

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

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

«04» лютого 2026р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНИКОВ
(підпис) (ім'я ПРІЗВИЩЕ)

«04» лютого 2026р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

Зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(шифр та назва спеціальності)

Освітньої програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: Біосинтез лимонної кислоти *Yarrowia lipolytica*

Виконав: здобувач V курсу, групи ЗБТ-5-1

КЛИМЕНКО Олена Анатоліївна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник РЕЗНИЧЕНКО Юрій Миколайович

(Прізвище, ім'я, по-батькові)

(підпис)

Консультанти _____

(ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

(підпис)

(ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

(підпис)

Рецензент Андрій КОТИНСЬКИЙ

(ім'я, 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 відповідні джерела

Здобувач Олена КЛИМЕНКО

(ім'я, ПРІЗВИЩЕ, підпис)

Київ - 2026р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь Бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(шифр і назва)

Освітня програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

(шифр і назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

«01» грудня 2025 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КЛИМЕНКО Олени Анатоліївни

(ім'я ПРІЗВИЩЕ)

1. Тема роботи Біосинтез лимонної кислоти *Yarrowia lipolytica*

керівник роботи к.т.н., доц. РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович

(науковий ступінь, вчене звання, ім'я ПРІЗВИЩЕ)

затверджено наказом по університету від “28” листопада 2025 року № 957к

2. Строк подання роботи здобувачем 30.01.2026

3. Вихідні дані до роботи *Yarrowia lipolytica*, цільовий продукт: лимонна кислота, об'єм ферментера 10 м³, коефіцієнт заповнення 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Розділ 1. Характеристика лимонної кислоти. Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика *Yarrowia lipolytica*. Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування. Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва лимонної кислоти. Розділ 5. Специфікація обладнання для виробництва лимонної кислоти. Розділ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу лимонної кислоти. Розділ 7. Основні етапи виділення та очищення лимонної кислоти. Розділ 8. Контроль виробництва лимонної кислоти.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень)

Апаратурна схема формату А1 - 2 аркуші

Технологічна схема формату А1 - 2 аркуші

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 грудня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Характеристика лимонної кислоти	01.12.2025-04.12.2025	
	Обґрунтування вибору та характеристика <i>Yarrowia lipolytica</i>	05.12.2025-10.12.2025	
	Техніко-економічне обґрунтування	11.12.2025-13.12.2025	
	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва лимонної кислоти	14.12.2025-21.12.2025	
	Складання технологічної схеми	22.12.2025-28.12.2025	
	Специфікація обладнання для виробництва лимонної кислоти	29.12.2025-02.01.2026	
	Опис технологічної схеми біосинтезу лимонної кислот	03.01.2026-10.01.2026	
	Складання апаратурної схеми	11.01.2026-20.01.2026	
	Основні етапи виділення та очищення лимонної кислоти;	21.01.2026-25.01.2026	
	Контроль виробництва лимонної кислоти	26.01.2026-30.01.2026	

Здобувач

_____ (підпис)

Олена КЛИМЕНКО

(ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Юрій РЕЗНІЧЕНКО

(ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

Реферат

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу лимонної кислоти з використанням нового штаму дріжджів *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6, який синтезує лимонну кислоту у концентрації 60,4 г/л за використання нетрадиційного субстрату, який є відходом виробництва біодизелю - гліцерину.

Лимонна кислота – органічна трикарбонова кислота, яка широко застосовується як харчова добавка, регулятор кислотності, антиоксидант, комплексоутворювач та консервант. У промислових та лабораторних умовах її виробляють мікробіологічним шляхом, наприклад, гриби *Aspergillus niger* або *Penicillium janthinellum*, дріжджі *Candida tropicalis* або *Yarrowia lipolytica*, та використовують у харчовій, фармацевтичній, хімічній, металургійній, текстильній і косметичній промисловості, сільському господарстві. Розрахована потужність виробництва становить 798 кг (22 м³ культуральної рідини) лимонної кислоти за рік.

