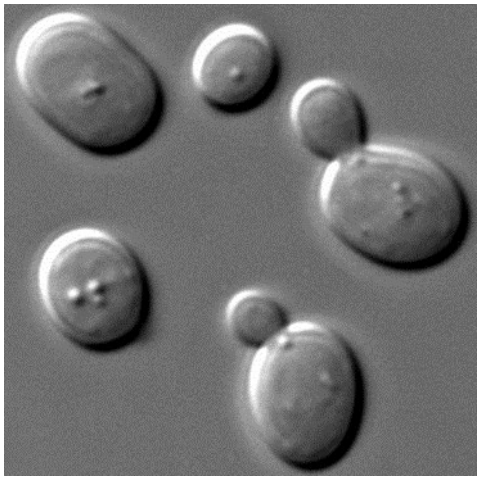


Рис. 2.2. Клітини *Saccharomyces cerevisiae* під мікроскопом

2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки

Дріжджі *S. cerevisiae* належать до факультативних анаеробів, тобто вони здатні рости як у присутності кисню, так і за його відсутності. Клітини *S. cerevisiae* можуть переключатися з дихання (у присутності кисню) на бродіння (за відсутності кисню).

Дріжджі *S. cerevisiae* є гетероорганотрофами, тому вони використовують органічні сполуки як єдине джерело вуглецю, енергії та електронів. Штам *S. cerevisiae* росте на таких субстратах, як: сахароза, ацетат, гліцерин, піруват, але найкраще ростуте на глюкозі. Катаболізм глюкози здійснюється за шляхом Ембдена – Мейєргофа – Парнаса (гліколітичним шляхом). В метаболізмі *S. cerevisiae* процес бродіння значно переважає над диханням (98 % становить бродіння і лише 2% – дихання). Кінцевим продуктом бродіння є етанол, який окиснюється до вуглекислого газу і води внаслідок виникнення "депресивного" стану.

Штам *S. cerevisiae* найкраще росте при pH 4 – 6 , але він не втрачає свою життєздатність при ще нижчих значеннях pH. *S. cerevisiae* може рости в діапазоні температур від 10^0 – 40^0 С, проте оптимальною температурою для цих мікроорганізмів є 27^0 С. Одна з основних ознак *S. cerevisiae* – виділення протеаз, які розщеплюють токсини (зокрема цитотоксин А *Clostridium dificile*), а також сперміну, спермідину і молочної кислоти [8].

Всі представники роду *Saccharomyces* ростуть і розмножуються тільки на цукровмісних субстратах – природних і штучно приготовлених людиною, з кількістю цукру в них не більше 30 – 32%. Дріжджі засвоюють поживні речовини шляхом процесу бродіння, в результаті чого утворюється спирт. Відповідно, вони мають найбільшу стійкість до негативної дії спирту, який бере участь в боротьбі з мікроорганізмами інших родів за місце існування [8].

2.5. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 на середовищі з глюкозою (джерело вуглецю) перетворюється на піруват у гліколізі. Далі піруват під дією піруватдегідрогенази перетворюється на ацетил-КоА.

Дві молекули ацетил-КоА з'єднуються з утворенням ацетоацетил-КоА, далі за приєднанням третьої молекули утворюється триокситриметил-КоА, ці перетворення відбуваються завдяки ферментам сім'ї синтетаз [8, 18].

Далі в ряді перетворень за каталізу специфічними ферментами (оксиметилглутарил-КоА-синтетаза та мевальдинатредуктаза) утворюється мевальдинова кислота, мевалонова кислота і через ряд перетворень утворюється важливий інтермедіат геранілпірофосфат, дві молекули якого дають фарнезілпірофосфат. Остання сполука перетворюється у сквален через прескваленпірофосфат завдяки каталізу ферментом фарнезіл-дифосфат фарнезілтрансферазі. Сквален, в свою чергу, перетворюється у ланостерол під дією ланостерол синтетази.

Ланостерол через серію кроків 4,4-диметилювання, 3-кето-4-метилювання та 4-метилювання перетворюється на зимостерол. Останній під дією стерол метилтрансферази перетворюється на фекостерол, який стерол ізомераза перетворює на епістерол. А вже епістерол під дією спочатку стерол десатурази, а потім стерол редуктази перетворюється на ергостерин [13].

РОЗДІЛ 3.
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Ергостерин, який утримується за допомогою *Saccharomyces cerevisiae*, є провітаміном самого вітаміну D_2. Необхідно відзначити, що це не є процес синтезу вітаміну D, а лише його подальша трансформація ергостерину дріжджового походження у активну форму за допомогою дії УФ - проміння. Як раніше вже зазначалося, представлені на ринку препарати на основі ергостерину містять у собі лише одну діючу речовину – 1 мл розчину ергокальциферолу в кількості 1,25 мг (50 000 МО), а як допоміжна речовина - наповнювач, використовується соняшникова олія. Зазвичай випускається у формі 0,125% олійного розчину по 10 мл у одному флаконі (Табл. 3.1.) [2, 12].

Таблиця 3.1

Захворювання (профілактика)	**Доза препарату на добу, МО**	**Тривалість прийому, днів**	**Кількість препарату на 1 людину, мл**	**Кількість хворих в Україні на 2022 р.**	**Кількість ергокальциферолу на всіх хворих (г)**
Лікування рахіту	1400-5600 (4 краплі)	30-45	12-18	2 450 000 [19]	55125
Псоріаз	2000 (1 крапля)	30	3	1 500 000 [21]	5625
При вагітності	2000 (1 крапля)	56 днів	5,6	195 000 [19]	1365
Профілактика рахіту	1400 на рік (1 крапля)	30 діб протягом 3-х місяців	9	3 250 000 [19]	36562,5
Профілактика для недоношених дітей	1400-2800 (2 краплі щодня)	протягом 2-3 місяців протягом року	12-18	9095 [21]	0,204
Лікування туберкульозу кісток	100000 (72 краплі)	180 (6 місяців)	130	326 [21]	0,053
Загальний маса препарату на всіх хворих, г (кг)					98678 г (98,678 кг)

За нестачі вітаміну у дітей переважно перших трьох років життя з'являються ознаки рахіту. В дорослих (особливо у вагітних жінок), які мало перебувають на сонці, не вживають достатньо повноцінної їжі, кісткова тканина втрачає кальцій і кістки розм'якшуються – виникає ризик захворювання на остеопороз. Також, нестача цього вітаміну погіршує абсорбцію кальцію в кишківнику, а ергокальциферол, в свою чергу, регулює обмін фосфору і кальцію в організмі, сприяє їх кращому всмоктуванню в кишківнику за рахунок збільшення проникності слизової оболонки і адекватному депонуванню у кістковій тканині [2,4,5].

3.2. Розрахунок потужності виробництва

У формі ергокальциферолу виробництвом вітаміну D_2 в Україні займаються на підприємствах АТ «Вітаміни» та ПрАТ «Технолог», що знаходяться в місті Умань, Черкащина.

Відповідно до опублікованої публічної інформації, підприємства АТ «Вітаміни» та ПрАТ «Технолог» мають необхідні дозволи та ліцензію на виготовлення та продаж готового лікарського препарату під торгівельною маркою «Ергокальциферол», але використовуючи не власну вироблену субстанцію та компоненти лікарського препарату, а імпортну та закуплено у виробників в Україні [12].

Зважаючи на те, що з 24 лютого 2022 р. і до сьогодні в Україні триває воєнний стан, порушене логістичне плече поставок необхідних компонентів для всіх галузей виробництв, зокрема і для фармацевтики, а також оскільки як ці виробники, так і решта виробників лікарських препаратів імпортують необхідні компоненти, то на сьогодні гостро постає питання виробництва субстанцій власного виробництва для забезпечення як національної безпеки (через призму забезпечення необхідними ліками громадян країни), так і забезпечення безперебійної роботи підприємств. Саме тому створення подібного підприємства з випуску вітаміну D_2 є необхідним не лише з точки зору зменшення вартості нового готового продукту у порівняні з тими препаратми,

що вже є на ринку, а й для забезпечення національної безпеки країни та максимального забезпечення України субстанцією власного виробництва.

Сьогодні на ринку препарати ергокальциферолу в Україні випускаються у вигляді олійного розчину 0,125%, що мається на увазі на 1 мл розчину препарату припадає 1,25 мг діючої речовини [12]. Оскільки даний препарат, буде випущено на новому підприємстві на ринку України - то у людей може на початковому етапі бути менше довіри до препарату, який виготовлений з вітчизняної субстанції, передбачається, що ним будуть користуватися близько 50% хворих від загальної кількості. Також потрібно відзначити, що у одному флаконі готового препарату міститься 10 мл речовини, а також зважаючи на загальну кількість флаконів необхідну для лікування та профілактики всіх хворих *(див. табл. 3.1)*, то необхідний об'єм ергостерину для подальшого забезпечення потреб становитиме:

98678 г – 100%

Х – 50%, відповідно

Х – 49339 г (49,34 кг)

Продуцент ергостерину – штам *Saccharomyces cerevisiae* (GE-2) синтезує 1,51 г на 1 літр культуральної рідини [11]. Із цього виходить, що кількість культуральної рідини для отримання 49339 г ергостерину становитиме:

1,51 г – 1 л;

49339 г – Х;

Х = 32675 л культуральної рідини

Також необхідно врахувати потенційні сумарні втрати цільового продукту біосинтезу при виділенні (15%), тому необхідно отримати наступну кількість культуральної рідини:

$$V_{зкр} = 32675 / (1 – 0,15) = 38441 \text{ л}$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для подальших розрахунків приймаємо кількість робочих трудоднів ($Т_{рд}$) 180. Тоді кількість продукту на добу ($V_д$) становитиме:

$$V_д = V_{кр}/Т_{рд} = 38441 /180 \approx 213 \text{ л}$$

Наступні 180 днів виробництво буде задіяно для біосинтезу інших необхідних жиророзчинних вітамінів, а також будуть відбуватися планово-попереджувальні роботи та процеси пов'язані калібруванням обладнаннями та іншим сервісними процесами передбаченими інструкціями.

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_ц = V_{кр} / ((V_д \times Т_{цф})/24) = 38441 / ((213 \times 58)/24) \approx 75 \text{ циклів}$$

де $Т_{цф}$ = 58 год – цикл роботи ферментера (тривалість культивування – 48 год; тривалість підготовчих робіт: миття та огляд ферментера - 2 год, перевірка на герметичність - 2 год, стерилізація - 2 год, охолодження -2 год, завантаження середовища -1 год, засів – 0,5 год, вивантаження культуральної рідини – 0,5 год).

Далі розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ($V_{крц)}$:

$$V_{крц}= К1 \times V_д \times Т_{цф} / 24 = 1,1 \times 213 \times 58 / 24 \approx 566,3 \text{ л},$$

де К1– коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій .

Геометричний об'єм виробничого ферментера для отримання 566,3 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,57 має бути:

$$V_г = V_{крц}/К_{зап} = 566,3/0,57 = 944 \text{ л} = 1 \text{ м}^3$$

де $К_{зап}$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл передбачається отримувати $V_{кр}$ = 566,3 л культуральної рідини. Виробничий біосинтез буде здійснюватися у ферментері об'ємом 1 $м^3$ з коефіцієнтом заповнення, 0,57.

Зазвичай кількість посівного матеріалу (доза) для засіву становить близько 10 % від об'єму поживного середовища. Тому, щоб одержати 566,3 л культуральної рідини потрібно:

$V_{роб.1}$=566,3×0,1= 56,63 л посівного матеріалу.

Приготування такої кількості посівного матеріалу здійснюють в посівному апараті об'ємом 100 л.

Щоб накопичити 56,63 л культуральної рідини треба мати:

$V_{роб.2}$=56,63×0,1= 5,66 л посівного матеріалу.

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом 10 л.

5,66 л культуральної рідини можна одержати з використанням

$V_{роб.3}$ = 5,66×0,1= 0,57 л посівного матеріалу.

Таку кількість посівного матеріалу можливо отримати саме культивуванням культури в качалочних колбах об'ємом 0,75 $дм^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,15, то кількість колб буде становити – 5 шт.

Отже, процес одержання та накопичення посівного матеріалу для належного забезпечення виробничого біосинтезу у виробничому ферментері об'ємом 1 $м^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,57 буде проходити у 3 етапи [10].

РОЗДІЛ 4.
ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Під час підбору належних параметрів виробничого біосинтезу необхідно детально враховувати всі фізіолого-біохімічні властивості культури-продуцента, який використовуватиметься. *Saccharomyces cerevisiae* є факультативним анаеробом, тому для належного культивування і відповідно накопичення біомаси потрібно забезпечити середовище достатньою кількістю кисню, ферментер повинен мати відповідний перемішуючий пристрій для покращення масо-обмінного процесу. Тому, якщо концентрація кисню у середовищі буде низькою – процес накопичення належної біомаси буде проходити повільніше, що негативно вплине на час виробничого біосинтезу.

Передбачається, що культивування *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 буде проходити глибинним способом, при постійному перемішуванню механічною мішалкою при 600 об/хв., за температури 29,5±0,5 °С, pH середовища – 5,4 ± 0,1, а тривалість виробничого культивування становитиме 48 год [11].

Виробниче культивування продуцента передбачається проводити без підживлення, попри те, що у наведеному середовищі для культивування, присутні компоненти з високою концентрацією (г/л), але сумарний час культивування становить лише 48 год.

Процес культивування проходитиме за всіма правилами асептики, щоб не допустити контамінації. Тому для дотримання цієї умови, буде використовуватися стерильне обладнання, стерильне поживне середовище, фільтруючим способом очищене аераційне повітря та використовуватися чиста музейна культуру, як посівний матеріал. [10].

Ергостерин є вторинним метаболітом і максимально накопичується під час стаціонарної фази, тому біосинтез ергостерину проводитиметься періодичним способом.

4.2. Обґрунтування вибору ферментаційного обладнання

Для культивування використовуємо повністю автоматизований 1 $м^3$ біореактор (ферментер) фірми «Yocell Biotechnology (Qingdao) Co., LTD» (Китай) з механічною пропелерною мішалкою як основний перемішуючий пристрій з можливістю додатково використання і магнітного перемішуючого пристрою. Даний апарат виготовлений з нержавіючої сталі марки SUS 316L, з можливістю заповнення і створення робочих умов у діапазоні від 30 до 70 % від геометричного об'єму. За контролю за перебігом процесу біосинтезу обладнаний такими контрольно-вимірюючими пристроями як датчик температури, датчин pH, датчик рівня подачі кисню, датчик контролю накопичення піни та датчик об'єму поданих компонентів до ферментера. Тому, зважаючи на вище зазначений опис, цей ферментер дасть змогу забезпечити всі необхідні умови культивування в асептичних умовах з подальший максимальним виходом ергостерину [11].

Оскільки геометричний об'єм ферментера становить лише 1$м^3$ доцільним буде використання звичайної пропелерної мішалки. Водночас для покращення масо обмінного процесу у виробника є можливість додатково встановити відбійні перегородки по зовнішньому контуру апарату. Це необхідно, бо обертаючись в рідині, лопаті діють як «пропелер», тому рідина увесь час перемішуватися буде лише в одному напрямку, а встановлення відбійних перегород дасть змогу створити турбулентний потім і позбавитися так званих «зон застіювання».

Також у ферментері передбачається встановлення барботеру, для створення аеробних умов культивування. Саме тому належний контроль подачі повітря буде проводитися автоматичного витратоміру газів. [22].

Увесь ферментер обладнано «сорочкою» для створення необхідного температурного режиму для культивування, а особливістю є те, що «сорочка» може мати вмонтовані електичні нагрівальні елементи, що дає суттєву перевагу для швидкого встановлення відповідний температурних меж [22].

Рис.4.1. Виробничий ферментер фірми «Yocell Biotechnology (Qingdao) Co., LTD» геометричним об’ємом 1м^3 [22]

4.3. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Оскільки передбачається культивування штаму *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 для отримання ергостерину і відповідно достатньо вірного накопичення біомаси, підготовка аераційного стерильного повітря є невід'ємною складовою цього процесу. Зазвичай найбільша кількість мікроорганізмів накопичується і знаходиться над поверхнею землі (до 2,5 – 3 м), передбачається проводити забір повітря на висоті близько 10 м, де їх кількість є найменшою і прогнозованою до меншої кількості різних включень у самому повітрі (пил, залишки листя, тощо). Компресор повітря повинен затягувати повітря і в подальшому стискати його для достатнього накопичення для безперебійної подачі в робочих етапах процесу [23]. Тому для цієї задачі пропонується використовувати гвинтовий компресор Лідер 10EN-500Д 10 бар з осушувачем повітря (Україна). Тип цього компресора є гвинтовим, продуктивністю 1100л/хв з влаштованим ресивером і можливістю встановлення додаткового.

Рис.4.2. Гвинтовий компресор Лідер 10EN-500Д [23]

Для належного забезпечення стерилізації повітря в боксових та лабораторних приміщеннях, де відбуваються роботи з музейною і посівною культурою та інокулятором, пропонується використовувати УФ-лампи. Для забезпечення повітря, яке буде використовуватися для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування, пропонується використовувати ряд фільтрів, які поділяються на групи та класи відповідно до якості використовуваних фільтруючих матеріалів і відповідно самого фільтрування (ефективності і проникності):

- фільтри грубої очистки;
- фільтри тонкої очистки;
- індивідуальні фільтри, які встановлюються перед відповідним ферментаційним обладнанням.

Доволі часто фільтри грубого очищення заповнюють різного типу набивними волокнами і встановлюють на головному колекторі подачі стисненого аераційного повітря. Часто фільтри для грубого очищення встановлюються після зони забору повітря в якості попередньої очистки для систем забезпечення повітря. Фільтри грубої очистки повітря призначені для затримування великих частинок розміром зазвичай більше 5 мкм (пух, залишки листя, т ощо). Потім повітря за допомогою вентилятора направляється до теплообмінника, де відбувається нормалізація термодинамічних показників, щоб повітря в подальшому не пошкодило елементи фільтрувальних елементів на наступних етапах підготовки. Зазвичай продуктивність подібних фільтрів становить не більше ніж 1500 $м^3$/год.

Доволі часто для даного типу фільтрів обирають фільтри коміркового типу (зі ступенем очистки приблизно 90%) такі як, ФЯП, ФЯР, ФЯУ, котрі поділяються в залежності від фільтруючого матеріалу, який пропонується використовувати (хімволокно, поліуретан, тощо). Одним із найкращих і оптимальних матеріалів є поліуретан, у якого низький опір, матеріал є екологічно безпечним, витримує відновлення і регенерування, а також є нейтральним до дії різних дезінфікуючих засобів [24 - 26].

Для належного фільтрування і тонкого очищення повітря часто використовують матеріали як:

- тканина Камінської;
- базальтове грубе волокно;
- нетканий матеріал для фільтрування.

Їхнє застосування дає змогу досягти ступеню очищення у 95-98%, а також їх не піддають стерилізації, оскільки під час їхнього виготовлення можливо використовувати дезінфікуючі засоби для досягнення цієї ефективності.

Для очищення повітря на останньому етапі підготовки стерильного повітря пропонується у фільтрах використовувати фільтри типу HEPA (рис.4.7. та 4.8). Хоча вони зазвичай і використовуються на фармацевтичних підприємствах і відповідно на фармацевтичних ділянках підготовки повітря для забезпечення відповідних умов виробництва лікарських засобів, доволі часто їх встановлюють і на біотехнологічних виробництвах, бо волокна фільтру мають діаметр лише в межах 0,65 - 5,5 мкм, що гарантує достатній ступінь очищення перед подачею до ферментаційного обладнання. Матеріал для цих фільтрів доволі часто виступають скловолокна (одноразового використання) та фторопласти (багаторазового використання) [24 - 26].

4.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

На вибір дезінфікуючих засобів часто впливає фунгіцидна і бактерицидна дії засобів, та можлива небезпечна дія на персонал, що задіяний на виробництві. Вимоги щодо не токсичності також поширюються і на миючі препарати, які передбачається використовувати. Готові розчини миючих та/або дезінфікуючих засобів потрібно тримати в попередньо очищеній тарі (ємностях) та використовувати лише впродовж установлених виробником термінів. Ще одним суттєвим фактором в умовах ринкової економіки та при наявності обмежених фінансових ресурсів, та об’єми витрат при обробці великих площ приміщень та обладнання.

Миючі та/або дезінфікуючі зазвичай відповідають таким вимогам як:

- виявляють достатньо високу мийну властивість;
- на належному і швидкому рівні розчинятися у воді;
- не виявляють агресивної дії на оброблюванні поверхні
- є нейтральними до ароматизації (не мають запаху) та є безбарвними;
- виявляють бактерицидну дію, щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів
- негативно не впливають на шкіру рук або дихальних шляхів персоналу;
- безпечні для навколишнього середовища та нетоксичні.

Кальцинована сода – це сполука хімічного походження, є натрієвою сіллю вугільної кислоти, твердоподібною у вигляді порошку білого кольору. Має як побутове застосування, так і використовується у скловиробництвах, паперовому та текстильному виробництвах. Сода на високому рівні розчиняється у воді - розчинник обчислюється в 17,7% по масі при 20 °C, в той час як при досягненні 100 °C він досягає 31,3%. Водний розчин соди має лужну реакцію внаслідок гідролізу солі. При приготуванні водних розчинів кальцинована сода частково розкладається з подальшим утворенням їдкого лугу та гідрокарбонату, що і створює відповідний миючий ефект. Тому її використання у якості миючого засобу для ферментаційного обладнання є обґрунтованим. [27,28].

Для миття виробничого ферментаційного обладнання від різних типів залишків при культивуванні (наприклад, залишків поживного середовища), можливо використовувати і *каустичну соду*. Каустична сода є досить ефективною для видалення залишків білків та мікроорганізмів, вона є потенційно небезпечною для здоров’я персоналу, що з нею контактує і працює, оскільки може викликати хімічні опіки та подразнення слизових оболонок верхніх дихальних шляхів. Тому використання даного компоненту для миття обладнання є доволі небажаним [29].

Тому, на мою думку, найбільш доцільним буде використання кальцинованої соди. Виробник рекомендує використовувати приготовлений 0,5

- 1% розчин каустичної соди в температурних межах 45±5°С під час ручного миття обладнання та 1 – 2% розчини за температурних меж готового розчину 55±5°С при автоматичному режимі миття обладнання.

Для належного пошуку дезінфікуючих засобів найбільш доречним буде використання інформації, що зазначається у Державному реєстрі дезінфікуючих засобів, котрий оновлюється щорічно і контролюється фахівцями Міністерства охорони здоров'я України та Центром громадського здоров'я. Окрім цього важливо розуміти, що всі зазначені в ньому засоби представлені на ринку України, є апробованими та допущеними до використання, а також не сильно шкідливими для здоров'я персоналу, який з ним працює та контактує. Всі засоби, які в ньому зазначені, є такими що можуть використовуватися у різних заклад та системах закладів – охорони здоров'я, освітніх заклад, на харчових підприємствах, і зокрема у фармацевтиці та біотехнології і відповідних виробництвах. Оскільки вимоги до деззасобів на фармацевтичничних підприємствах є великими, то всі вони можуть також використовуватися і на біотехнологічних виробництвах [30].

Соліклор є ефективним, зручним при використанні у товарній формі гранул для дезінфекції, передстерилізаційного очищення, миття, поточного та генерального збирання.

До складу засобу Соліклор як активною речовиною дихлорізоціанурат натрію, а допоміжною — миючий компонент [31].

Антимікробна дія засобу Соліклор:

- бактерицидна, у тому числі щодо широкого спектру грам+ і грам-бактерій (включаючи *S.aureus*, мультирезистентний стафілокок (MRSA), *P.aeruginosa*, збудників дизентерії, сальмонельозу, паратифу, черевного тифу, холери, чуми, туляремії *Bacillus* та ін, збудників внутрішньолікарняних інфекцій);
- віруліцидна (в т.ч. проти збудників гепатитів А, В, С, СНІД, герпесу, грипу всіх типів, парагрипу, «пташиного» грипу, SARS («атипова пневмонія»), аденовірусної, ентеровірусної (в т.ч. поліомієліт, Коксакі,

ECHO), коронавірусної, респіраторно-синтиційної, риновірусної, рота вірусної, цитомегаловірусної інфекції тощо);

- фунгіцидна (проти патогенних грибів роду *Candida* та дерматофітів, а також ефективно у знищенні та попередженні появи плісняви, в т.ч. у споровій формі).

Соліклор не має шкірно-резорбтивних, мутагенних, канцерогенних та сенсибілізуючих властивостей, кумулятивні властивості не виражені, відноситься до 4 класу небезпеки (мало небезпечна речовина за ГОСТ 12.1.007-76). Не має сенсибілізуючої та мутагенної дії [31].

Соліклор застосовується у вигляді водних робочих розчинів, переважно в концентрації від 0,01% до 0,3% активного хлору в залежності від сфери застосування, мети обробки, збудника, виду забруднення та об'єктів обробки.

Способи обробки: протирання, зрошення (аерозольний), заповнення (в т.ч. у CIP-системах), замочування, занурення. У вигляді гранул засіб може застосовуватися для чищення санітарно-технічного обладнання та знезараження біологічних рідин перед їх утилізацією.

Засіб Соліклор може використовуватися для миття та дезінфекції технологічного обладнання (трубопроводи, комунікації, резервуари, насоси, фасувальне та теплообмінне обладнання та ін.), ємнісного обладнання і холодильного, виробничого та лабораторного посуду, поверхонь приміщень (підлога, стіни, двері, крани) [31].

Гуасепт. Діючою речовиною дезинфікуючого засобу Гуасепт (Guasept) є водорозчинні полімерні гуанідинові з'єднання, високого ступеня очищення. Діючою речовиною Гуасепту є полігексаметиленгуанідину гідрохлоріду в концентрації 26% ± 1.5% [32].

Основними сферами застосування Гуасепту є:

- Медицина
- Дезінфекція
- Система кондиціювання
- Вода, басейн

- Ветеринарія

Форма випуску є рідким концентратом об’ємом 1 л.

Унікальна технологія тонкого органічного синтезу, розробленого фахівцями компанії дозволила добитися того, що створений на основі синтезованого полімеру засіб стало малонебезпечних для людини і середовища її проживання.

Завдяки своїм неповторним фізико-хімічними властивостями засіб легко поєднується з різними матеріалами і сумісний з усіма біоцидами.

Концентрат і робочий розчин без запаху, пожежо- і вибухобезпечними; відносяться до 4 класу небезпечності при нанесенні на шкіру і слизові; розчиняються у воді і в органічних розчинниках; не викликають корозію і пошкодження об'єктів.

Термін придатності 5 років

Гуасепт використовується для поточного, заключного і генерального прибирання; дає можливість проводити екстрену дезінфекцію об'єктів [32].

Провівши аналіз наведеної інформації, для дезінфекції поверхонь, обладнання та повітроводів можливо використовувати засоби Соліклор та Гуасепт, але за умови почерговості використання розчинів «Солікор» та «Гуасепт» для недопущення резистності мікроорганізмів. Засоби мають достатньо широкий спектр дії, негативно не впливають площі з якими контактують та є безпечними для персоналу.

4.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Поживне середовище для вирощування і накопичення дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 та в подальшому для виробничого біосинтезу передбачається поділяти на 4 композиції залежно від умов стерилізації та компонентів.

Глюкоза, яка робиться у вигляді розчину, залежно від стадії, стерилізується в окремих колбах або реакторах-змішувачах при 112 ^{o}C (0,05 МПа) у часовому інтервалі 20-30 хв. Розчин глюкози стерилізується окремо від

інших компонентів, адже при дії високих температур (більше 120^{o}C) глюкоза карамелізується в процесі меланіноутворення, а також може вступати у реакції з амінокислотами в ході меланоїдиноутворення, що відповідно призводить до погіршення біодоступності та негативно впливає на отримання ергостерину при виробничому біосинтезі.

Відокремлена стерилізація розчину глюкози від розчинів кукурудзяного екстракту, дріжджового екстракту та патоки пов'язана з можливістю утворення аміноцукрів (комплекси глюкози з амінокислотами), які пригнічують нормальний ріст культури. Деякі компоненти кукурудзяного екстракту мають властивість входити в реакцію із солями, що також зменшує біодоступність для засвоєння культурою. Тому приготування та стерилізація розчину з кукурудзяного екстракту, дріжджового екстракту та патоки проходить в окремих колбах або реакторі-змішувачі при температурному режимі 121^{o}C (0,1 МПа) і часовому інтервалі близько 30 хв [8,10,11].

Таблиця 5.1

Склад композиції	**Композиції для отримання посівного матеріалу**
Глюкоза	А
Кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт, патока	Б
KH_2PO_4	В
$MgSO_4$	Г

Так само окремо в автоклаві чи реакторі-змішувачі проходить стерилізація розчину KH_2PO_4 за температури 131^{o}C (0,15 МПа) в часі приблизно 50 хв, оскільки фосфорні солі та розчини цих солей утворюють нерозчинні осади фосфатів кальцію та магнію (який у вигляді солі $MgSO_4$ присутній в середовищі).

$MgSO_4$ пропонується стерилізувати за температури 131 ^{0}C (0,15 МПа) впродовж 40 - 50 хв [11].

Остаточний розподіл композицій поживного середовища буде виглядати настурним чином:

Композиція А: глюкоза. Режим стерилізації: 112°С, тиск 0,05 МПа протягом 20 – 30 хв.

Композиція Б: Кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт, патока. Режим стерилізації: 112°С, тиск 0,15 МПа протягом 20 – 30 хв.

Композиція В: KH_2PO_4. Режим стерилізації: 131°С, тиск 0,15 МПа протягом 40 хв.

Композиція Г: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Режим стерилізації: 131°С, тиск 0,15 МПа протягом 40 хв.

РОЗДІЛ 5.
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ, ЩО ВИКОРИСТОВУЄТЬСЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА

Основні характеристики обладнання, яке використовується для проведення культивування для подальшого отримання ергостерину зазначені у табл. 3.1, а також представлена візуалізація у графічному зображені до кваліфікаційної роботи (апаратурна схема).

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання

Позиція	Назва обладнання	Кількість	Характеристика апарату
1	*2*	*3*	*4*
Р-1	Реактор для приготування розчину «Кальцинована сода»	3	Збірник СС-100 (Україна). Об'єм роб/повний: 100/100 л. Робоча темпер тару у межах від +15 до +50 °С. Матеріал з якого виготовлений – сталь нержавіюча AISI 316 L (внутрішній), сталь нержавіюча AISI 304 (зовнішній) [33].
Р-2	Реактор для приготування розчину «Солікор»		
Р-3	Реактор для приготування розчину «Гаупсепт»		
ПЗ-4	Забірник повітря	1	Повітрозабірник. Виробник: «Лідер» (Україна). Матеріал: сталь нержавіюча AISI 304 [34].
Ф-5	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр грубого очищення Alter Air (виробник: Україна). Клас фільтрації G4. Робота передбачається в кінцевих межах перепаду тиску у 25-Па. [24]
К-6	Компресор	1	Компресор гвинтового типу 10EN-500Д (виробник: Україна). Потужність двигуна: 7,5 кВт. Робочий надлишковий тиск: 2 – 10 бар. Продуктивність: 1100 л/хв. Робоча температура у межах від +5 до +40°С [23]

Продовження табл. 5.1

Т-7	Теплообмінник-охолоджувач	1	Кожухотрубний теплообмінник В300. Максимальна температура: 203°С Мінімальна температура: -10 ° С Матеріал: сталь нержавіюча AISI 316L [35].
Р-8	Ресивер	1	Ресивер Лідер (виробник: Україна). Максимальний робочий тиск: 13 бар. Робоча температура +5...+40 °С. Робочий об'єм – 1900 л Матеріал: нержавіюча сталь [36].
Т-9	Теплообмінник-нагрівач	1	Кожухотрубний теплообмінник В300. Максимальна температура: 203 ° С Мінімальна температура: -10 ° С Матеріал: сталь нержавіюча AISI 316L [37].
Ф-10	Фільтр головної очистки	1	Фільтр кишенькового типу класу М5-М9. Виробник - Alter Air (Україна). Габаритні розміри: 892х287х600 – 8 комірок (кишень) клас очищення М9. Матеріал: синтетичні волокна. [26].
Ф-16, Ф-23, Ф-28	Індивідуальні фільтри	3	Фільтр тонкої очистки кишенькового типу класу F5-F9. Виробник - Alter Air (Україна). Габаритні розміри: 892х287х600 – 8 комірок (кишень) клас очищення F9. Матеріал: синтетичні волокна [25]
Р-11	Реактор-змішувач для соляної кислоти		Збірник СС-100 (Україна). Об'єм роб/повний: 100/100 л. Робоча темпер тару у межах від +15 до +50 °С. Матеріал з якого виготовлений – сталь нержавіюча AISI 316 L (внутрішній), сталь нержавіюча AISI 304 (зовнішній) [33].
Р-12	Реактор-змішувач для гідроксид натрію		

Продовження табл. 5.1

Р-14	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції Б	1	Реактор на 10 л Виробник: Промвіт (Україна). Робочий об'єм – 10л. Температурні межі роботи від +10 до +98°С. Матеріал з якого виготовлений – сталь нержавіюча AISI 316 L (внутрішній), сталь нержавіюча AISI 304 (зовнішній) [38]
Р-21	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Збірник СМ-350 (Україна). Об'єм роб/повний: 350/419 л. Робоча темпер тару у межах від +15 до +50 °С. Матеріал з якого виготовлений – сталь нержавіюча AISI 316 L (внутрішній), сталь нержавіюча AISI 304 (зовнішній) [39].
І-17	Інокулятор	1	Інокулятор Minifors, Infors., об'ємом 10 л Матеріал корпуса: нержавіюча сталь AISI 316L. Тип конструкції – модульний Потужність: 220Вт. Обладнаний сорочкою, датчиками контролю температури, барботером, значення pH, пробовідбірником, мішалкою з можливістю максимальних обертів до 1500 об/хв. Робоча темпертура [40].
Н-15, Н-20, Н-25, Н-27	Відцентровий насос для перекачування композиції компонентів поживного середовища	3	Відцентровий насос VITALS AQUA CP 1111e. Мксимальна продуктивність – 108 Л/хв, Матеріал – нержавіюча сталь, максимальний напір – 29 м. Габарити 325х198х258 [41].
Н-18, Н-23, Н-30	Відцентровий насос для перекачування посівного матеріалу та культуральної рідини		Відцентровий моноблочний насос Grundfos NS 4-23. Виробник : Grundfos (Італія). Максимальна продуктивність 6,5 $м^3$/год. Напруга – 220. [42].

Продовження табл. 5.1

ПА-22	Посівний апарат	1	Інокулятор Techfors, Infors., об'ємом 100 л Матеріал корпуса: нержавіюча сталь AISI 316L. Тип конструкції – модульний Потужність: 220Вт. Обладнаний сорочкою, датчиками контролю температури, барботером, значення pH, пробовідбірником, мішалкою з можливістю максимальних обертів до 1500 об/хв. Робоча темпертура [43].
Р-24	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції СУЛЬФАТ	1	Реактор на 50 л Виробник: Промвіт (Україна). Робочий об'єм – 50л. Температурні межі роботи від +10 до +98°С. Матеріал з якого виготовлений – сталь нержавіюча AISI 316 L (внутрішній), сталь нержавіюча AISI 304 (зовнішній) [44]
Р-26	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Збірник СМ-350 (Україна). Об'єм роб/повний: 350/419 л. Робоча темпер тару у межах від +15 до +50 °С. Матеріал з якого виготовлений – сталь нержавіюча AISI 316 L (внутрішній), сталь нержавіюча AISI 304 (зовнішній) [39].
ФР-29	Ферментер	1	Ферментер YC-JS об'ємом 1 $м^3$, виробник Yocell Biotechnology (Qingdao) Co., LTD (Китай). Матеріал: сталь нержавіюча 304 SUS316L, точність внутрішнього полірування менше 0,4 мкм для зменшення бактеріального забруднення; має барботер, сорочкою нагріву-охолодження, датчиками значень pH, рівня кисню, температури; має пробовідбірник та манометр для контролю тиску (за потреби); мішалкою механічного типу (основна) та мішалкою магнітною (за потреби) із частотою обертів до 350 об/хв [22].