Технологічна схема біосинтезу лимонної кислоти включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка титрувальних агентів, приготування розчину мікроелементів, стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (чотири стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6).

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, восьми розділів, списку використаних джерел, технологічної схеми (формат А1, 2 аркуші) та апаратурної схеми (формат А1, 2 аркуші). Загальний обсяг роботи – 78 сторінок, 13 таблиць, 7 рисунків.

Ключові слова: лимонна кислота, *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6, культуральна рідина, біосинтез, промисловість, гліцерин.

Abstract

This thesis is devoted to the development of technological and instrumental schemes for the biosynthesis of citric acid using a new yeast of strain, *Yarrowia lipolytica* 1.31. GUT1/6, which synthesises citric acid at a concentration of 60,4 g/L using an unconventional substrate – a waste product which of biodiesel production, glycerol.

Citric acid is an organic tricarboxylic acid widely used as a food additive, acidity regulator, antioxidant, chelating agent, and preservative. Under industrial and laboratory conditions, it is produced microbiologically by fungi such as *Aspergillus niger* or *Penicillium janthinellum*, and yeasts including *Candida tropicalis* or *Yarrowia lipolytica*. Citric acid is applied in the food, pharmaceutical, chemical, metallurgical, textile and cosmetic industries, as well as in agriculture.

The calculated production capacity is 798 kg of citric acid per year , corresponding to 22 m³ of culture fluid.

The technological scheme of citric acid biosynthesis includes auxiliary operations (preparation of aeration air, titration agents, microelements solutions, and sterilization of nutrient media) and the main technological process, which consists of stages of seed culture cultivation and biosynthesis in a 10 m³ fermenter with a filling coefficient of 0,6.

The qualification work consists of an introduction, eight chapters, a list of references, a technological diagram (A1 format, 2 sheets) and an equipment diagram (A1 format, 2 sheets). Total volume of work is 78 pages and includes 13 tables and 7 figures.

Keywords: citric acid, *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6, culture fluid, biosynthesis, industry, glycerol.

Зміст

Вступ	8
Розділ 1. Характеристика лимонної кислоти...	10
Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика <i>Yarrowia lipolytica</i>	13
2.1 Обґрунтування вибору <i>Yarrowia lipolytica</i> та складу поживного середовища для його культивування	13
2.2 Перевірочний розрахунок складу поживних середовищ	18
Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	22
3.1. Розрахунок потреби у цільовому продукті.....	24
3.2 Розрахунок потужності виробництва.....	26
3.3 Розрахунок геометричного об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	27
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	27
Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва лимонної кислоти	30
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	30
4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	33
4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища	34
4.3.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	36
4.3.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах	37
4.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м ³	40
4.4. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для регуляції рН у процесі виробничого біосинтезу цільового продукту.....	41
Розділ 5. Специфікація обладнання для виробництва лимонної кислоти.....	43
Розділ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу лимонної кислоти.....	46

Розділ 7. Основні етапи виділення та очищення лимонної кислоти...	56
7.1 Виділення лимонної кислоти з культуральної рідини після здійснення біосинтезу <i>Yarrowia lipolytica</i> 1.31.GUT1/6.....	57
7.1.1. Обґрунтування стадії відділення біомаси дріжджів <i>Yarrowia lipolytica</i> 1.31.GUT1/6.....	57
7.1.2 Обґрунтування та вибір методу виділення та очищення лимонної кислоти.....	60
Розділ 8. Контроль виробництва лимонної кислоти.....	66
8.1 Мікробіологічний контроль.....	66
8.1.1. Контроль шляхом прямого посіву.....	67
8.1.2. Контроль мікроскопіюванням.....	67
8.2 Визначення концентрації цільового продукту.....	69
8.3 Визначення концентрації біомаси.....	69
8.4 Визначення концентрації джерела вуглецю.....	70
8.5 Визначення концентрації джерела азоту.....	70
Список літератури.....	72

ВСТУП

В час активного розвитку промисловості, розбудови виробництв, винайдення нових технологій лишається актуальним розв'язання проблем утилізації надлишкового рівня побічних продуктів та відходів виробництва. В ідеальному варіанті технологічний процес має рухатися в напрямку безвідходних виробництв, та поки що ми маємо шукати шляхи ефективного рециклінгу і перероблення для відходів і побічних продуктів від виробництв.