Завершення табл. 5.1

З-31	Збірник культуральної рідини	1	Збірник СМ-750, Промвіт (Україна). Об’єм робочий: 750 л. Робоча темпер тару у межах від +15 до +50 °С. Матеріал з якого виготовлений – сталь нержавіюча AISI 316 L (внутрішній), сталь нержавіюча AISI 304 (зовнішній) [45].

РОЗДІЛ 6.
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Навчання персоналу

При працевлаштуванні та перед початком виконання робіт увесь персонал, який долучений до виконання робіт, повинен пройти обов'язкову підготовку, навчання та атестацію знань та навичок, що відображається у особовій справі кожного чпівробітника. Зазвичай 1 раз на рік персонал проходить навчання та технологічний інструктаж відповідно до вимог, що зазначені у нормативних документах та актах України, відомст, яким підконтрольне підприємство та документам самого підприємства.

ДР 1.2. Підготовка персоналу до роботи

Перед початком зміни керівний персонал виробничої дільниці, де відбувається культивування, проводить візуальний медичний огляд (для виявлення проявів поганого стану та самопочуття співробітників, тощо). У випадку відсутності подібних ознак, персонал допускається до подальшої роботи на дільниці. Персонал повинен пройти санітарно-гігієнічні процедури, одягнутися у відповідний технологічний одяг із засобами індивідуального захисту та пройти до виробничої ділянки, щоб приступити до роботи.

ДР 1.3. Підготовка миючих і дезінфікуючих розчинів

ДР 1.3.1. Приготування робочого розчину кальцинованої соди

При застосуванні об'ємно-вагового дозатора в реактор-змішувач (Р-1) подається кальцинована сода та додається питна вода, вмикається перемішуючий пристрій (приблизно на 120 – 130 об/хв) та нагрівають так званою «глухою» парою до температури приблизно 70-80 ºС, для повного і належного розчинення засобу.

ДР 1.3.2. Приготування робочого розчину Соліклору

При застосуванні об'ємно-вагового дозатора до реактору-змішувача (Р-2) подається засіб Соліклор та потім додається питна вода, яка повинна мати температуру близько 55ºС та з подальшим увімкненням перемішуючого пристрою для повного і належного розчинення подальшого робочого розчину.

ДР 1.3.3. Приготування робочого розчину Гуасепту

При застосуванні об'ємно-вагового дозатора до реактору-змішувача (Р-3) подається засіб Гуасепту та потім додається питна вода, яка повинна мати температуру близько 55ºС та з подальшим увімкненням перемішуючого пристрою для повного і належного розчинення подальшого робочого розчину.

ДР 1.4. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.4.1. Щоденне прибирання приміщення

Передбачається, що миючо-дезінфікуючий засіб Соліклору (від ДР 1.3.2) або Гуасепту (від ДР 1.3.3) буде використовуватися для щоденного прибирання приміщень. Для забезпечення і уникнення утворення та подальшого виявлення резистентностійких штамів мікроорганізмів зміна миючо-дезінфікуючих засіб передбачається щоквартально. При щоденному прибиранні проводиться миття підлоги, а також проводиться миття зовнішніх елементів апаратури, що знаходиться у приміщенні. Для достовірності роботи дезінфікуючого засобу проводиться мікробіологічний контроль та контроль візуальний на якість виконання прибирання.

ДР 1.4.2. Генеральне прибирання приміщення

Передбачається, що миючо-дезінфікуючий засіб Соліклору (від ДР 1.3.2) або Гуасепту (від ДР 1.3.3) буде використовуватися для щоденного прибирання приміщень. Для забезпечення і уникнення утворення та подальшого виявлення резистентностійких штамів мікроорганізмів зміна миючо-дезінфікуючих засіб передбачається щоквартально. Генеральне прибирання проходить один раз на один місяць за допомогою більш концентрованих розчинів Соліклору та

Гуасепту та передбачає включає повне миття до якого відноситься миття дверей, стін, вікон та всіх зовнішніх елементів апаратури, що знаходиться у приміщенні. Для достовірності роботи дезінфікуючого засобу проводиться мікробіологічний контроль та контроль візуальний на якість виконання прибирання.

ДР 1.5 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.5.1. Миття та ополіскування обладнання

При проведенні належного миття обладнання, апаратури та комунікацій застосовують робочий розчин соди кальцинованої (розчин надходить з етапу *ДР. 1.3.1*). Робочим розчином кальцинованої соди миють та потім ополіскують обладнання, апаратуру та комунікації в часовому інтервалі-проміжку від однієї години до двух годин при постійному перемішуванні (в середині обладнання/апаратури). Використаний робочий розчин соди після використання відправляється на стадію знешкодження відходів Додаткове ополіскування для змиття залишків робочого розчину кальцинованої соди проводять технічною водою яка є кімнатної температури. Після ополіскування вода направляється або на очищення, або на етап знешкодження відходів.

ДР 1.5.2. Технічний огляд

Після миття та ополіскування обладнання, апаратури та комунікацій відбувається візуальна оцінка для виявлення можливих розгерметизацій на з`єднаннях в запірній арматурі на обладнанні, а також пошкоджень самої апаратури/обладнання, що може призвести до позаштатних і аварійний ситуацій при культивуванні або проведення допоміжних стадій. У разі їх виявлення проводять терміновий ремонт.

ДР 1.5.3. Перевірка обладнання на герметичність

Для проведення перевірку проводиться закриття всієї запірної арматури, ємнісного обладнання, апаратури і устаткування та подається аераційне стерильне повітря для створення надлишкового тиску в межах від 0,1 до 0,2 МПа. Наступним етапом є закриття вентелів, фіксування показників манометра

(-в) та проводиться витримування обладнання/апаратури під тиском у часових межах від 30 хв до 60 хв. Обладнання проходить перевірку у випадку, якщо тиск не зменшується більше ніж на 0,01 Мпа від початкового значення. Також для пошуку розгерметизацій може використовуватися галоген, витік якого може визначатися за допомогою спеціального обладнання з місць розгерметизацій.

ДР 1.5.4. Стерилізація обладнання

Для проведення стерилізації інокулятора, посівного апарату та виробничого ферментера до сорочки обладнання подається пара насичена для прогріву до температури в температурних межах близько 80–90°С. Після чого плавно подають пару гостру до самого апарату. До виробничого ферментера (Ф-31), інокулятору (І-17) та посівного апарату (ПА245) пару гостру подають за допомогою барботера, а до внутрішніх елементів збірників/реакторів – через нижній спуск, попередньо відкривши вентелі виходу відпрацьованого в подальшому повітря. При досягненні в апараті і обладнанні температурного значення стерилізації в межах 130-135 °С закривається запірна арматура та проводиться витримка близько 2 год (за тиск близько 0,2 МПа). Також під час цієї стерилізації також і проводиться стерилізація індивідуальні фільтри підготовки аераційного повітря.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря проводять за допомогою шахти забору на висоті приблизно в 10 м. за допомогою повітрозабірника (позначення на апаратурній схемі ПЗ –4). На такій висоті найоптимальніше проводити забір повітря, бо стабільне значення аерозольних і газоподібних частинок і забруднень (газоподібні промислові викиди, квітучі рослини, пил, пух тощо).

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення повітря

Первине очищення повітря проводиться на фільтрах грубого очищення (позначення на апаратурній схемі Ф-5), що дає змогу очистити повітря до

ступеню у Е=80%. На цьому етапі відбувається затримування пилу, різноманітних механічних частинок і залишків та подальша подача до компресору.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Для створення запасу повітря і подальшого безперебійного забезпечення аераційних умов у ферментері, інокуляторі і посівному апараті відбувається стиснення повітря, з допомогою компресора (позначення на апаратурній схемі К-6). Оскільки при накопичені повітря збільшується тиск до значення 0,4 МПа, та температури до значень в межах від 150 до 250^{o}С, це дозволяє знищити велику кількість контамінуючої мікрофлори, що в ньому є.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи

Для виконання цього етапу потрібно провести охолодження до температурних значень в межах від 20 до 25^{o}С у теплообміннику (позначення на апаратурній схемі Т-7) та з подальшим видаленням зайвої вологи, що утворилася, у ресивері (позначення на апаратурній схемі Р-8) до значення приблизно в W = 60 %.

ДР 2.5.Нагрівання повітря

Для недопущення утворення конденсату пари, який негативно може вплинути на виробничий біосинтез та фільтруючі матеріали (такі компоненти головного та індивідуальних фільтрів як волокна), охолоджене повітря у теплообміннику (позначення на апаратурній схемі Т-9) нагрівають до температурних позначень в 30 – 40°С.

ДР 2.6.Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря пропускають через головний фільтр (Ф-10), в якому фільтрувальним матеріалом є мікроскловолокно або подібний матеріал. Ступінь очищення становить Е = 97-98 %.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Останім етапом підготовки аераційного повітря є його фільтрування на індивідуальних фільтрах, які встановлюються перед інокулятором, посівним апарато та виробничим ферментером (позначення на апаратурній схемі Ф-16,

Ф-23, Ф30 відповідно). Ці фільтри повітря дають змогу його очистит до ступеню в Е = 99,998 %.

ДР 3. Приготування титрувальних розчинів

ДР 3.1. Приготування розчинів титрувальних агентів для підкислення поживних середовищ

ДР 3.1.1 Приготування 6% розчину HCl для підкислення поживного середовища в інокуляторі об'ємом 10 л

До колби об'ємом 100 мл відміряють і переносять вносять 25 мл дистильованої води і за постійного перемішування додають 5 мл 36 %-го розчину HCl з подальшим закриттям колби гумовою пробкою. Готовий розчин HCl не стерилізується.

ДР 3.1.2 Приготування 6% розчину HCl для підкислення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 100 л

До колби об'ємом 1500 мл відміряють і переносять 250 мл дистильованої води і за постійного перемішування додають 50 мл 36 %-го розчину HCl з подальшим закритям колби гумовою пробкою. Готовий розчин HCl не стерилізується.

ДР 3.1.3 Приготування 6% розчину HCl для підкислення поживного середовища у виробничому ферментері

До збірника (позначення на апаратурній схемі Р 11) геометричним об'ємом 10 л відміряють і переносять 5000 мл дистильованої води і за постійного перемішування додають 1000 мл 36 %-го розчину HCl. Готовий розчин HCl не стерилізується.

ДР 3.2. Приготування розчинів титрувальних агентів для підлуження поживних середовищ

Розчин NaOH (6%) передбачається використовувати для підвищення pH та контролю значення pH під час культивування (оптимальним значенням pH для культивування продуцентає 5,5).

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6% розчину NaOH

Необхідний об'єм для роботи, л	**Об'єм 6%-го розчину NaOH для нейтралізації, мл**	**Маса кристалічного NaOH, г**	**Об'єм води дистил., мл**	**Тара для приготуван-ня розчину**
30	66	5,4	61	Колба об'ємом 100 мл
3300	6000	360	5640	Збірник об'ємом 20 л

ДР 3.2.1 Приготування 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в інокуляторі об'ємом 5 л та 50 л

До колби об'ємом 100 мл відміряють і переносять 61 мл дистильованої води і за постійного перемішування додають 5.4 г кристалічного натрію гідроксиду (NaOH) з подальшим закриттям колби гумовою пробкою. Готовий розчин NaOH не стерилізується.

ДР 3.2.2 Приготування 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в інокуляторі об'ємом 500 л

До колби об'ємом 1000 мл відміряють і переносять 564 мл дистильованої води і за постійного перемішування додають 36 г кристалічного натрію гідроксиду (NaOH) з подальшим закриттям колби гумовою пробкою. Готовий розчин NaOH не стерилізується.

ДР 3.2.3 Приготування 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у виробничому ферментері

До збірника (позначення на апаратурній схемі Р 12) геометричним об'ємом 10 л відміряють і переносять 5640 мл дистильованої води і за постійного перемішування додають 360 г 36 %-го розчину HCl. Готовий розчин HCl не стерилізується.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Для отримання інокуляту потрібно підготувати 570 мл поживного середовища. Для отримання посівного матеріалу буде використано качалочні колби об'ємом в 750 мл, загальна кількість яка необхідна становить 5 шт. Розподіл компонентів для приготування 570 мл середовища зазначено в табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 570 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у середовищі, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	70	39,9	А	500
Кукурудзяний екстракт	16	9,1		
Дріжджовий екстракт	10	0,57		
Патока	28	16		
KH_2PO_4	2	1,1	Б	30
$MgSO_4$	4	2,2	В	40

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На каліброваних і повірених вагах технічних у попередньо встановлений і відтарований мірний стакан на 100 мл відважують почергово 9,1 г кукурудзяного екстракту, 0,57 г дріжджового екстракту, 16 г патоки та 39,9 г глюкози, потім відважена маса глюкози переноситься у колбу геометричним об'ємом 0,75 л та додається раніше відміряні 300 мл води питної, механічно перемішується та закривають ватно-марлевою пробкою. Процес стерилізації

проводиться у автоклаві за температурного режиму у 112°С під тиском 0,05 МПа протягом 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На каліброваних і повірених вагах технічних у попередньо встановлений і відтарований мірний стакан на 100 мл відважують 1,1 г дигідрофосфату калію, потім відважена маса відважки переноситься до колби геометричним об'ємом 0,1 л та додається раніше відміряні 30 мл води питної, механічно перемішується та закривають ватно-марлевою пробкою. Процес стерилізації проводиться у автоклаві за температурного режиму у 131°С під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На каліброваних і повірених вагах технічних у попередньо встановлений і відтарований мірний стакан на 100 мл відважують 2,2 г сульфату магнію, потім відважена маса відважки переноситься до колби геометричним об'ємом 0,1 л та додається раніше відміряні 40 мл води питної, механічно перемішується та закривають ватно-марлевою пробкою. Процес стерилізації проводиться у автоклаві за температурного режиму у 131°С під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л.

Для накопичення інокуляту культури потрібно приготувати 5,13 л поживного середовища.

Таблиця 6.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5,13 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у середовищі, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	70	359,1	А	5000
Кукурудзяний	16	82,1		

Завершення таблиці 6.3

екстракт				
Дріжджовий екстракт	10	51,3		
Патока	28	143,6		
KH_2PO_4	2	10,3	Б	50
$MgSO_4$	4	20,5	В	80

ДР 4.2.1. Приготування композиції А

На каліброваних і повірених вагах технічних у попередньо встановлений і відтарований мірний стакан на 500 мл відважують відважують 82,1 г кукурудзяного екстракту, 51,3 дріжджового екстракту, 143,6 патоки та 359,1 г глюкози, потім відважена маса глюкози переноситься у реактор (позначення на апаратурній схемі Р-14) геометричним об'ємом 10 л та додається за допомогою об'ємно-вагового дозатора 3000 мл води питної та вмикається механічний перемішуючий пристрій для рівномірного розчинення. Процес стерилізації відбувається за рахунок подачі гострої пари до сорочки реактора (через нижній спуск сорочки). Контроль процесу стерилізації відбувається за допомогою контролю показників манометру та термометру. Стерилізація відбувається протягом 30 хв за температури у 112°С. Після стерилізації проводиться очікування охолодження простерилізованого поживного середовища до оптимального значення температури (приблизно від 25°С до 30°С) та задопомгою насосу відцентрового (позначення на апаратурній схемі Н-15) перекачується до інокулятору (позначення на апаратурній схемі І-17), де в подальшому очікується подача простерилізованих і охолоджених компонентів композицій Б і В з метою подальшого накопичення посівного матеріалу.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На каліброваних і повірених вагах технічних у попередньо встановлений і відтарований мірний стакан на 100 мл відважують 10,3 г дигідрофосфату калію, потім відважена маса відважки переноситься до колби геометричним об'ємом 0,25 л та додається раніше відміряні 50 мл води питної, механічно перемішується та закривають ватно-марлевою пробкою. Процес стерилізації проводиться у автоклаві за температурного режиму у 131°С під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 4.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На каліброваних і повірених вагах технічних у попередньо встановлений і відтарований мірний стакан на 100 мл відважують 20,5 г сульфату магнію, потім відважена маса відважки переноситься до колби геометричним об'ємом 0,5 л та додається раніше відміряні 80 мл води питної, механічно перемішується та закривають ватно-марлевою пробкою. Процес стерилізації проводиться у автоклаві за температурного режиму у 131°С під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л.

Для накопичення посівного матеріалу культури потрібно приготувати 50,9 л поживного середовища.

Таблиця 6.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 50,9 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у середовищі, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	70	3506	А	50
Кукурудзяний екстракт	16	801,5		

Завершення таблиці 6.4

Дріжджовий екстракт	10	501		
Патока	28	1403		
KH_2PO_4	2	100,2	Б	0,35
$MgSO_4$	4	200,4	В	0,55

ДР 4.3.1. Приготування композиції А

На каліброваних і повірених вагах технічних у попередньо встановлену і відтаровану мірну ємність відважують 3506 г глюкози, 801,1 г кукурудзяного екстракту, 501 г дріжджового екстракту та 1403 г патоки, потім відважену масу глюкози переносять до реатора (позначення на апаратурній схемі Р-19) геометричним об'ємом та додається за допомогою об'ємно-вагового дозатора 50 л води питної та вмикається механічний перемішуючий пристрій для рівномірного розчинення. Процес стерилізації відбувається за рахунок подачі гострої пари до сорочки реатора (через нижній спуск сорочки). Контроль процесу стерилізації відбувається за допомогою контролю показників манометру та термометру. Стерилізація відбувається протягом 30 хв за температури у 112°С. Після стерилізації проводиться очікування охолодження простерилізованого поживного середовища до оптимального значення температури (приблизно від 25°С до 30°С) додається простерилізована композиція Б і В та вмикається перемішуючий пристрій для рівномірного розподілу компонентів з композицій. Потім за допомогою насосу відцентрового (позначення на апаратурній схемі Н-20) перекачується до посівного апарату (позначення на апаратурній схемі ПА-22), де в подальшому відбувається накопичення посівного матеріалу. Зважаючи на великий обсяг вуглецевовмісних компонентів (глюкоза, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт, патока) з метою недопущення осмотичного шоку та швидшого процесу адаптації і накопичення біомаси, перед початком накопичення біомаси,

до посівного апарату (позначення на апаратурній схемі ПА-22) буде подано лише 40% поживного середовища, решта середовища буде подано протягом 12 – 14 годин за допомогою дробного внесення.

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На каліброваних і повірених вагах технічних у попередньо встановлений і відтарований мірний стакан на 200 мл відважують 100,2 г дигідрофосфату калію, потім відважена маса відважки переноситься до колби геометричним об'ємом 1000 л та додається раніше відміряні 350 мл води питної, механічно перемішується та закривають ватно-марлевою пробкою. Процес стерилізації проводиться у автоклаві за температурного режиму у 131°С під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 4.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

На каліброваних і повірених вагах технічних у попередньо встановлений і відтарований мірний стакан на 300 мл відважують 200,4 г сульфату магнію, потім відважена маса відважки переноситься до колби геометричним об'ємом 2 л та додається раніше відміряні 550 мл води питної, механічно перемішується та закривають ватно-марлевою пробкою. Процес стерилізації проводиться у автоклаві за температурного режиму у 131°С під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері геометричним об'ємом 1 м^3

Для виробничого біосинтезу потрібно приготувати 513,4 л поживного середовища.

Таблиця 6.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 513,4 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у середовищі, г	Композиція	Об'єм композиції, л

Глюкоза	70	35938	А	500
Кукурудзяний екстракт	16	8214		
Дріжджовий екстракт	10	5134		
Патока	28	14375		
KH_2PO_4	2	1027	Б	5,4
$MgSO_4$	4	2053	В	8

ДР 4.4.1. Приготування композиції А

На каліброваних і повірених вагах технічних у попередньо встановлену і відтаровану мірну ємність відважують 35,94 кг глюкози, 8,214 кг кукурудзяного екстракту, 5,134 кг дріжджового екстракту та 14,38 кг патоки, потім відважену масу глюкози переносять до реактора (позначення на апаратурній схемі Р-26) геометричним об'ємом 1000 л та додається за допомогою об'ємно-вагового дозатора 500 л води питної та вмикається механічний перемішуючий пристрій для рівномірного розчинення. Процес стерилізації відбувається за рахунок подачі гострої пари до сорочки реактора (через нижній спуск сорочки). Контроль процесу стерилізації відбувається за допомогою контролю показників манометру та термометру. Стерилізація відбувається протягом 30 хв за температури у 112°С. Після стерилізації проводиться очікування охолодження простерилізованого поживного середовища до оптимального значення температури (приблизно від 25°С до 30°С) додається простерилізована композиція Б (від ректора позначення на апаратурній схемі Р-24.1) і В (від ректора позначення на апаратурній схемі Р-24) та вмикається перемішуючий пристрій для рівномірного розподілу компонентів з композицій. Потім за допомогою насосу відцентрового (позначення на апаратурній схемі Н-27) перекачується до виробничого ферментера (позначення на апаратурній схемі Фр-29), де в подальшому відбувається виробничий біотсинтез. Зважаючи на великий обсяг вуглецевовмісних компонентів (глюкоза, кукурудзяний екстракт,

дріжджовий екстракт, патока) з метою недопущення осмотичного шоку та швидшого процесу адаптації і накопичення біомаси, перед початком виробничого біосинтезу, до виробничого ферментера (позначення на апаратурній схемі Фр-29) буде подано лише 40% поживного середовища, решта середовища буде подано протягом 12 – 40 годин за допомогою дробного внесення.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На каліброваних і повірених вагах технічних у попередньо встановлену і відтаровану мірну ємність на 2000 мл відважують 1027 г дигідрофосфату калію, потім відважена маса відважки переноситься до реактора геометричним об'ємом 10 л та додається раніше відміряні 5,4 л води питної, механічно перемішується та закривають всі крани і клапани та стерилізують при температурному режимі131°С, під тиском 0,15 МПа протягом 40-60 хв.

ДР 4.4.3. Приготування і стерилізація композиції В

На каліброваних і повірених вагах технічних у попередньо встановлену і відтаровану мірну ємність на 2000 мл відважують 2053 г магнію сульфату, потім відважена маса відважки переноситься до ректора геометричним об'ємом 20 л та додається раніше відміряні 8 л води питної, механічно перемішується та закривають всі крани і клапани та стерилізують при температурному режимі131°С, під тиском 0,15 МПа протягом 40-60 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури Saccharomyces cerevisiae GE-2

Передбачається, що *Saccharomyces cerevisiae* GE-2, як музейна культура, буде зберігатися у пробірках зі скошеним агаром на основі середовища YPD за температури 3 - 4ºС у холодильному обладнанні. За таких параметрів температурного режиму, складу середовища зберігання для контролю чистоти культури, кожні 2 - 3 місяці необхідно проводити. Всі роботи з музейною культурою проводяться в асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Музейну (колекційну) культуру, яка зберігалася в пробірках, розсівають мікробіологічною петлею для отримання ізольованих колоній на чашках Петрі із агаром на основі середовища YPD та вирощують при температурі 29,5±0,5°С протягом 48 год.

ТП 5.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отриманні ізольовані колоні з попередньої стадії перевіряються на чистоту, накопичують, проводять контроль накопичених колоній, які і будуть використовуватися для накопичення посівного матеріалу потім.

ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках

На цій стадії підготовлені і простерилізовані компоненти поживного середовища (композиції А, Б, В та Г) з етапів ДР 4.1.1, ДР 4.1.2, ДР 4.1.3 та ДР 4.1.4 в асептичних умовах змішуються в одній колбі та в асептичних умовах розливаються в п’ять качалочних колб геометричним об’ємом 750 мл у кількості 115 мл у кожну.

Також до чашок Петрі, де накопичені колоній *Saccharomyces cerevisiae* GE-2, на поверхню агаризованого середовища додають приблизно 5 мл фізіологічного розчину, суспендують (змивають) клітини накопиченої культури, а потім за допомогою піпетки переносять дріжджову суспензію до колб з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують дріжджову суспензію клітин, одержаної з однієї пробірки., що накопичено було на одній чашці Петрі. Культивування проходить за таких параметрів як частота обертання колб у 200 об/хв, температура становить 29,5±0,5°С протягом 24 год. Накопичена таким чином культура буде використовуватися як посівний матеріал для засіву інокулятору (позначення на апаратурній схемі І-17).

ТП 5.5. Вирощування культури в інокуляторі об’ємом 10 л

До реактору (позначення на апаратурній схемі Р-14), де знаходиться простерилізована і охолоджена композиція А (етап ДР 4.2.1), в асептичних умовах додаються композиції Б і В (етапи ДР 4.2.2 і ДР 4.2.3 відповідно). Потім вмикається перемішуючий пристрій для рівномірного розподілу композицій в

об’ємі. Після розподілу компонентів до інокулятору об’ємом 10 л (позначення на апаратурній схемі І-17) перекачується 40% поживного середовища (це викликано тим, що у випадку подачі всього об’єму вуглецевовмісних компонентів, у клітини може виникнути осмотичний шок, що в майбутньому погрішить процес накопичення посівного матеріалу). Для створення оптимального значення і подальшого його контролю рівня pH до інокулятору (позначення на апаратурній схемі І-17) додається 6-% розчин соляної кислоти (етап ДР 3.1.1) та 6-% розчин натрію гідроксиду (етап ДР 3.2.1) для контролю параметру pH. Контроль значення рівня pH проводиться за допомогою вмонтованого датчика pH у самому інокуляторі Після створення всіх необхідних оптимальних параметрів для культивування вноситься посівний матеріал із засівної колби (від етапу ТП 5.4), дотримуючись правил асептики, за допомогою засівного апарату. Культивування проходить за таких параметрів як частота обертання перемішуючого пристрою у 200 об/хв, температура культивування повинна становити 29,5±0,5°С протягом 24 год культивування. Накопичена таким чином культура буде використовуватися як посівний матеріал для засіву посівного апарату (позначення на апаратурній схемі ПА-22). Також при культивуванні у інокуляторі через барботер необхідно подавати підготовлене аераційне стерильне повітря для аерації.

ТП 5.6. Вирощування культури в посівному апараті об’ємом 100 л

До реактору (позначення на апаратурній схемі Р-19), де знаходиться простерилізована і охолоджена композиція А (етап ДР 4.3.1), в асептичних умовах додаються композиції Б і В (етапи ДР 4.3.2 і ДР 4.3.3 відповідно). Потім вмикається перемішуючий пристрій для рівномірного розподілу композицій в об’ємі. До посівного апарату об’ємом 100 л (позначення на апаратурній схемі ПА-22), з ректору (позначення на апаратурній схемі Р-19) перекачується простерилізована і охолоджена композиція А (етап ДР 4.3.1), Б (етап ДР 4.3.2) та В (етап ДР 4.3.3) за допомогою насосу відцентрового (позначення на апаратурній схемі Н-20) у кількості 40% поживного середовища (це викликано тим, що у випадку подачі всього об’єму вуглецевовмісних компонентів, у

клітини може виникнути осмотичний шок, що в майбутньому погрішить процес накопичення посівного матеріалу). Для створення оптимального значення і подальшого його контролю рівня pH до посівного апарату (позначення на апаратурній схемі ПА-22) додається 6-% розчин соляної кислоти (етап ДР 3.1.2) та 6-% розчин натрію гідроксиду (етап ДР 3.2.2) для контролю параметру pH. Контроль значення рівня pH проводиться за допомогою вмонтованого датчика pH у самому посівному апараті. Після створення всіх необхідних оптимальних параметрів для культивування посівний матеріал, який було накопичено на попередній стадії (від етапу ТП 5.5), за допомогою відцентрового насосу (позначення на апаратурній схемі Н-18) перекачується до посівного апарату Культивування проходить за таких параметрів як частота обертання перемішуючого пристрою у 200 об/хв, температура культивування повинна становити 29,5±0,5°С протягом 24 год культивування. Накопичена таким чином культура буде використовуватися як посівний матеріал для засіву виробничого ферментера (позначення на апаратурній схемі Фр-29). Також при культивуванні у посівному апараті через барботер необхідно подавати підготовлене аераційне стерильне повітря для аерації.

ТП 6. Виробниче культивування

ТП 6.1. Виробниче культивування у ферментері геометричним об'ємом 1м^3

Виробниче культивування *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 проводиться у ферментері геометричним об'ємом 1 м^3. До реактору (позначення на апаратурній схемі Р-26), де знаходиться простерилізована і охолоджена композиція А (етап ДР 4.4.1), в асептичних умовах додаються композиції Б і В (етапи ДР 4.4.2 і ДР 4.4.3 відповідно) з реакторів (позначення на апаратурній схемі Р-24.1 та Р-24 відповідно) за допомогою насосів відцентрових. Потім вмикається перемішуючий пристрій для рівномірного розподілу композицій в об'ємі.

До виробничого ферментеру об’ємом 1000 л (позначення на апаратурній схемі Фр-29), з ректору (позначення на апаратурній схемі Р-26) перекачується простерилізована і охолоджена суміш композицій А (етап ДР 4.4.1), Б (етап ДР 4.4.2) та В (етап ДР 4.4.3) за допомогою насосу відцентрового (позначення на апаратурній схемі Н-27) у кількості 40% поживного середовища (це викликано тим, що у випадку подачі всього об’єму вуглецевовмісних компонентів, у клітини може виникнути осмотичний шок, що в майбутньому погрішить процес накопичення посівного матеріалу). Виробниче культивування буде проходити за таких параметрів як частота обертання перемішуючого пристрою у 300 об/хв, температура культивування повинна становити 29,5±0,5°С протягом 48 год культивування. Також при культивуванні у посівному апараті через барботер необхідно подавати підготовлене аераційне стерильне повітря для аерації. Виробничий біосинтез буде припинятися при досягненні концентрації ергостерину у культуральній рідині 1,51 г/л.

Після закінчення виробничого культивування, отриману культуральну рідину буде перекачано до збірника зберігання культуральної рідини (позначення на апаратурній схемі З-31) для тимчасового зберігання для надходження на подальші етапи виділення і очищення.

РОЗДІЛ 7.
КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Карта постадійного контролю під час виробництва

Таблиця 7.1.

Номер точки контролю; назва стадії	Об'єкт контролю та показник контролю	Спосіб контролю	Частота контролю та порядок забору проб	Показники, що визначається
1	2	3	4	5
Кт,Кх-1.3.1. Приготування робочого розчину кальцинованої соди	Концентрація розчину	Визначення концентрації, температура розчину	Після приготування розчину.	С=2%,
Кт,Кх-1.3.2. Приготування робочого розчину Соліклору	Концентрація розчину	Визначення концентрації, температура розчину	Після приготування розчину.	С=0,2%
Кт,Кх-1.3.3. Приготування робочого розчину Гуасепт	Концентрація розчину	Визначення концентрації, температура розчину	Після приготування розчину.	С=0,2%
Кт,Км-1.4.1. Щоденне прибирання приміщення	Чистота прміщення, мікробна чистота	Визначення КУО, візуальний огляд	Після прибирання	КУО<800/м^2
Кт,Км-1.4.2. Генеральне прибирання приміщення	Чистота прміщення, мікробна чистота	Визначення КУО, візуальний огляд	Після прибирання	КУО<300/м^2
Кт-1.5.1, Миття та ополіскування обладнання	Чистота обладнання, час миття розчину.	Годинник, візуальний огляд	При і після проведення обробки	τ = 60 – 120 хв

Продовження табл.7.1.

1	2	3	4	5
Кт-1.5.3. Перевірка обладнання на герметичність	Герметичність обладнання, час, використовуваний тиск.	Манометр технічний, годинник, візуальний огляд	Тиск визначаються під час перевірки	Р=0,5 – 0,7 МПа, τ=30-60хв.
Кт,Км-1.4.5. Стерилізація	Стерилізації вузлів обладнання, апаратів і агрегатів, тиск, час, температура, мікробна чистота.	Термометр, годинник, манометр, мікробіологічний метод	Температура, тиск перевіряється під час стерилізації. МБ аналіз після процесу.	т=130 – 135°С, Р=0,2МПа. τ=120хв. відсутність мікробіоти
Кт-2.2. Попереднє грубе очищення повітря	Ступінь чистоти повітря після фільтрування, перепад тисків	Манометр. Перевірка ступеня очистки	При очищені повітря у фільтрі	Е = 80 %.
Кт-2.3. Стиснення повітря	Температура, тиск.	Термометр, манометр	При компресуванні повітря	Р = 0,35-0,4 МПа, t = 150 - 250^{0}С,
Кт-2.4. Охолодження повітря та видалення зайвої аологи	Температура, волога	Термометр вологомір	При охолодженні та видаленню вологи	t= 20 – 24ºС W= 60%.
Кт-2.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Ступінь чистоти повітря, перепад тисків.	Перевірка ступеню очистки, манометр.	При очищені повітря у фільтрі	Е = 97 – 98%.
Кт-2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Ступінь чистоти повітря, перепад тисків.	Перевірка ступеню очистки, манометр.	При очищені повітря у фільтрі	Е = 99,998%.
Кт-3.1.1., 3.1.2, 3.1.3. Приготування 6% розчину HCl для підкислення ПС в інокуляторі	Концентрація розчину	Хімічний метод	Концентрація розчину після приготування.	С= 6%,
Кт-3.2.1., 3.2.2, 3.2.3. Приготування 6% розчину NaOH для підкислення ПС в інокуляторі	Концентрація розчину	Хімічний метод	Концентрація розчину після приготування.	С= 6%,

Продовження табл.7.1.

1	2	3	4	5
Км,Кт-4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=112˚С, τ = 30хв, Р = 0,05 МПа. Відсутність мікробіоти.
Км,Кт-4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=112˚С, τ = 30хв, Р = 0,05 МПа. Відсутність мікробіоти.
Км,Кт-4.1.3. Приготування і стерилізація композиції В	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=131˚С, τ = 40хв, Р = 0,15 МПа. Відсутність мікробіоти.
Км,Кт-4.1.4. Приготування і стерилізація композиції В	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=131˚С, τ = 40хв, Р = 0,15 МПа. Відсутність мікробіоти.
Км,Кт-4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=112˚С, τ = 30хв, Р = 0,05 МПа. Відсутність мікробіоти.
Км,Кт-4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=112˚С, τ = 30хв, Р = 0,05 МПа. Відсутність мікробіоти.

Продовження табл.7.1.

1	2	3	4	5
Км,Кт-4.2.3. Приготування і стерилізація композиції В	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=131˚С, τ = 40хв, Р = 0,15 МПа. Відсутність мікробіоти.
Км,Кт-4.2.4. Приготування і стерилізація композиції В	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=131˚С, τ = 40хв, Р = 0,15 МПа. Відсутність мікробіоти.
Км,Кт-4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=112˚С, τ = 30хв, Р = 0,05 МПа. Відсутність мікробіоти.
Км,Кт-4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=112˚С, τ = 30хв, Р = 0,05 МПа. Відсутність мікробіоти.
Км,Кт-4.3.3. Приготування і стерилізація композиції В	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=131˚С, τ = 40хв, Р = 0,15 МПа. Відсутність мікробіоти.
Км,Кт-4.3.4. Приготування і стерилізація композиції В	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=131˚С, τ = 40хв, Р = 0,15 МПа. Відсутність мікробіоти.