Застосування біотехнологічних процесів є дуже перспективним виходом, щоб вирішити проблеми з надлишками, які могли б бути джерелом біогенних елементів та поживних речовин для мікроорганізмів, які в свою чергу можуть синтезувати необхідні для промисловості хімічні сполуки, наприклад органічні кислоти.

Лимонна кислота є найбільш поширеною хімічною речовиною, яку виробляють в промислових масштабах, також вона є найбільш широко використовуваною органічною кислотою, що має статус «Загалом безпечна» (GRAS – *Generally recognized as safe/загально визнано безпечним*)[1].

Відкриття лимонної кислоти приписується іранському алхіміку Джаберу ібн Хаяну у VIII столітті. Однак виділена лимонна кислота вперше була з соку зрілих плодів лимону шведським хіміком Карлом Вільгельмом Шале в 1784 році. Він взяв лимонний сік і додав до нього вапняне молоко, внаслідок чого утворився осад цитрату кальцію. Отриманий осад відфільтрували, та розчинили в неконцентрованій сірчаній кислоті. В результаті утворилася лимонна кислота та сульфат кальцію (гіпс). Розчин знову фільтрували, щоб відділити залишок сульфату кальцію, а розчин упарювали для отримання лимонної кислоти. Зовсім скоро було виявлено, що вона міститься також у інших фруктах і овочах, таких як яблука, виноград, помідори та солодкий перець [2].

					НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ		
		№ докум.	Підпис				
Розроб.	Клименко О.А.			ЗМІСТ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							
Керівник	Резніченко Ю.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В.П.						

Виробляти лимонну кислоту використовуючи процес бродіння почали лише наприкінці 19 століття. Було виявлено що гриби роду *Aspergillus* здатні виробляти лимонну кислоту, проте найбільший вихід цільового продукту був саме у *Aspergillus niger*. В результаті досліджень, що вивчали різні метаболічні шляхи і можливості різних мікроорганізмів синтезувати різноманітні органічні кислоти було виявлено, що дріжджі *Yarrowia lipolytica* при створенні оптимальних умов (доступ кисню, обмежений доступ до азоту та надлишок вуглеводів) також здатні синтезувати та накопичувати лимонну кислоту. Це викликало велику зацікавленість в їх дослідженні, задля використання цієї властивості в промислових масштабах виробництва лимонної кислоти[3,4].

На даний момент найважливішими напрямками руху розвитку біотехнології синтезу лимонної кислоти є створення виробничих процесів з високим титром, продуктивністю і виходом, та генетичне вдосконалення штамів продуцентів, щоб розширити можливі варіанти субстратів для біосинтезу [1].

Новизною даної роботи є використання побічного продукту виробництва біодизелю – гліцерину - в якості джерела вуглецю в поживному середовищі для культивування лимонної кислоти з використанням для біотехнологічного процесу відповідного штаму продуценту – дріжджів *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6 [5].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМОННОЇ КИСЛОТИ

Лимонна кислота – це органічна слабка трьохосновна карбонова кислота, що має широкий спектр використання як в промисловості так і в побуті. Вона є низько токсичною сполукою, і існує в двох формах: моногідрат – $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, молекулярна маса 210,14 а.о.м. і густина $1,665 \text{ г/см}^3$ та безводна форма з хімічною формулою $C_6H_8O_7$, її молекулярна маса складає 192,12 а.о.м. і густина $1,542 \text{ г/см}^3$.

Виглядає як дрібні прозорі кристали чи білий порошок, не має запаху, але кисла на смак, добре розчинна у воді, легко розчиняється в етанолі, розчинна в ефірі, етилацетаті, та не розчинна в бензолі та хлороформі. Температура плавлення лимонної кислоти становить 153°C . Температура розкладання становить 175°C [6].