Продовження табл.7.1.

1	2	3	4	5
Км,Кт-4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=112˚С, τ = 30хв, Р = 0,05 МПа. Відсутність мікробіоти.
Км,Кт-4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=112˚С, τ = 30хв, Р = 0,05 МПа. Відсутність мікробіоти.
Км,Кт-4.4.3. Приготування і стерилізація композиції В	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=131˚С, τ = 40хв, Р = 0,15 МПа. Відсутність мікробіоти.
Км,Кт-4.4.4. Приготування і стерилізація композиції В	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, технічні ваги, мікробіологічний контроль.	Температура контролюється при стерилізації. Мікробіологічний контроль проводиться опісля стерилізації.	t=131˚С, τ = 40хв, Р = 0,15 МПа. Відсутність мікробіоти.
Км,Кт-5.1. Підтримка колекційної культури *Saccharomyces cerevisiae* GE-2	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.	Температура і час контролюється протягом всього часу зберігання. Мікробіологічний контроль повинен підтверджувати відсутність контамінації	t=3 – 4˚С, Т = 2 – 3 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти.
Км,Кт-5.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.	Температура і час контролюється під час одержання робочої культури. Мікробіологічний контроль повинен підтверджувати відсутність	t=29,5±0,5˚С, Т = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти.

Продовження табл.7.1.

1	2	3	4	5
			контамінації	
Км,Кт-5.3. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах	Температура, час, мікробна контамінація.	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.	Температура і час контролюється під час одержання робочої культури. Мікробіологічний контроль повинен підтверджувати відсутність контамінації	t=29,5±0,5˚С, Т = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти.
Км,Кт-5.4. Вирощування культури в колбах на качалках.	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури.	Термометр, годинник, мікробіологічний метод.	Температра, час, швидкість перемішування при культивуванні, процесу, Мікробіологічний контроль повинен підтверджувати відсутність контамінації	t=29,5±0,5˚С, Т = 24 год, w=180 об/хв. відсутність сторонньої мікробіоти
Км,Кт, Кх-5.5. Вирощування культури в інокуляторі об’ємом 10л	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, аерація, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури.	Термометр, годинник, pH-метр, мікробіологічний метод.	Температра, час, швидкість перемішування при культивуванні, процесу, Мікробіологічний контроль повинен підтверджувати відсутність контамінації	t=29,5±0,5˚С, Т = 24 год, w=200 об/хв., pH – 5,5 відсутність сторонньої мікробіоти
Км,Кт,Кх-5.4. Вирощування культури в посівному апараті	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, аерація, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури.	Термометр, годинник, pH-метр, мікробіологічний метод.	Температра, час, швидкість перемішування при культивуванні, процесу, Мікробіологічний контроль повинен підтверджувати відсутність контамінації	t=29,5±0,5˚С, Т = 24 год, w=200 об/хв., pH – 5,5 відсутність сторонньої мікробіоти
Км,Кт,Кх-6.1. Виробниче культивування у ферментері геометричним об’ємом 1м^3	Культуральна рідина, температура, значення pH, тривалість культивування,	Термометр, годинник pH-метр, хімічний спосіб визначення кількості,	Під час вирощування культури у ферментері. Відбір проби культуральної	t=29,5±0,5˚С, Т = 48 год, w=200 об/хв., pH – 5,5, відсутність сторонньої

Закінчення табл.7.1.

1	2	3	4	5
	аерація, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури, концентрація цільового продукту	мікробіологічний метод.	рідини відбувається кожні 4-6 год.	мікробіоти, концентрація ергостерину – 1,51 г/л

7.2. Мікробіологічний контроль

Основним методом перевірки і підтримання мікробіологічної чистоти є постійне проводження мікробіологічного контролю – при культивуванні *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 з метою накопичення посівного матеріалу на всіх стадіях, або при проведенні вже остаточного виробничого культивування повинен визначатися і ідентифіковуватися лише клітини *Saccharomyces cerevisiae* GE-2. У випадку контролю чистоти музейної культури також повинна виявлятися лише культура *Saccharomyces cerevisiae* GE-2. При проведенні мікробіологічного контролю стерильності обладнання, апаратури і комунікацій при проведенні мікробіологічного контролю не в\пвинно виявлятися жодної клітини бактерій, грибів та дріжджів [46,49].

З цією метою проводиться відбір проб і зразків з подальшим висівом на чашки Петрі з різним середовищем: для визначення бактеріального забруднення використовується – м'ясо-пептонний агар, для визначення грибів і дріжджів – сусло-агар або ж глюкозо-картопляний агар. Посів повинен проводитися відповідно до всіх правил асептики.

Зразки з пробірок де міститься музейна культура (відбір проводиться за допомогою мікробіологічної петлі), або накопичений посівний матеріал зі стадій накопичення посівного матеріалу і при виробничому культивуванні (відбір проводиться за допомогою пробовідбірник, що вмонтовані у обладнання) після відбору повинні рівномірно розподілятися по всій поверхні чашок Петрі з відповідним поживним середовищем та встановлюють до термостатів на відповідний температурний режим раніше зазначений на відповідний час термостатування: для бактерій - 37°С протягом 48 год., для грибів і дріжджів - 30°С протягом 48 – 72 год.

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу (при підготовці) та при проведенні виробничого культивування проводять зазвичай у інтервалі 4-8 годин [46-49].

7.3. Визначення концентрації біомаси

При проведенні виробничого культивування одним з методів контролю є визначення не лише мікробіологічної чистоти, але й також концентрації накопиченої біомаси. Це дає змогу визначити динаміку росту та процесу засвоєння поживного середовища під час культивування. Концентрацію накопиченої біомаси зазвичай визначають або за оптичною густиною клітинної суспензії з подальшим перерахунком перерахунком на суху біомасу за калібрувальним графіком або за методом абсолютного висушування до сталої маси. При проведенні культивування для отримання ергостерину доцільним буде використання методу визначення оптичної густини. Для цього до пробірки з дистильованою водою об'ємом 9 мл додається 1 мл культуральної рідини та перемішується отриманий зразок. Отриманий зразок в подальшому у відповідній кількості наливається до кювети та встановлюється до фотоелектроколориметра (ФЕК) і проводиться вимірювання за оптичної густини у 590 нм [46,49].

7.4. Визначення концентрації вуглецю

Основним джерело вуглецю у поживному середовищі при культивуванні *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 для отримання ергостерину є глюкоза. Для визначення залишкової концентрації глюкози пропонується використовувати методику високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Методика базується на визначенні змін площі відповідного піку глюкози на хроматографічній пластині, яка у свою чергу залежить від концентрації самої глюкози [51].

Підготовка зразку для хроматографічного дослідження передбачає відбір культуральної рідини, потім перенесення до центрифужних пробірок та подальшого центрифугування. Зазвичай об'єм проби для однієї такої пробірки становить близько 10 мл (для різних методик та досліджуваних зразків об'єм проби може бути різним). Проба культуральної рідини при подібній методиці буде центрифугуватися близько 15 хв на швидкості 8000 – 9000 об/хв.

Отриманий супернатант в подальшому і використовують для дослідження залишку глюкози.

1 мл супернатанту відбирають і переносять до пробірки об’ємом 10 мл, додається 1 мл робочого розчину рухомої фази та перемішують до повного розчинення компонентів у всьому об’ємі для отримання робочої суміші для дослідження. Потім відбирається приблизно 5-10 мкл робочої суміші для дослідження та переносимо до колонки ВЕРХ за температури у 40-50°С при детекції у 410 нм. Розчином рухомої фази передбачається буде 0,05М сірчана кислота із швидкістю потоку приблизно 0,7мл/хв. Отриманні дані потім використовуються для побудови калібрувального графіку. Зважаючи на роботу із сірчаною кислотою персонал повинен неухильно дотримуватися техніки безпеки, охорони праці та протипожежних заходів.

Визначення залишку патоки як джерела вуглецю за Бертраном

Суть: вуглеводи з вільними альдегідними та/або кетонними групами, у процесі кип`ятіння відновлюють лужні розчини міді до закису, що вираховується об’ємним методом [21].

Техніка визначення:

Приблизно 1 мл культуральної рідини відбирають, переносять відібрану пробу до пробірки та додають робочий розчин 2 н. соляної кислоти у об’ємі 1 мл. Після додавання соляної кислоти і перемішування, пробірки нагрівають протягом 10-15 хв за температури 70°С. Після проведення гідролізу, отриману суміш переливають до колби Ерленмейєра, додають 9 мл води дистильованої, потім додають робочі розчини Фелінг 1 і Фелінг 2, об`ємом 10 мл. Після додавання всіх компонентів і перемішування, протягом 3 хв проводиться кип’ятіння з подільшим різким охолодженням. Після охолодження додають 2 г йодистого калію та 15 мл 20%-го робочого розчину сірчаної кислоти та одразу розпочинають титрування йодом. 1 %-й розчин крохмалю – індикатор, який вносять до колби. Титрування завершують коли зникає синє забарвлення та за знебарвленням розчину.

7.5. Визначення концентрації азоту

При проведенні накопичення посівного матеріалу і проведенні виробничого культивування *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 у поживному середовищі основним джерелом амінного азоту є кукурудзяний екстракт. Для дослідження наявності амінного азоту можуть використовуватися такі методи як мідний, Бредфорда та інші. Пропонується використовувати мідний спосіб визначення [49]. Цей спосіб полягає в тому, що при взаємодії амінокислот і міді утворюється розчинний комплекс з подальшим йодометричним титруванням утвореного з'єднання.

Підготовка зразку передбачає відбір культуральної рідини, потім перенесення до центрифужних пробірок та подальшого центрифугування. Зазвичай об'єм проби для однієї такої пробірки становить близько 10 мл (для різних методик та досліджуваних зразків об'єм проби може бути різним). Проба культуральної рідини при подібній методиці буде центрифугуватися близько 15 хв на швидкості 8000 – 9000 об/хв. Отриманий супернатант в подальшому і використовують для дослідження залишку амінного азоту.

Відбувається додача до досліджуваного зразку ортофосфату міді $Cu_3(PO_4)_2$, що призводить до утворення мідних з'єднань. Потім проводиться фільтрування (для видалення залишків ортофосфату міді, який не вступив у реакцію), додавання до фільтрату оцтової кислоти для перетворення в ацетат міді [23]. Титрування йоду, який вивільняється, проходить за допомогою розчину тіосульфату натрію за концентрації 0,01 моль/дм^3. По завершенню титрування додається кілька краплин крохмального розчину. Завершення титрування відбувається, коли зникає синюватий відтінок забарвлення після однієї краплини тіосульфату натрію [49].

7.6. Визначення концентрації цільового продукту

Для визначення концентрації синтезованого ергостерину пропонується використовувати методику високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [51].

Підготовка зразку для хроматографічного дослідження передбачає відбір культуральної рідини, потім перенесення до центрифужних пробірок та подальшого центрифугування. Зазвичай об’єм проби для однієї такої пробірки становить близько 10 мл (для різних методик та досліджуваних зразків об’єм проби може бути різним). Проба культуральної рідини при подібній методиці буде центрифугуватися близько 15 хв на швидкості 8000 – 9000 об/хв. Отриманий супернатант в подальшому і використовують для дослідження кількості синтезованого ергостерину.

1 мл супернатанту відбирають і переносять до пробірки об’ємом 10 мл, додається 1 мл робочого розчину рухомої фази та перемішують до повного розчинення компонентів у всьому об’ємі для отримання робочої суміші для дослідження. Потім відбирається приблизно 5-10 мкл робочої суміші для дослідження та переносимо до колонки ВЕРХ за температури у 40-50°С при детекції у 410 нм. Розчином рухомої фази передбачається буде 0,05М сірчана кислота із швидкістю потоку приблизно 0,7мл/хв. Отриманні дані потім використовуються для побудови калібрувального графіку. Зважаючи на роботу із сірчаною кислотою персонал повинен неухильно дотримуватися техніки безпеки, охорони праці та протипожежних заходів.

РОЗДІЛ 8.
ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

8.1. Аналіз технологічної схеми отримання цільового продукту на наявність емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Представлена технологія культивування *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 для отримання ергостерину передбачає як наявність ділянок доферментаційних процесів:

- санітарна підготовка виробництва,
- начання персоналу,
- приготування поживного середовища з подальшою стерилізацію для отримання посівного матеріалу і остаточного виробничого культивування,
- підготовка аераційного повітря,

так і ферментаційних процесів:

- накопичення посівного матеріалу,
- виробниче культивування для подальшого отримання ергостерину.

Санітарна підготовка виробництва.

На цьому етапі виробництва приміщення, які будуть залучені до виробництва будуть проходити щодене миття і прибирання: обладнання за допомогою робочого розчину кальцинованої соди, обладнання, апаратура і комунікації за допомогою миючо-дезінфікуючих засобів Соліклор та Гуасепт.

Використанні робочі розчини після виконання будуть виливатися до каналізаційних каналів відходів. При приготуванні робочих засобів миючих і дезінфікуючих засобів з`являються тверді відходи у вигляді елементів пакування та сипкі, як залишок вихідних речовин для приготування робочих розчинів. Даний етап є досить тривалим у процесі.

Приготування титрувальних розчинів

Одним з етапів підготовки до належного культивування *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 для подальшого отримання ергостерину є підготовка титрувальних агентів. Передбачається приготування з наступним використанням 6-% розчину соляної кислоти та 6-% розчину гідроксиду натрію. Ці розчини будуть використовуватися при накопиченні посівного матеріалу при культивуванні в інокуляторі, при накопиченні посівного матеріалу при культивуванні в посівному апараті та при виробничому культивуванні у виробничому ферментері, оскільки оптимумом значення pH при культивуванні є 5,5.

На цьому етапі відходи рідко подібного вигляду з`являються лише при не відповідності підготовлених титрувальних розчинів нормативним показникам та вимогам асептики.

Відважування компонентів для приготування та подальшої стерилізації поживного середовища з метою накопичення посівного матеріалу і подальшого виробничого біосинтезу.

Стадія передбачає вхідний контроль сировини, яка повинна відповідати вимогам якості та нормативно документів і актів. У випадку не відповідності регламентованим показникам повинен бути складений відповідний акт про не відповідність, відбракування та подальша утилізація відповідно до вимог законодавства України.

При проведенні відважування і просіювання (за необхідності) всіх компонентів поживного середовища перед приготуванням і подальшою стерилізацією, можуть утворюватися відходи у вигляді порошку (просипання під час транспортування, або накопичуватися у важкодоступних місцях тари котра використовується), пакувальних матеріалів різного типу (тара паперова, тара поліетиленова, тара мішковитої тканини, тощо).

При проведенні розчинення і стерилізації можливе утворення сипких відходів (просипання), рідких відходів (проливання води при приготуванні

розчинів для стерилізації, проливання під час змішування композицій поживного середовища, тощо).

Підготовка посівного матеріалу.

При зберіганні музейної культури *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 під час проведення відбору зразка, контролю культури або пересіву культури на свіже поживне середовище можливе утворення твердих відходів (застаріле агаризоване поживне середовище, розбиття пробірок для зберігання музейної культури, тощо).

Під час накопичення посівного матеріалу, яке відбувається у інокуляторі та посівному апараті, можливе утворення рідких відходів (не дотримання правил асептичного додавання посівного матеріалу до інокулятора, що може призвести до контамінації поживного середовища з подальшою неможливістю культивування; наявність залишків культуральної рідини після накопичення посівного матеріалу) та газоподібних відходів (культура *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 є аеробом, тому постійно вимагає подачі підготовленого стерильного аераційного повітря, яке після проходження через об'єм культуральної рідини через вихлопний колектор вивільняється як відпрацьоване повітря).

Виробничий біосинтез.

Під час виробничого біосинтезу, який відбувається у виробничому ферментері, можливе утворення рідких відходів (не дотримання правил асептичного додавання посівного матеріалу до інокулятора, що може призвести до контамінації поживного середовища з подальшою неможливістю культивування; наявність залишків культуральної рідини після накопичення посівного матеріалу) та газоподібних відходів (культура *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 є аеробом, тому постійно вимагає подачі підготовленого стерильного аераційного повітря, яке після проходження через об'єм

культуральної рідини через вихлопний колектор вивільняється як відпрацьоване повітря).

8.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

З метою екологізації виробництва і знешкодження рідких відходів, що утворюються, пропонується використовувати біологічне очищення за допомогою мембраних біореакторів. Мембранні біореактори є гібридними установками, що складаються з реактора (наприклад, метантенку) та мембраних модулів, які між собою об`єднанні.

Принцип роботи: до реактора, з активним мулом, подаються механічно очищенні відходи, потім суміш ділиться на очищену воду і активний мул за рахунок фільтрації на мембранах (мікро- і ультрафільтрація). Пермеат (осад) надходить на остаточну утилізацію, активний мул повторно надходить до реактора. Зазвичай процес проходить в безнапірних установках.

У випадку якщо після фільтрації залишається певна частинка пермеату, то він має надзвичайно малу кількість мікроорганізмів, ферментів, тощо. [52].

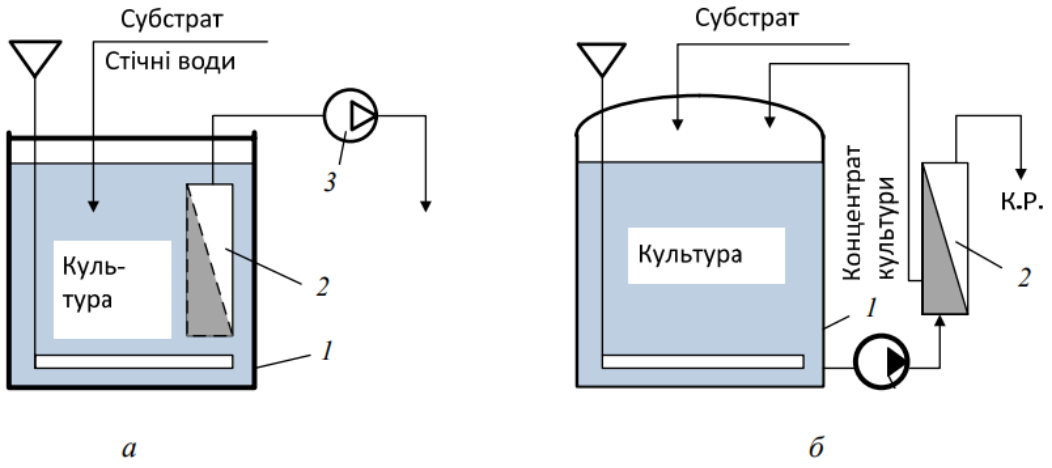


Рис. 8.1. Принципова схема роботи мембранного біореактора: а — із зануреними мембранними модулями; б — з виносними мембранними модулями; 1 — біореактор; 2 — мембранний модуль; 3 — вакуумний рідинний насос; об’ємний рідинний насос

8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Для удосконалення процесу утилізації твердих відходів, всі вони проходять етап сортування на такі основні як:

- папір і картон,
- полімер,
- плстик,
- плівка,
- полівінілхлорид,
- скло,
- метал.

Після того як відходи розсортовано та накопичено у достатньому об’ємі, вони відправляються на пункти прийому сировини до компаній, з якими заключено договір на утилізацію відходів.

У випадку отримання твердо подібних відходів, що містять залишки мікроорганізмів (наприклад, після фільтрування), доцільно їх перевірити на біологічну безпеку. Якщо загроза не виявлена, їх доцільно використати як добриво для сільськогосподарської галузі. В такому випадку потрібно фільтрат обробити захисним середовищем з меляси і тіосечовини, змішати з певним наповнювачем (наприклад, торфом), провести фасування для подальшої доставки до угідь. [53].

8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Для очищення відпрацьованого аераційного повітря після інокулятора, посівного апарату і виробничого ферментера від залишків культури *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 пропонується використовувати іонообмінні апарати. Очищення в них відбувається за рахунок проходження газу через шар іонітів – високомолекулярних сполук, що мають вуглеводні радикали з фіксованими на ній катіоно- або аніонообмінними групами. Для довготривалої

роботи установки потрібно іоніти періодично промивати водою для регенерації структури.

Найчастіше з такою метою використовують іонітові фільтри з вертикальним закріпленням рам іонітовими волокнами у відповідних конструкціях фільтрів. Частина полотен фільтра працює з метою поглинання забруднюючих елементів відпрацьованих газів, а частина виконує регенераційну функцію.

Подібні іонітові фільтри і іонообмінні апарати вцілому дають змогу провести очищення відпрацьованих газоподібних відходів від аерозолів, газів, парів з ефективністю приблизно до 98 % [54].

Рис. 8.2. Іонообмінний апарат з псевдозрідженим шаром іоніту

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Паньків І.В. Вітамін D: нові аспекти застосування, ефективні дози. Сучасний стан проблеми // International Journal of Endocrinology. - 2021. - 17(1):38-42; doi: 10.22141/2224-0721.17.1.2021.226430 .
2. Що таке вітамін Д. Добова норма вітаміну Д. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://medialt.clinic/blog/diagnostyka/shcho-take-vitamin-d-dobova-norma-vitaminu-d
3. Вітамін Д у ендокринології. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://amnu.gov.ua/vitamin-d-v-endokrynologiyi-mozhna-polegshyty-perebig-zahvoryuvannya-a-inkoly-j-unyknuty-jogo-rozvytku/
4. Вітамін Д. Ознаки дефіциту та наслідки передозування. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://credoclinic.com.ua/blog/vitamin-d-oznaki-deficitu-ta-naslidki-peredozuvannya
5. Дефіцит вітаміну Д: причини, симптоми, діагности та лікування. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://nikolab.com.ua/uk/deficzit-vitamina-d-prichiny-simptmy-diagnostika-i-lechenie/
6. Терапія: Дефіцит і надлишок вітаміну Д та вплив на COVID-19. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://rishon.com.ua/uk/terapiya-kh/deficit-i-izbytok-vitamina-d-i-vliyanie-na-sovid-19
7. Буценко Л.М., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: навчальний посібник. - К.: НУХТ, 2009. - 407 с.
8. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: підручник, 2-е вид., доп. і перероб. / Т.П. Пирог. – К. :НУХТ, 2010. – 632 с.
9. Стасенко Т. Вітамін D в педіатрії: міфи та реалії сьогодення // Всеукраїнська медична газета “Ваше здоров’я”. - 2021. - № 6. - с. 14.
10. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: підручник. - К.: НУХТ, 2009. - 336 с.
11. *Fei Shang*, *Zheng Wang*, *Tianwei Tan* High-cell-density cultivation for co-production of ergosterol and reduced glutathione by Saccharomyces

cerevisiae//Appl Microbiol Biotechnol. – 2007. – N. 6 (77). – P.1233-1240 DOI: 10.1007/s00253-007-1272-6

12. Ергокальциферол розчин олійний. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://tabletki.ua/uk/%D0%AD%D1%80%D0%B3%D0%BE%D0%BA%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D1%86%D0%B8%D1%84%D0%B5%D1%80%D0%BE%D0%BB/14573/
13. *Sun F., Yuan Q., Vriesekoop F.* [et al] Effect of two ergosterol biosynthesis inhibitors on lycopene production by Blakeslea trispora // Process Biochem – 2007. – Vol. 42. – N. 1. – P. 1460–1464.
14. *Shang F., Wen S., Wang X.* [et al] Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biosci. Bioeng. – 2006. – Vol. 101. – N. 1. – P. 38–41.
15. *Tan F., Zhang S., Gao X.,* Ergosterol production by fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* // Enzyme Microb. Technol. – 2003. – N. 33. – P. 366–370.
16. *F. Shang et al*. Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of Saccharomyces cerevisiae // Fei Shang, Shaohong Wen, Xi Wang, Tianwei Tan / Journal of Biotechnology. No 122. – 2006, P. 285–292.
17. *Mortimer RK*, et al. Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. – 1992. – № 8 (10). – P. 817–902
18. *KEGG PATHWAY:* Steroid biosynthesis - *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast). [Електронний ресурс]. – Режим доступу до інформації: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?sce00100.– KEGG.
19. Статистичні дані системи МОЗ України. [Електронний ресурс] – режим доступу: http://medstat.gov.ua/ukr/statdanMMXIX.html
20. Моніторинг і статистика Центру громадського здоров'я України. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://phc.org.ua/monitoring-i-statistika

21. Центр громадського здоров'я України. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.phc.org.ua/news/mayzhe-15-mln-lyudey-v-ukraini-zhive-iz-psoriazom
22. Біореактор (ферментер) фірми «Yocell Biotechnology (Qingdao) Co., LTD» (Китай). [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.yocellbio.com/344.html
23. Гвинтовий компресор Лідер 10EN-500Д 10 бар з осушувачем повітря (Україна). [Електронний ресурс] – режим доступу: https://tusk.ua/ua/product/vintovoj-kompressor-lider-10en-500d/
24. Панельні повітряні фільтри для грубого очищення. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://shop.alterair.ua/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry-gruboy-ochistki-g1-g4/
25. Кишеньковий повітряний фільтр тонкого очищення F5-F9. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://shop.alterair.ua/product/pocket-filter-f-class
26. Кишеньковий повітряний фільтр середньої очистки M5-M9. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://shop.alterair.ua/product/pocket-filter-m-class/
27. Кальцинована сода. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://chemsale.com.ua/ua/product/soda-kalczinirovannaya/
28. Кальцинована сода. [Електронний ресурс] – режим доступу: http://agroleon.com.ua/page_of_product.php?id=217
29. Каустична сода. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://rekte.com.ua/soda-kaustychna
30. Державний реєстр дезінфекційних засобів. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://data.gov.ua/dataset/e4cf84a5-25fa-46e8-aa14-dbfa240b974a
31. Дезінфекційний засіб Соліклор. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://hlorka.in.ua/ua/p1537967128-soliklor-granuly-banka.html

32. Дзінфекційний засіб Гуасепт [Електронний ресурс] – режим доступу: https://pestco.com.ua/ua/products/kontsentrat-gidkiy-guasept-guasept-dlya-sterilizatsii-i-dezinfektsii-1l.html
33. Збірник СС-100. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://promvit.com.ua/smesitel-ss-100-mobilnyj-dezinficiruyushhix-sredstv/
34. Повітрозабірник [Електронний ресурс] – режим доступу: https://tusk.ua/ua/product
35. Теплообмінник-охолоджувач. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://onninen.ua/tovar/HEXONIC-Kozuchotrubnyj-teploobminnyk-B500-0170-0007,154546
36. Ресивер. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://tusk.ua/ua/product/resiver-vozdushnyij-lider-10-bar-1900-l-rv1900100001-dlya-kompressora/
37. Теплообмінник – нагрівач. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://onninen.ua/tovar/HEXONIC-Kozuchotrubnyj-teploobminnyk-B500-0170-0007,154546
38. Реактор-змішувач. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://promvit.com.ua/reaktor-rgs-50-l-gmp/
39. Збірник СМ-350. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://promvit.com.ua/zbirnik-sm-350-mobilnij/
40. Інокулятор геометричним об’ємом 10 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://unilab.kiev.ua/catalog/fermentery-i-bioreaktory/fermenteryInfors/.
41. Відцентрований насос. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://vitals.pro/UA/tsentrobezhnyj-nasos-vitals-aqua-cp-1111e
42. Відцентрований насос. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://vik-21.com.ua/ua/catalog/nasosy_tsentrobezhnye/tsentrobezhnyy_monoblochnyy_nasos_grundfos_ns_4_23_1kh230v/#tab2

43. Посівний апарат. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://unilab.kiev.ua/catalog/fermentery-i-bioreaktory/FermenteryTechforsInfors/
44. Реактор-змішувач на 50 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://promvit.com.ua/reaktor-rgs-50-l-gmp/
45. Збірник для культуральної рідини. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://promvit.com.ua/zbirnik-sm-350-mobilnij/
46. Пирог Т.П., Ключка Л.В. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум для здобувачів ОС «Бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. прог. «Біотехнологія: фармацевтичнв, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад.: Т.П. Пирог, Л.В.Ключка. – К.:НУХТ, 2021. – 100 с.
47. Сусло-агар. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://shop.hlr.ua/ua/agar-suslo-wort-agar-merck-84006.html
48. М'ясо-пептонний агар. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://shop.hlr.ua/ua/myasnoy-pepton-conda-500-g-253692.html
49.. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
50. Wurm D.,Herwig C. How to Determine Interdependencies of Glucose and Lactose Uptake Rates for Heterologous Protein Production with *E. coli.* Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1586, DOI 10.1007/978-1-4939-6887-9_26
51. Федосенко Г. О., Скрипинець Ю. В., Леоненко І. І., Єгорова А. В., Кашуцький С. М., Антонович В. П. Вивчення залишкових кількостей глюкози на поверхнях фармацевтичного обладнання методами поляриметрії та ВЕРХ. *Фармацевтичний журнал*. 2015, 5: 83-89.

52. Застосування мембранних біореакторів для очищення стічних вод від біорезистентної фармацевтичної продукції. Електронний ресурс. – Режим доступу: https://jrnl.nau.edu.ua/index.php/SBT/article/view/14573
53. Костюченко Н.І. Біотехнологічні аспекти раціонального природокористування: навчальний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра напряму підготовки «Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування» / Н.І. Костюченко. – Запоріжжя: ЗНУ, 2018. – 116 с.
54. Апарати для очищення повітря від забруднень. Електронний ресурс. – Режим доступу: http://eir.nuos.edu.ua/xmlui/bitstream/handle/123456789/987/AparOchs.pdf?sequence=1

ДОДАТКИ

Appl Microbiol Biotechnol (2008) 77:1233–1240
DOI 10.1007/s00253-007-1272-6

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS AND PROCESS ENGINEERING

High-cell-density cultivation for co-production of ergosterol and reduced glutathione by *Saccharomyces cerevisiae*

Fei Shang · Zheng Wang · Tianwei Tan

Received: 29 July 2007 / Revised: 1 November 2007 / Accepted: 1 November 2007 / Published online: 11 December 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Two different high-cell-density cultivation processes based on the mutant *Saccharomyces cerevisiae* GE-2 for simultaneous production of glutathione and ergosterol were investigated. Compared with keeping the ethanol volumetric concentration at a constant low level, feedback control of glucose feeding rate (F) by keeping the descending rate of ethanol volumetric concentration ($\Delta E/\Delta t$) between −0.1% and 0.15% per hour was much more efficient to achieve a high glutathione and ergosterol productivity. This bioprocess overcomes some disadvantages of traditional *S. cerevisiae*-based cultivation process, especially shortening cultivation period and making the cultivation process steady-going. A classical on or off controller was used to manipulate F to maintain $\Delta E/\Delta t$ at its set point. The dry cell weight, glutathione yield and ergosterol yield reached 110.0±2.6 g/l, 2,280±76 mg/l, and 1,510±28 mg/l in 32 h, respectively.

Keywords High cell density · *Saccharomyces cerevisiae* · Ergosterol · Reduced glutathione · Ethanol

Introduction

High-cell-density cultivation is required to improve microbial biomass and increase intracellular product formation (Riesenberg and Guthke 1999). In order to improve volumetric yields in a cost-effective way, recombinant proteins, food additives, bakers' yeast, and other metabolic intermediates are often produced in high-cell-density cultivation. Generally, it is in high-cell-density cultivation that dry cell weight (DCW) exceeds 50 g/l. However, it is not easy to achieve high cell density because improper carbohydrate or oxygen supply and by-product accumulation inhibit the cell growth. Therefore, optimization and control of fed-batch culture are usually required. High-cell-density cultivation takes many advantages over traditional cultivations in which fermentors and closed system volume are reduced, volumetric productivity is improved, volume in primary downstream processing are reduced, concentration steps are frequently omitted, and operating costs are reduced (Andersson et al. 1994; Chen et al. 1992).

Fed-batch culture is an efficient method to achieve high cell density. However, it is unavoidable to generate by-products which inhibit the cell growth and desired product formation because of carbohydrate oversupply or oxygen deficiency. Fed-batch strategies, classified as either open-loop control or closed-loop control, are the key factors for high-cell-density cultivation. On one hand, an open-loop control system is controlled directly, and only, by an input signal. Exponential feeding strategy (a kind of open-loop control) often keeps specific growth rate close to a prespecified point to avoid by-product formation (Jenzsch et al. 2006; Korz et al. 1995). Feeding is carried out to increase the biomass exponentially in the bioreactor controlling biomass accumulation at growth rates which do not cause the formation of by-product ($\mu_{set}<\mu_{max}$; Riesenberg et al. 1991).

On the other hand, closed-loop control systems always involve feedback to ensure that set conditions are met. Feedback means that sensors constantly collect data to monitor the culture conditions and pass the data to the processor for decisions making. A high cell density can be obtained by using online or off-line feedback control of

F. Shang · Z. Wang · T. Tan (✉)
Beijing Key Laboratory of Bioprocess, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, People's Republic of China
e-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

substrate concentration, metabolic intermediates concentration, and respiratory quotient (RQ) to a preset point. Once the corresponding threshold values are exceeded, a reduction of the substrate feeding rate should be performed. To avoid acetate formation, Horn et al. (1996) used online flowing injection analysis for glucose control, in which glucose concentration was kept constant at the level of 1.5 g/l. Turner et al. (1994) developed a fully automated system for the online monitoring galactose and acetate with high-performance liquid chromatography (HPLC) device and closed-loop control of a fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* limiting production of unwanted by-products. Macaloney et al. (1997) used near-infrared spectroscopy to measure biomass, glycerol, ammonium, and acetate in a recombinant *E. coli* fed-batch process.

Although feedback control systems are more robust, they are always hampered by the lack of suitable, reliable, and cheap sensors. Dissolved oxygen (DO)- and pH-stat strategies are relatively simple and are generally used to achieve high cell density. Carbon source feeding rate is manipulated by a closed-loop controller which regulates dissolved oxygen or pH (Akesson et al. 1999; Jeong and Lee 1999; Kim et al. 2004; Oliveira et al. 2005). Exponential feeding is stopped whenever a predetermined amount of limiting substrate is supplied. And then DO or pH change is observed. When DO or pH rises above an upper limit due to the depletion of substrate, feeding is restarted.

Improving yeast intracellular metabolites production (such as glutathione, ergosterol, *S*-adenosyl-*L*-methionine and coenzyme q10) with high-cell-density cultivation technology is a focus of our laboratory. In this paper, we describe an improved high-cell-density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous production of glutathione and ergosterol. Feedback control of glucose feeding rate relying on ethanol concentration descending rate was applied to achieve high biomass and productivity.

Reduced glutathione (GSH) and ergosterol are both important functional compounds that have been found in high concentrations in yeast cells. GSH plays a pivotal role in response to sulfur and nitrogen starvation, detoxification of endogenous toxic metabolites, and protection against oxidative damages (Penninckx 2002). It is used as a medicine for the liver and a scavenger of the toxic compound. Ergosterol is a main sterol in yeast cells and is responsible for structural membrane features such as integrality, fluidity, permeability, and activity of membrane-bound enzymes (Parks and Casey 1995). It is also an important pharmaceutical intermediate and a precursor of vitamin D_2 (Arnezeder and Hampel 1990). Those two products are chosen for co-production because they can be easily separated according to their great difference in solubility (GSH is water soluble, but ergosterol is liposoluble). Hence, the harvest yeast cells can be ruptured by boiling water and GSH is released in water remaining ergosterol in fragments of yeast cells.