Згідно з Міжнародною системою класифікації і нумерації харчових добавок, лимонна кислота виступає регулятором кислотності і класифікується як харчова добавка під кодом E330.

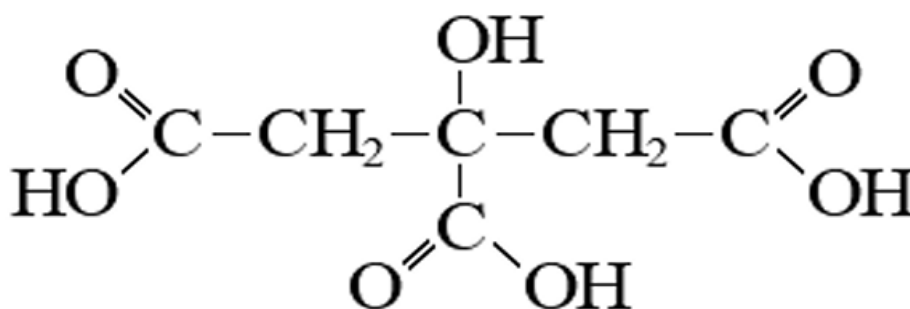


Рис. 1.1 «Структурна формула лимонної кислоти»

Випуск лимонної кислоти допустимий лише в відповідному пакуванні. Для використання в промисловості упаковують по 25 кг, 30 кг, 40 кг в мішки – вкладиші з поліетиленової плівки, що має товщину не менше 0,08 мм і забезпечує герметичність і збереження лимонної кислоти. Допустиме відхилення від маси – 1%. Для транспортування мішки-вкладиші запаковують

					НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ		
		№ докум.	Підпис				
Розроб.	Клименко О.А.			РОЗДІЛ 1. Характеристика лимонної кислоти	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						1	3
Керівник	Резніченко Ю.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В.П.						

в мішки з льону, джгута, напівлляні чи паперові [7].



Рис. 1.2 «Варіанти упакування лимонної кислоти»

Лимонна кислота по ступеню впливу на організм людини відноситься до третього класу небезпеки, викликає подразнення слизових оболонок та шкіри[7].

Для живих організмів лимонна кислота є однією з незамінних карбонових кислот у циклі Кребса, серії реакцій, що окислюють глюкозу до вуглекислого газу та води, вивільняючи енергію[4].

Застосування лимонної кислоти досить різноманітне у різних галузях промисловості. Її успішно використовують у фармацевтичному виробництві, також у виробництві засобів особистої гігієни та косметики, у харчовій промисловості, текстильній та хімічній промисловості. Лимонна кислота також знайшла своє застосування і сільському господарстві.

Фармацевтична промисловість використовує лимонну кислоту для покращення розчинності та стабілізації активних речовин (API), розчин лимонної кислоти з глюкозою використовують як антикоагулянт, щоб запобігти згортанню крові, солі лимонної кислоти мають сечогінні властивості. Використовують її також для виробництва таких форм лікарських засобів як еліксири, сиропи, шипучі порошки та таблетки.

У харчовій промисловості лимонну кислоту використовують підкислювач і стабілізатор рН у напоях, коригент смаку, що надає продуктам різкий кислий

смак, антиоксидант, що посилює активність консервантів, зберігає зовнішній вигляд і органолептичні якості деяких фруктів, надаючи їм вигляд свіжості.

Лимонна кислота є чудовим нешкідливим дезінфікуючим засобом проти кількох вірусів, включаючи норовірус людини. У косметичних засобах та засобах особистої гігієни лимонна кислота застосовується для регулювання рН та як відбілюючий агент.

Використовується активно при виробництві алкідних смол, в етерифікованій формі як пластифікатор, інгібітор піни. Як секвестр¹ використовується для видалення слідів металів. У текстильній промисловості як протрава для освітлення кольорів; в спеціальних чорнилах; в гальваніці. В аналітичній хімії лимонна кислота використовується для визначення цитрат-розчинного P_2O_5 та як реагент для визначення альбуміну, муцину, глюкози, жовчних пігментів[2,6,45].