Materials and methods

Strain

S. cerevisiae G796-2 with high intracellular glutathione and ergosterol content was selected from 45 yeast strains which were purchased from China General Microbiological Culture Collection Center or preserved in our laboratory by primary screening. A new mutant *S. cerevisiae* GE-2 was obtained by mutagenizing *S. cerevisiae* G796-2 with ultraviolet and diethyl sulphate, followed by resistance selection with $ZnCl_2$ and ethionine. The intracellular glutathione and ergosterol content of *S. cerevisiae* GE-2 reached 2.2% and 2.8%, respectively. Although the ergosterol content had no significant change, the glutathione content of *S. cerevisiae* GE-2 was 63% higher than its parent in flask experiment.

Growth medium

For preservation, *S. cerevisiae* GE-2 was cultured on YPD agar slopes (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, and 2% agar) at 30±1°C for 2 days. A seed medium (glucose 30 g/l, yeast extract 6 g/l, $(NH_4)_2HPO_4$ 3 g/l, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.8 g/l, and KH_2PO_4 2 g/l) was used for flask cultures. Yeast cells were cultivated in 250-ml flasks containing 50 ml seed medium in a shaking incubator at 30±1°C and 180 rpm for 24 h. A cultivation medium was used for fed-batch culture. This medium contained (per liter) 70 g of glucose, 28 g of molasses, 10 g of yeast extract, 16 g of corn steep liquor, 9 g of $(NH_4)_2HPO_4$, 4 g of $MgSO_4{\cdot}7H_2O$, 2 g of KH_2PO_4, 20 mg of $ZnSO_4$, 10 mg of $MnSO_4$, 10 mg of $CuSO_4$, 10 mg of $FeSO_4$, and 0.5 ml of antifoam.

Cultivation procedure

Fed-batch culture of *S. cerevisiae* GE-2 was carried out in a 5-l bioreactor (Biotech-5BG; Shanghai Baoxin Bioengineering Equipment, Shanghai, China) under the following conditions: 29.5±0.5°C, 8 l/min of airflow, and a 600-rpm agitation speed with initial working volume of 2 l (with 10% [v/v] inoculum). The pH of the medium was adjusted to 5.4±0.1 by the automatic addition of 25% ammoniacal liquor. The dissolved oxygen was measured using an autoclavable O_2 sensor (Mettler–Toledo, Switzerland). Ethanol concentration was determined online by using an ethanol analysis instrument (FC-2002, East China University of Science and Technology,

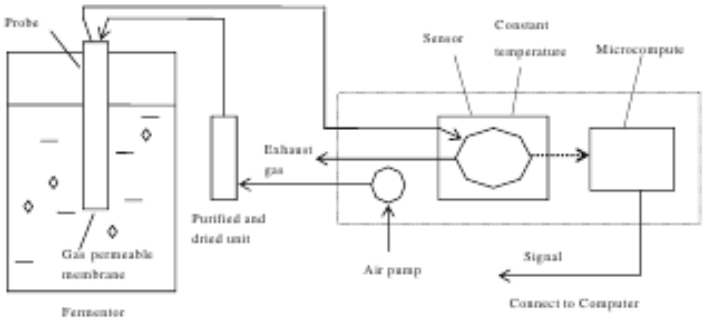


Fig. 1 The structure of the ethanol analysis instrument

Shanghai, China) mainly including an autoclavable probe, an air pump, a sensor, a microcomputer, and an analogue signals output block (Fig. 1). Compressed air continually carried ethanol in media to the sensor through a gas-permeable membrane in the bottle of the probe. The sensor converted the chemical signals into electronic signals which were amplified by the electrocircuit and were analyzed by a microcomputer. Analogue signals were outputted to record the ethanol concentration. The bioreactor and the ethanol analysis instrument were connected to a computer. A software program (Bioprocess, Shanghai Baoxin Bioengineering Equipment, Shanghai, China) enabled an onlined acquisition of the cultivation parameters (pH, DO, agitation speed, temperature, total glucose feeding amount, and ethanol concentration) and monitoring and regulation of those parameters. All cultivation data were stored every 3 min.

The cultivation process is classified into three parts: batch culture, fed-batch culture, and GSH bioconversion process. The cultivation was carried out in a batch mode until the initial glucose (70 g/l) was consumed at about the 7th hour (ethanol concentration reached the top value). Following the batch phase, a solution containing 600 g/l of glucose was added to the bioreactor using two periodic pulse feedback controls which kept the ethanol volumetric concentration (E) or its descending rate ($\Delta E/\Delta t$) at set points. The errors of E or $\Delta E/\Delta t$ were calculated by the program every 12 min. If E or $\Delta E/\Delta t$ was improper, the time interval between two glucose feeding events should be adjusted. Thus, the glucose feeding rate (F) was changed. Figure 2 is a block diagram for those two feeding schemes. A classical on or off controller was used to manipulate F to maintain $\Delta E/\Delta t$ at its set points. The glucose feeding rate of both schemes was directly calculated from Eqs. (1) and (2), respectively.

$$F(t) = \begin{cases} \alpha\overline{F}(t) & \text{If } E \geq 1.2\% \\ \overline{F}(t) & \text{If } 0.8 < E < 1.2\% \end{cases} \quad (1)$$

$$F(t) = \begin{cases} \overline{F}(t) & \text{If } -0.15\% < \Delta E/\Delta t < -0.1\% \\ \alpha\overline{F}(t) & \text{If } \Delta E/\Delta t > -0.1\% \end{cases} \quad (2)$$

$\overline{F}(t)$is the predetermined glucose feeding rate for the time t (shown in Fig. 3). A series of cultivation experiments were conducted to establish the required $\overline{F}(t)$ to control E or $\Delta E/\Delta t$. The scaling factor α was set at 0.2 if the E or $\Delta E/\Delta t$ exceeded the threshold value. The feeding medium was changed when the OD_{660nm} reached 250 at about the 24th hour. The second feeding medium contained 600 g/l of glucose and 30 g/l of NH_4Cl, which provided a sufficient nitrogen concentration for glutathione formation. At the same time, single-shot addition of cysteine (10 mmol per liter of medium) and NH_4Cl (200 mmol/l) was applied to enhance glutathione production.

Analytical methods

Dry cell weight was determined gravimetrically and showed a functional relationship to the spectrophotometric measurement of turbidity at 660 nm (properly diluted). OD_{660nm} value equals to multiply the absorbance at 660 nm by dilution rate. A 5-ml sample was centrifuged at 2,300×g for 5 min. The cells were washed twice by distilled water and dried at 105°C for 12 h. The glucose concentration was determined off-line with a biosensor (model SBA-40C, Biology Institution of Shandong Academy of Science,

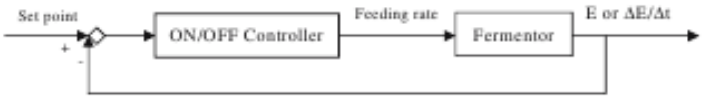


Fig. 2 Block diagram of feedback control of E or $\Delta E/\Delta t$

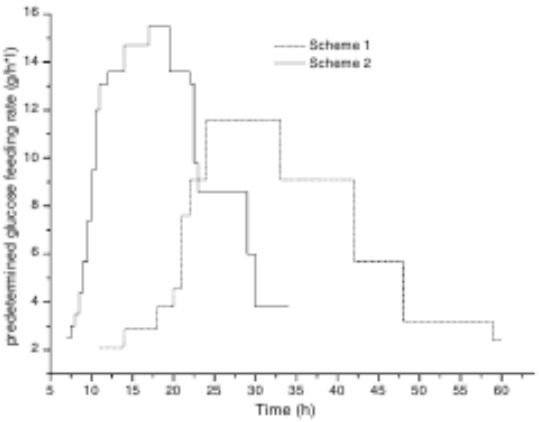


Fig. 3 Predetermined glucose feeding rate for the time *t*. *Dash line* controlling ethanol concentration at a set point (scheme 1), *solid line* controlling ethanol concentration descending rate at a set point (scheme 2)

China). Ergosterol extraction and quantification was described in a previous article (Shang et al. 2006). Ergosterol was identified and quantified by comparison to an internal standard (purchased from Sigma, purity ≥98%) during HPLC. One milliliter of the cultivation broth was transferred to centrifuge tubes for GSH determination, centrifuged at 8,000 rpm for 5 min, and with the supernatant decanted off. Intracellular GSH was extracted from the yeast cells by addition of 40% ethanol for 2 h at 30°C. The GSH assay of extracted samples was done by alloxan method (Li 1975). GSH was quantified by comparison to a standard (purchased from Fluka, purity ≥98%). Organic acid in the cultivation broth was quantified by HPLC (LC-10Atvp, Shimadzu, Japan) on an Aminex HPX-87H ion exclusion column (Bio-Rad, 300 mm×7.8 mm). Used as the mobile phase was 5 mmol/l H_2SO_4 at a flow rate of 0.6 ml/min. The column temperature was maintained at 60°C and all organic acid was detected by an ultraviolet photometric detector at 210 nm. For online analysis of the oxygen and carbon dioxide content in the exhausted gas, an exhausted gas analyzer (model LKM2000-03, Lokas Automation Corp., South Korea) was operated. Ammonium concentration was determined with the phenol-hypochlorite reaction (Weatherburn 1967).

Results

Cultivation parameters

For development of a successful high-cell-density cultivation, it is necessary to critically monitor the cultivation parameters to evolve the correct strategy wherein the substrates do not become limiting and the inhibitory metabolites do not become accumulating. Figure 4 shows that ethanol concentration and carbon dioxide content in exhausted gas responded to the glucose starvation or oversupply by *S. cerevisiae* in fed-batch culture. When the OD_{660nm} reached 150, glucose feed was stopped or persistently supplied for 1 min. It was evident that the ethanol concentration and carbon dioxide content in exhausted gas decreased first almost at same time (less than 1 min) for responding to glucose starvation. The dissolved oxygen began to increase approximate 420 s after glucose feed was stopped, but it increased rapidly to 80% only in 35 s. Same result was obtained for responding to glucose oversupply, but dissolved oxygen was maintained at 2% with only a slight change. As a result, the ethanol concentration and carbon dioxide content in exhausted gas were more efficient parameters for fast responding to the glucose deficiency and oversupply. Due to the expensive and dedicated equipment for exhausted gas analysis, ethanol concentration was selected to control the cultivation process.

High-cell-density cultivation by controlling ethanol concentration at a set point

The glucose feeding rate was controlled by maintaining the ethanol volumetric concentration at a low measurable set point (1.0%). When the initial glucose was consumed at the 7th hour, yeast cells continued to grow by consuming ethanol and ethanol concentration decreased rapidly. Glucose feeding started immediately at a low initial value (2.0 g/l per hour) until the ethanol concentration decreased at 1.0%. A series of cultivation experiments were conducted to establish the glucose demand to control the ethanol concentration below 1.0% (Fig. 5). Although the

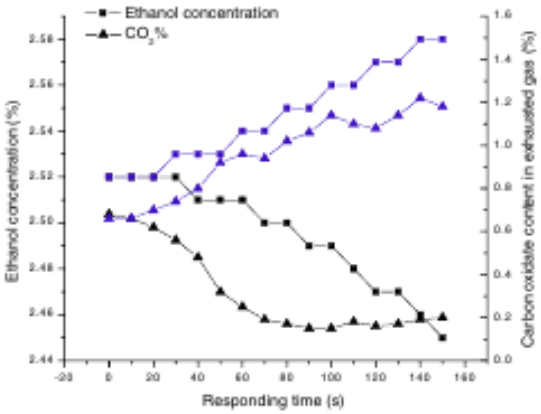


Fig. 4 Changes of ethanol concentration and CO_2 content in exhausted gas respond to glucose starvation and oversupply. *Black line* responding to glucose starvation; *blue line* responding to glucose oversupply

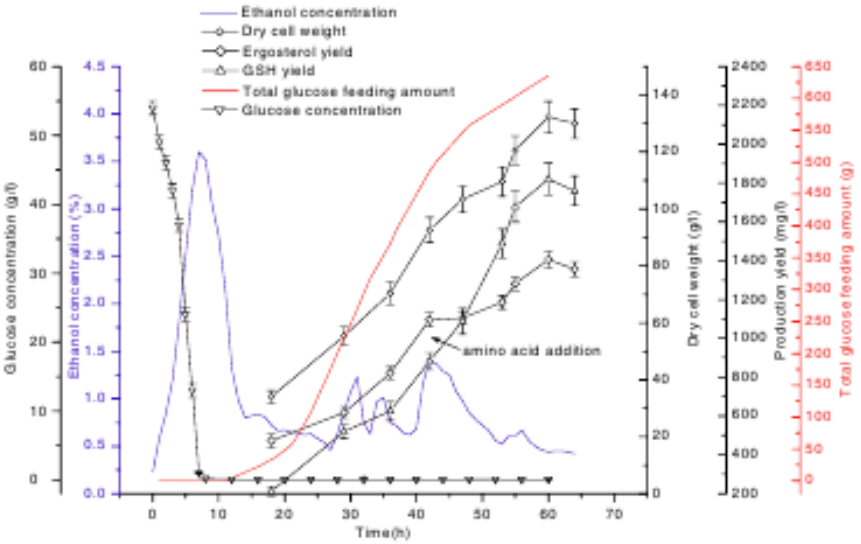


Fig. 5 High-cell-density cultivation of *S. cerevisiae* GE-2. The ethanol concentration was maintained at 1.0% (scheme 1). Values are means ± standard deviations of three different samples

measurement of ethanol analysis instrument ranged from 0.1% to 10%, measurement time delay was unavoidable especially when the ethanol concentration was below 1.0%. The response time always exceeded 1 min when the ethanol concentration was below 1.0%. Indeed, the ethanol concentration was fluctuated between 0.8% and 1.2% during the fed-batch process. When the ethanol concentration exceeded 1.2%, glucose feeding rate should be reduced. By using this feeding strategy, glucose concentration in cultivation broth was below 60 mg/l during fed-batch mode and dry cell weight reached above 130 g/l with relative high ergosterol and GSH content at 60 h, but the cultivation process may be long-drawn. The ergosterol and GSH yield reached 1,404±42 and 1,820±82 mg/l, respectively, but the ergosterol and GSH productivity were only 23.4±0.7 and 30.3±1.4 mg/l per hour, respectively. The effective yield of ergosterol ($Y_{\text{Ergosterol/S}}$) and GSH ($Y_{\text{GSH/S}}$) produced from 1 g glucose were 4.5±0.1 and 5.9±0.3 mg/g, respectively (including initial glucose in media).

An improved high-cell-density cultivation

To achieve a more efficient co-production of ergosterol and GSH, high productivity is necessary. An improved glucose feeding strategy was applied to achieve high ergosterol and GSH productivity by controlling ethanol concentration descending rate between 0.1% and 0.15% per hour. Ethanol concentration reached the top value of 4.1±0.1% after the terminal of batch phase (7×8 h) and glucose feeding started (Fig. 6). The initial glucose feeding rate was set at a

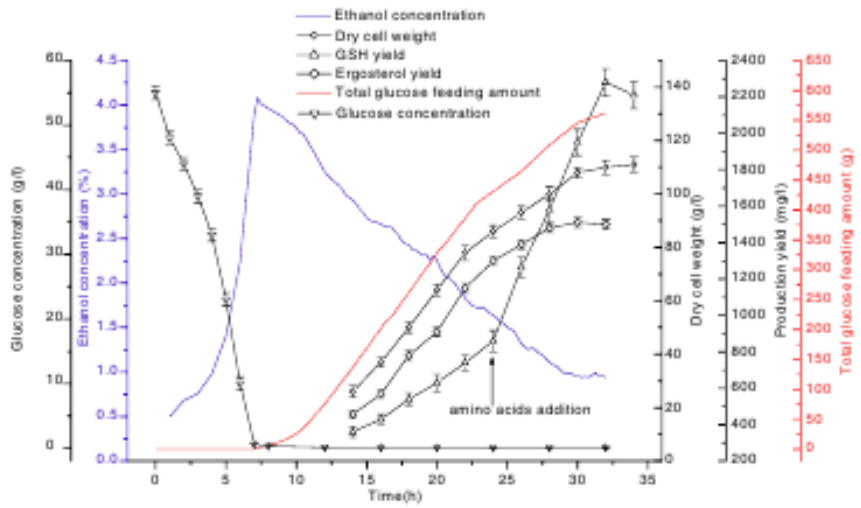


Fig. 6 High-cell-density cultivation of *S. cerevisiae* GE-2. The ethanol concentration was descending at the rate of −0.1×0.15% per hour (scheme 2). Values are means ± standard deviations of three different samples

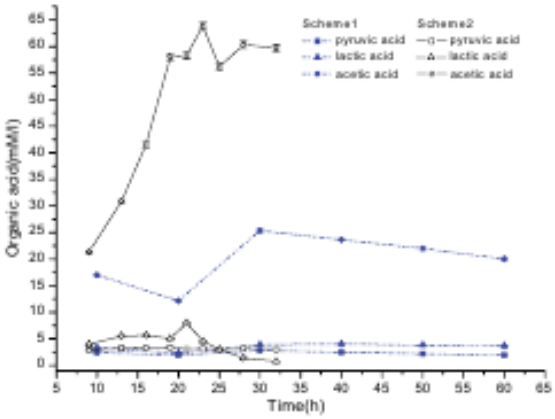


Fig. 7 Change of organic acids during two different fed-batch cultures. *Scheme1*, controlling constant ethanol concentration; *Scheme2*, controlling $\Delta E/\Delta t$ at −0.1×0.15%/h. Values are means ± standard deviations of three different samples

constant value of 2.5 g/l per hour for 30 min because the ethanol measurements were noisy. After that, the glucose feeding rate began to increase when ethanol concentration was decreasing obviously. During the fed-batch culture, glucose concentration in cultivation broth was below 120 mg/l, twice than that during controlling ethanol concentration at a set point. Glucose as the rate-limiting nutrient remained at a relatively low level due to its immediate consumption in the bioreactor. The main organic acids accumulated in cultivation broth were acetic acid, lactic acid, and pyruvic acid. The variations of those organic acids during two different fed-batch cultures were shown in Fig. 7. Pyruvic acid and lactic acid concentration have no significant difference between the two schemes, but acetic acid concentration in scheme 2 is higher than that in scheme 1. Ammonium ion concentration was maintained around 50 mmol/l before the addition of amino acids and 100 mmol/l during GSH conversion. The efficient yield and productivity of ergosterol and GSH was improved. Table 1 showed a comparison of the two different cultivation schemes.