Лимонна кислота дуже важлива для багатьох галузей промисловості, та споживається в величезних кількостях, і її споживання з кожним роком лише зростає. Тому пошук нових методів біосинтезу лимонної кислоти є досить важливим, актуальним і перспективним. Окрім цього, необхідною є можливість застосування ширшого кола продуцентів, для використання більш різноманітних варіантів субстратів. Адже економічно доцільно використовувати відходи харчових та сільськогосподарських виробництв, багаті на жири та вуглеводи, як субстрат для біосинтезу лимонної кислоти.

¹Секвестр — це зв'язуючий (хелатуючий) агент, який зв'язує іони (зазвичай металів) і робить їх неактивними.

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА *YARROWIA LIPOLYTICA*

2.1 Обґрунтування вибору *Yarrowia lipolytica* та складу поживного середовища для його культивування

Коли мова йде про виробництво лимонної кислоти, зазвичай розуміють її біосинтез всім відомим продуцентом *Aspergillus niger*. Та тривалий час проводилися дослідження з пошуку альтернативних варіантів, і одним з таких, що мав перспективи розвитку виявилися «нетрадиційні» види дріжджів *Yarrowia lipolytica*.

По відношенню ж до виробництва лимонної кислоти, продукти, що продукуються *Y. Lipolytica* мають певні переваги перед продуктами *A.niger*. Серед переваг наступні: вища продуктивність, легше культивування, стійкість до високих концентрацій субстрату, стійкість до іонів металу, менша потреба в кисні, легкість генетичних маніпуляцій, в результаті чого є можливість використання різноманітніших видів субстратів.

Виробники зацікавлені в тому, щоб сировина, яку використовують у біотехнологічних процесах, була дешевою та відновлюваною. В найоптимальнішому випадку, такою сировиною мають бути відходи чи побічні продукти виробництв [1].

Виявилось, що дріжджі *Yarrowia lipolytica* здатні рости, використовуючи як середовище, відходи промислових виробництв (стічні води, неочищений гліцерин) і синтезувати дуже велику кількість метаболітів, серед яких окрім лимонної кислоти є ще й ряд інших органічних кислот, еритритол, мікробну олію, лізин, гідролітичні ферменти.

Завдяки праці генних інженерів створено штами *Y. Lipolytica*, в яких значно збільшений вихід цільових продуктів.

Аскоміцетові дріжджі *Yarrowia lipolytica* – є непатогенними облигатними аеробами, які можуть споживати субстрати з різноманітними джерелами

					НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ		
		№ докум.	Підпис				
Розроб.	Клименко О.А.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика <i>Yarrowia lipolytica</i>	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						1	9
Керівник	Резніченко Ю.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В.П.						

вуглецю (спирти, глюкоза, ацетат, піруват, жирні кислоти, ароматичні вуглеводні, алкани). Морфологічні ознаки штамів можуть варіюватися, в залежності від багатьох факторів, наприклад рН, вміст кисню, склад поживного середовища, джерело вуглецю та азоту, генетичного фону штаму.

Для більшості штамів оптимальне значення рН є 3,5, проте є штами що здатні рости в діапазоні значень 2,0-8,0. Більшість штамів є психрофілами, і здатні рости при температурі +5°C, наприклад на охолоджених продуктах, і добре ростуть при кімнатній температурі. *Yarrowia lipolytica* – помірні галофіли, і здатні витримувати високі концентрації NaCl, до 7,5%, а деякі штами навіть до 15%[8].

Варіативність колоній починаючи від гладеньких та блискучих до сильно звивистих та матових. В складі клітинних стінок містяться галактоманнани та галактоза, хітин, протеїни та глікопротеїди [9]. Форма дріжджових клітин видовжена, еліптична чи сферична. Розмір клітин коливається від 3,0 до 5,0 мкм в ширину, та від 3,0 до 15,0 мкм в довжину. Дані дріжджі здатні проявляти диморфізм, утворення справжніх гіфів відбувається в залежності від фази росту та середовища.