Table 1 Comparison of two different cultivation schemes

	Scheme 1	Scheme 2
Cell productivity (g/l/h)	2.20±0.09	3.44±0.08
Cell efficient yield (g/g)	0.43±0.02	0.38±0.01
Ergosterol productivity (mg/l/h)	23.4±0.7	47.2±0.9
Ergosterol efficient yield (mg/g)	4.5±0.1	5.2±0.1
GSH productivity (mg/l/h)	30.3±1.4	71.3±2.4
GSH efficient yield (mg/g)	5.9±0.3	7.8±0.3

Scheme 1, controlling constant ethanol concentration; scheme 2, controlling ethanol concentration descending at the rate of −0.1~0.15% per hour. Values are means ± standard deviations of three different samples.

Discussion

In this study, we have shown that it is possible to obtain high cell density of *S. cerevisiae* by controlling ethanol concentration descending rate for co-production of ergosterol and reduced glutathione. A sensor for reliable and robust measurement of ethanol concentration was used to control ethanol concentration in two different ways.

High-cell-density cultivation of *S. cerevisiae*

Efficient high-cell-density cultivation of *S. cerevisiae* requires maintaining glucose concentration under 200 mg/l (O'Connor et al. 1992). In fact, although measurement of such low glucose concentrations can be easily achieved off-line by a common enzyme kit, controlling is difficult and seldom performed. How to feed glucose to yeast and what amount of glucose to feed is required are the key points for high cell density. A cultivation parameter which is easily measured and reflects cultivation performance fast is usually applied to control glucose feeding. Several parameters (e.g., RQ, oxygen uptake rate, carbon dioxide evolution rate, pH, DO, and ethanol concentration) have been proposed to production of *S. cerevisiae*. Because of higher consumption rate of glucose during high-cell-density cultivation, these cultivation parameters should respond fast to the glucose feeding. O'Connor et al. (1992) designed an oxygen-uptake-rate-based control strategy which performed better with a mean RQ value less than 1.1. The yeast biomass and yield reached 78.7 g/l and 0.5 g DCW/g glucose, respectively. Dairaku et al. (1981) developed a feedback control system of the glucose feed rate by keeping ethanol concentration constant. With the aid of a porous Teflon tubing method, the ethanol production rate was kept at zero. Alfafara et al. (1993) developed an improved fuzzy logic controller for ethanol control and utilized it to realize the maximum production of glutathione in yeast fed-batch culture. The control of the specific growth rate μ to its critical value μ_c could be done indirectly by maintaining a constant ethanol concentration.

We found that ethanol concentration was the most efficient ones for both fast responding to the glucose deficiency and oversupply, but direct feedback control of glucose feeding rate by maintaining ethanol concentration at a low level was not the optimal strategy. Keeping low ethanol concentration leads an extended lag phase since the glucose feeding rate will start at a low initial value and maintain at least 5 h for ethanol concentration decreasing below 1.0%. Because the measurement time delay exceeded 1 min when the ethanol concentration was below 1.0%, the ethanol concentration was actually controlled at the range of 0.8% to 1.2% (Fig. 5). The cultivation process turned unstable and cultivation time was prolonged. The

productivity of both cell and production were low. Productivity is important in which it relates to effective equipment utilization. Raw materials and power cost are the dominant manufacturing cost during high-cell-density cultivation. The prolonging of the cultivation period may increase both of the cost. So the glucose feeding rate should be increased but not beyond the value that produce ethanol. The ethanol analysis instrument was sensitive to reflect to the minimum variation of ethanol concentration (0.01%), especially when the ethanol concentration was between 2% and 5%. The responding time is always less than 1 min. During the responding time, only less than 0.3 g glucose was added into the bioreactor. Even though glucose is oversupplied or undersupplied, we can quickly respond to adjust the feeding rate in a short time. Although the dry cell weight and the cell efficient yield ($Y_{X/S}$) were lower than that of controlling constant ethanol concentration, more products were obtained and the cultivation process was more efficient. The optimal production yield does not require the higher dry cell weight.

Pyruvic acid, lactic acid, and acetic acid concentration in media were around 3, 8, and 60 mM/l when glucose feeding rate reached highest value (20 h; Fig. 7). Acetic acid is the main organic acid accumulated in the media. The minimum inhibitory concentration of acetic acid for *S. cerevisiae* growth was 100 mM and that of lactic acid was 278 mM as reported in the literature (Narendranath et al. 2001). It is well known that growth rate and glucose consumption rate decrease in the presence of acetic acid (Pampulha and Loureiro-Dias 2000). The cell growth rate began to decrease from 7 to 4 g/l per hour and the glucose feeding rate should be lower. Acetic acid concentration was maintained around 60 mM/l after 20 h and acid stress did not affect the product formation.

Co-production of ergosterol and glutathione

High-cell-density cultivation is a very successful technique in laboratory scale. Due to the big cost of raw materials and downstream processing, it is difficult to achieve high-cell-density cultivation for economical production in an industrial scale. Besides proper cultivation strategies and efficient separation methods, reasonable exploitation of microorganisms is required. There are a lot of intracellular metabolites in cells that have a high yield during high-cell-density cultivation. Simultaneous production of more than two metabolites can bring a potential benefit during high-cell-density cultivation. However, easy separation of those products is important because extra separation cost is not desired. Ergosterol and GSH in yeast cell are the proper products which can be co-produced through high-cell-density cultivation because they are always rich in yeast cells and easily separated; but these two compounds have different biosynthetic ways. Ergosterol is not a nitrogenous compound. In our previous experiment, its content in yeast cell is mainly influenced by nitrogen limitation (Shang et al. 2006), but glutathione contains three nitrogen in reduced form (GSH) and six in oxidized form (GSSG) and has been described as storage of excess nitrogen (Guillamon et al. 2001; Penninckx 2002). Therefore, addition of nitrogen sources needs careful control at different cultivation phases. During the initial stage of fed-batch culture (from 14 to 24 h), the yield of ergosterol began to increase obviously along with the growth of the yeast cells under a relatively higher ethanol concentration (1.7×3.1%; Fig. 6). Ergosterol is an important factor in restoring the fermentative capacity and tolerating high ethanol concentration (Higgins et al. 2003). With the exception of ammoniacal liquor for essential cell growth, no other nitrogen was fed. After change of the feeding solution and addition of cysteine and NH_4Cl for bioconversion of GSH, ergosterol yield increased slowly. However, GSH yield increased rapidly from a low level (860±58 mg/l) to 2,280±76 mg/l (Fig. 6). Cysteine was confirmed as the key amino acid for increasing the GSH production rate (Alfafala et al. 1992). GSH plays an important role in response of yeasts to oxidative stress, so the cultivation period should not be long and cultivation process should be ceased when DO began to increase after 8 h of bioconversion.

In summary, we have shown that a successful high-cell-density cultivation of *S. cerevisiae* for ergosterol and GSH co-production can be achieved by controlling ethanol concentration descending rate. This feeding scheme relying on online ethanol measurement would obviously not be suitable for other organisms whose ethanol was an inhibitory metabolite. However, this scheme does not require any mathematical modeling for parameters estimation, which may be more difficult to achieve. It could offer the possibility of high-cell-density cultivation of *S. cerevisiae* or other microorganism with physiological behaviors similar to that of *S. cerevisiae* in industry.

Acknowledgements We thank the support of Nation Science Foundation of China (20576013), 973 Program (2007CB707804), Beijing Natural Science Foundation (20721002), Beijing Science Program (D0205004040211), and National Science Fund for Distinguished Young Scholars (20325622).

References

Akesson M, Karlsson EN, Hagander P, Axelsson JP, Tocaj A (1999) On-line detection of acetate formation in *Escherichia coil* cultures using dissolved oxygen responses to feed transients. Biotechnol Bioeng 64:590–598

Alfafala GC, Kanda A, Shioi T, Shimizu H, Shioya S, Suga K (1992) Effect of amino acids on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol 36:538–540

Alfafara GC, Miura K, Shimizu H, Shioya S, Suga K, Suzuki K (1993) Fuzzy control of ethanol concentration and its application to maximum glutathione production in yeast fed-batch culture. Biotechnol Bioeng 41:493–501

Andersson L, Strandberg L, Haggstrom L, Enfors SO (1994) Modeling of high cell-density fed-batch cultivation. FEMS Microbiol Rev 14:39–44

Arnezeder C, Hampel WA (1990) Influence of growth rate on the accumulation of ergosterol in yeast-cells. Biotechnol Lett 12:277–282

Chen HC, Hwang CF, Mou DG (1992) High-density *Escherichia coli* cultivation process for hyperexpression of recombinant porcine growth hormone. Enzyme Microb Technol 14:321–326

Dairaku K, Yamasaki Y, Kuki K, Shioya S, Takamatsu T (1981) Maximum production in a baker's yeast fed-batch culture by a tubing method. Biotechnol Bioeng 23:2069–2081

Guillamon JM, van Riel NAW, Giuseppin MLF, Verrips CT (2001) The glutamate synthase (GOGAT) of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in central nitrogen metabolism. FEMS Yeast Res 1:169–175

Higgins VJ, Beckhouse AG, Oliver AD, Rogers PJ, Dawes IW (2003) Yeast genome-wide expression analysis identifies a strong ergosterol and oxidative stress response during the initial stages of an industrial lager cultivation. Appl Environ Microbiol 69:4777–4787

Horn U, Strittmatter W, Krebber A, Knüpfer U, Kujau M, Wenderoth R, Müller K, Matzku S, Plückthun A, Riesenberg D (1996) High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density cultivation under non-limited growth conditions. Appl Microbiol Biotechnol 46:524–532

Jenzsch M, Gnoth S, Beck M, Kleinschmidt M, Simutis R, Lubbert A (2006) Open-loop control of the biomass concentration within the growth phase of recombinant protein production processes. J Biotechnol 127:84–94

Jeong KJ, Lee SY (1999) High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* and its purification. Appl Environ Microbiol 65:3027–3032

Kim BS, Lee SC, Lee SY, Chang YK, Chang HN (2004) High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. Bioproc Biosyst Eng 26:147–150

Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer WD (1995) Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. J Biotechnol 39:59–65

Li TK (1975) The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. Biol Reprod 12:641–646

Macaloney G, Hall JW, Rollins MJ, Draper I, Anderson KB, Preston J, Thompson BG, McNeil B (1997) The utility and performance of near-infra red spectroscopy in simultaneous monitoring of multiple components in a high cell density recombinant *Escherichia coli* production process. Bioproc Biosyst Eng 17:157–167

Narendranath NV, Thomas KC, Ingledew WM (2001) Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. J Ind Microbiol Biotechnol 26:171–177

O'Connor GM, Sanchez-Riera F, Cooney CL (1992) Design and evaluation of control strategies for high cell density cultivations. Biotechnol Bioeng 39:293–304

Oliveira R, Clemente JJ, Cunha AE, Carrondo MJ (2005) Adaptive dissolved oxygen control through the glycerol feeding in a recombinant Pichia pastoris cultivation in conditions of oxygen transfer limitation. J Biotechnol 116:35–50

Pampulha ME, Loureiro-Dias MC (2000) Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett 184:69–72

Parks LW, Casey WM (1995) Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. Annu Rev Microbiol 49:95–116

Penninckx MJ (2002) An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. FEMS Yeast Res 2:295–305

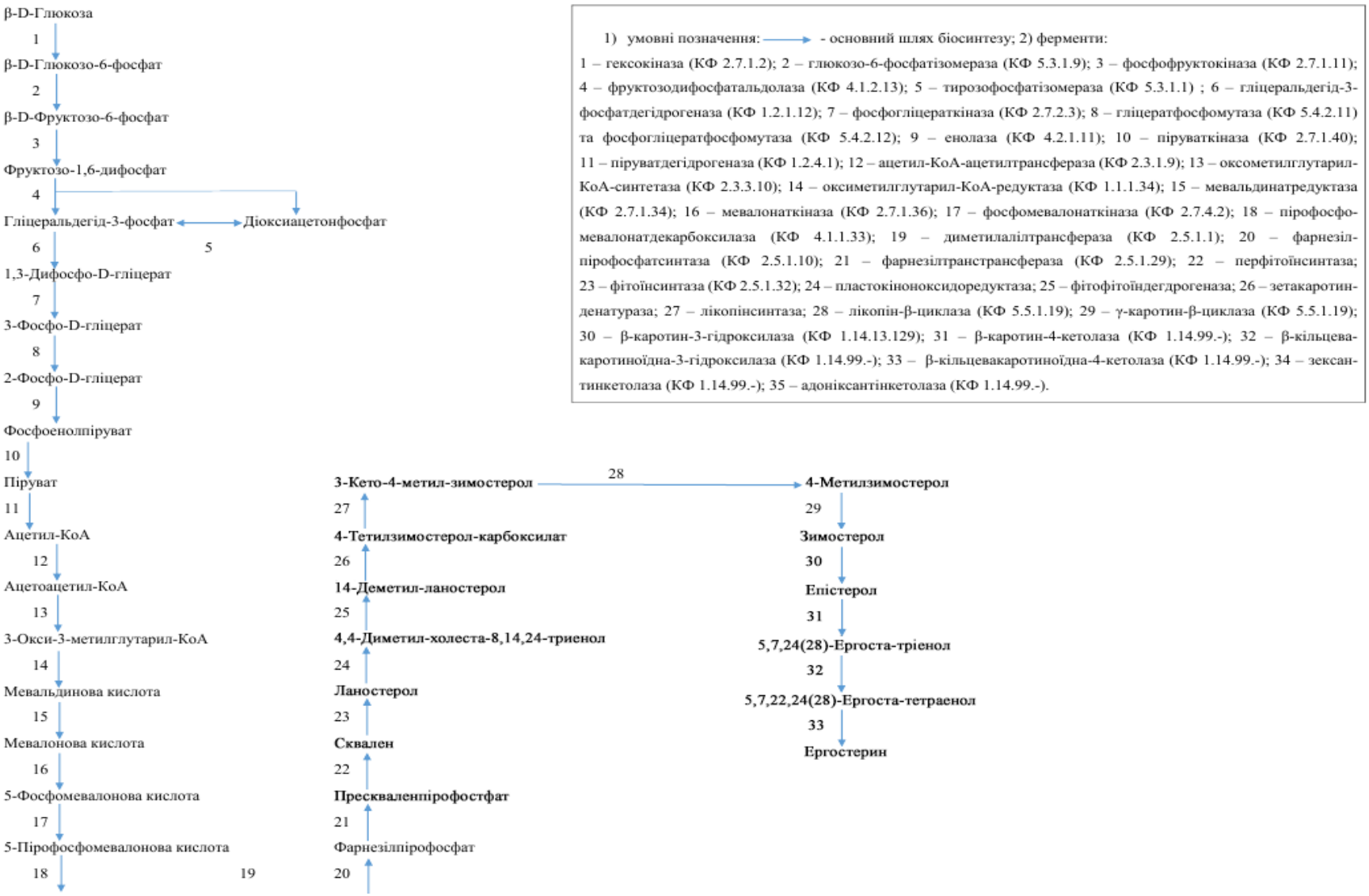
Riesenberg D, Guthke R (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol 51:422–430

Riesenberg D, Schulz V, Knorre WA, Pohl HD, Korz D, Sanders EA, Rob A, Deckwer WD (1991) High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. J Biotechnol 20:17–27

Shang F, Wen SH, Wang X, Tan TW (2006) Effect of nitrogen limitation on ergosterol production by *Sacharomyces cerevisiae*. J Biotechnol 122:285–292

Turner C, Gregory ME, Thornhill NF (1994) Closed-loop control of fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* using on-line HPLC. Biotechnol Bioeng 44:819–829

Weatherburn MW (1967) Phenol hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal Chem 39:971–974



1) умовні позначення: ⟶ - основний шлях біосинтезу; 2) ферменти:
1 – гексокіназа (КФ 2.7.1.2); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 4 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 5 – тирозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1) ; 6 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 – гліцератфосфомутаза (КФ 5.4.2.11) та фосфогліцератфосфомутаза (КФ 5.4.2.12); 9 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 11 – піруватдегідрогеназа (КФ 1.2.4.1); 12 – ацетил-КоА-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.9); 13 – оксометилглутарил-КоА-синтетаза (КФ 2.3.3.10); 14 – оксиметилглутарил-КоА-редуктаза (КФ 1.1.1.34); 15 – мевальдинатредуктаза (КФ 2.7.1.34); 16 – мевалонаткіназа (КФ 2.7.1.36); 17 – фосфомевалонаткіназа (КФ 2.7.4.2); 18 – пірофосфомевалонатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.33); 19 – диметилалілтрансфераза (КФ 2.5.1.1); 20 – фарнезілпірофосфатсинтаза (КФ 2.5.1.10); 21 – фарнезілтранстрансфераза (КФ 2.5.1.29); 22 – перфітоїнсинтаза; 23 – фітоїнсинтаза (КФ 2.5.1.32); 24 – пластокіноноксидоредуктаза; 25 – фітофітоїндегдрогеназа; 26 – зетакаротин-денатураза; 27 – лікопінсинтаза; 28 – лікопін-β-циклаза (КФ 5.5.1.19); 29 – γ-каротин-β-циклаза (КФ 5.5.1.19); 30 – β-каротин-3-гідроксилаза (КФ 1.14.13.129); 31 – β-каротин-4-кетолаза (КФ 1.14.99.-); 32 – β-кільцева-каротиноїдна-3-гідроксилаза (КФ 1.14.99.-); 33 – β-кільцевакаротиноїдна-4-кетолаза (КФ 1.14.99.-); 34 – зексантинкетолаза (КФ 1.14.99.-); 35 – адоніксантінкетолаза (КФ 1.14.99.-).