Виділити їх можна з молочних продуктів (сирів, молока, йогуртів, вершків, сметани, масла та маргарину), м'ясних продуктів (свинини, яловичини, ковбас, субпродуктів), морепродуктів, з олії, також їх можна виділити з відходів нафтопереробної промисловості або з ґрунту[10]. Зважаючи на те, що ці дріжджі з легкістю переносять низький рН, тож їх можна виділити навіть з ротової порожнини, кишкового тракту, легень[8].

Одними з найефективніших продуцентів лимонної кислоти є штами *Yarrowia lipolytica* AWG7 INU 8 (200г/л) , *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1094 (30,31г/л), *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT.1/6 (60,4 г/л).

З метою підібрати найоптимальніший варіант для біосинтезу лимонної кислоти, варто провести порівняння наведених штамів, оцінити вартість та складність умов культивування. Таке порівняння наведено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Особливості одержання лимонної кислоти на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год	Концентрація лимонної кислоти, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
Yarrowia lipolytica AWG7 INU 8	Інулін NH ₄ Cl KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ × 7H ₂ O Дріжджовий екстракт	100,0 2,0 0,25 1,0 1,0	48	200	Культивування в біореакторі робочим об'ємом 2 дм ³ . T°= 28 °C; kLa = 0,6м ⁻¹ . n=800 об/хв.; pH = 5,5 Підживлювання тричі, по 800см ³ середовища, коли концентрація фруктози падала нижче 20 г дм ⁻³ .	Rakicka, M., Wolniak, J., Lazar, Z. Та ін. Виробництво високого титру лимонної кислоти з інуліну. BMC Biotechnol 19 , 11 (2019). https://doi.org/10.1186/s12896-019-0503-0
Yarrowia lipolytica NRRL Y-1094	Глюкоза Дріжджовий екстракт NH ₄ Cl KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ × 7H ₂ O CaCl ₂ FeCl ₃ × 6H ₂ O ZnSO ₄ × 7H ₂ O MnSO ₄ × 7H ₂ O (NH ₄) ₂ SO ₄ CuSO ₄ Тіамін	125 0,5 1,5 1,0 1,5 0,15 0,15 0,02 0,06 1,0 0,02 0,001	144	30,31	Культивування в колбах для струшування об'ємом 250мл, заповнених 50мл ферментаційного середовища, n=350 об/хв. T°= 28 °C; pH=5,5	Börekçi, B.S.; Kaya, M.; Kaban, G. Citric Acid Production by Yarrowia lipolytica NRRL Y-1094: Optimization of pH, Fermentation Time and Glucose Concentration Using Response Surface Methodology. Fermentation 2022, 8, 731. https://doi.org/10.3390/fermentation8120731
Yarrowia lipolytica 1.31.GUT.1/6	Гліцерин NH ₄ Cl KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ × 7H ₂ O Дріжджовий екстракт	150,0 2,0 0,2 1,0 1,0	168	60,4	Культивування проводили в біореакторі з робочим об'ємом 2 дм ³ . T°= 29,5 °C; pH=5,5; n=800 об/хв.; q _r – 0,8 л/хв;	Rywińska, A.; Tomaszewska-Hetman, L.; Lazar, Z.; Juszczak, P.; Sałata, P.; Malek, K.; Kawecki, A.; Rymowicz, W. Application of New Yarrowia lipolytica Transformants in Production of Citrates and Erythritol from Glycerol. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 1475. https://doi.org/10.3390/ijms25031475

**Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів
лимонної кислоти**

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
<i>Yarrowia lipolytica</i> AWG7 INU 8	Інулін	100,0	349,0	34,90	4
	NH ₄ Cl	2,0	90,0	0,18	1
	KH ₂ PO ₄	0,25	106,0	0,03	1
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	1,0	120,0	0,120	3
	Дріжджовий екстракт	1,0	705,0	0,705	1
Вартість 1 л середовища – 35,935 грн.					
<i>Yarrowia lipolytica</i> NRRL Y-1094	Глюкоза	125,0	80,0	10,0	2
	Дріжджовий екстракт	0,5	705,0	0,3525	1
	NH ₄ Cl	1,5	90,0	0,135	1
	KH ₂ PO ₄	1,0	106,0	0,106	1
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	1,5	120,0	0,180	3
	CaCl ₂	0,15	78,0	0,0117	5
	FeCl ₃ ×6H ₂ O	0,15	300,0	0,045	1
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,02	720,0	0,0144	5
	MnSO ₄ ×7H ₂ O	0,06	95,0	0,00576	3
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0	99,0	0,099	6
	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,02	840,0	0,0168	5
Тіамін	0,001	2112,0	0,002112	6	
Вартість 1 л середовища – 10,968 грн.					
<i>Yarrowia lipolytica</i> 1.31.GUT.1/6	Гліцерин	150,0	59,0	8,85	1
	NH ₄ Cl	2,0	90,0	0,18	1
	KH ₂ PO ₄	0,2	106,0	0,0212	1
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	1,0	120,0	0,120	3
	Дріжджовий екстракт	1,0	705,0	0,705	1
Вартість 1 л середовища – 9,876 грн.					

Примітка. * – Ціни наведено станом на січень 2026 р.

- 1 - <http://prom.ua> ;
- 2 – <https://ingredient.top> ;
- 3 – <https://himreagent.com.ua> ;
- 4 – <https://primehim.com>;
- 5 – <https://allhim.kh.ua> ;
- 6 – <https://shop.hlr.ua> .

З даних, що наведені в таблиці 2.1 ми бачимо, що середовище для культивування *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1094 має досить великий перелік складників, а штам *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT.1/6 має відносно тривалий час культивування. Ці фактори можуть негативно відзначитися на собівартості продукту культивування, а отже зменшити прибуток.

У таблиці 2.2 приводиться вартість складників поживних середовищ для культивування приведених для порівняння штамів *Yarrowia lipolytica* і розрахунок вартості 1 л поживного середовища.

Найбільшу вартість має перше поживне середовище, для культивування *Yarrowia lipolytica* AWG7 INU 8, через високу вартість основного компоненту – інуліну. найдешевшим же є середовище для культивування *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT.1/6, основним складником якого є гліцерин, і ціна цього середовища за 1 л – 9,876 грн.

Таблиця 1.3

Умовна вартість 1 г лимонної кислоти синтезованої продуцентами *Yarrowia lipolytica* AWG7 INU 8, *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1094 та *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT.1/6

Біологічний агент	Концентрація лимонної кислоти, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної лимонної кислоти за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Yarrowia lipolytica</i> AWG7 INU 8	75,5	48	1,57	38,03	0,504
<i>Yarrowia lipolytica</i> NRRL Y-1094	30,31	144	0,211	10,968	0,361
<i>Yarrowia lipolytica</i> 1.31.GUT.1/6	60,4	168	0,36	9,876	0,164

Виходячи з даних, що наведені в таблиці 2.3 можна зробити висновок, що найменша вартість 1г лимонної кислоти у штаму *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT.1/6, і становить 0,164 грн. Отже, культивування цього продуценту найбільш економічно доцільне.

2.2 Перевірочний розрахунок складу поживних середовищ

Розрахунок складу поживного середовища для вирощування штаму *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT.1/6 – продуцента лимонної кислоти.

Тривалість культивування становить 168 годин в біореакторі, концентрація лимонної кислоти в культуральній рідині становить 60,4 г/л. Концентрація біомаси – 5 г/л[5].

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу лимонної кислоти:

Джерелом вуглецю в середовищі є гліцерин. Гліцерин є трьохатомним спиртом, що складається з трьох гідроксильних груп що приєднані до трьох атомів вуглецю, формула $C_3H_8O_3$, молярна маса – 92,09 г/моль.

Розраховуємо скільки вуглецю міститься в 60,4 г лимонної кислоти. Молекулярна маса лимонної кислоти становить 192,12г/л. У 192,12г лимонної кислоти міститься 72,066 г Карбону.

$$\text{В } 60,4 \text{ г} - (60,4 \times 72,066) / 192,12 = 22,7 \text{ г Карбону.}$$

Визначаємо відсотковий вміст Карбону в гліцерині – $12,011 \times 3 = 36,033$ г/моль. $(36,033 \times 100) / 92,09 = 39,13 \%$.

Концентрація гліцерину ($C_3H_8O_3$) в середовищі – 150г/л. Враховуючи відсотковий вміст Карбону, можна розрахувати, що така концентрація гліцерину містить 58,7г Карбону.

Робимо розрахунок, щоб дізнатися в скількох грамах гліцерину міститься 22,7 г Карбону, враховуючи що вміст Карбону в гліцерині складає 39,13% . У 150 г гліцерину міститься 58,7 г Карбону, а 22,7 г Карбону в $(22,7 \times 150) / 58,7 = 58,01$ г гліцерину.

Необхідно також враховувати, що вирощування мікроорганізмів на вуглеводних субстратах має забезпечувати також окиснення субстрату до вуглекислого газу (CO_2) для отримання енергії, що необхідна для конструктивного метаболізму. Окиснюється близько 40-50% субстрату. Для розрахунків приймемо значення 50%.

Тому вміст гліцерину в середовищі має становити:

$$(58,01 \times 0,5) + 58,01 = 87,015 \text{ г/л.}$$

Потреби для синтезу біомаси.

Біомаса становить 50% Карбону. Розраховуємо це значення для 5 г біомаси: $5 \times 0,5 = 2,5$ г Карбону. Така кількість Карбону міститься в $(2,5 \times 150) / 58,7 = 6,4$ г/л гліцерину.

Також необхідно розрахувати кількість гліцерину, що витратиться на окиснення в CO_2 . $6,4 \times 0,5 = 3,2$ г/л.

Таким чином, для отримання 5,0 г/л біомаси в середовище необхідно внести:

$$6,4 + 3,2 = 9,6 \text{ г/л гліцерину.}$$

Загальний вміст гліцерину в поживному середовищі, який потрібен для синтезу 5,0 г/л біомаси та 60,4 г/л лимонної кислоти, становить $87,015 + 9,6 = 96,615$ г/л

З огляду на те, що вміст гліцерину в поживному середовищі становить 150 г/л а потреба для утворення необхідної концентрації біомаси і лимонної кислоти – 96,615 г/л, можна зробити висновок, що вміст гліцерину в середовищі є в надлишку, і підживлення не потрібне.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення.

Потреби для синтезу біомаси.

Для складання розрахунку припускаємо, що вміст Нітрогену у біомасі для синтезу лимонної кислоти складає 10%, а значить в 5,0 г/л біомаси вміст Нітрогену становить 0,5г.

Джерелом амонійного Нітрогену у поживному середовищі є хлорид амонію (NH_4Cl). Для того, щоб розрахувати кількість хлориду амонію, що необхідна для отримання 5,0 г/л біомаси визначаємо його молекулярну масу.

Молекулярна маса NH_4Cl становить 53,491г/моль, а Нітрогену – 14г.

Враховуючи ці значення визначаємо, що для одержання 0,5 г Нітрогену необхідно ввести $(53,491 \times 0,5) / 14 = 1,91$ г/л хлориду амонію.

Можна зробити висновок, що оскільки Нітроген не входить до складу лимонної кислоти, його необхідність в поживному середовищі визначається

лише необхідністю забезпечення синтезу біомаси. З розрахунку відомо, що потреба в хлориді амонію становить 1,91г/л, а фактично в середовище вноситься 2,0 г/л, що є свідченням достатнього забезпечення мікроорганізмів Нітрогеном для нормального синтезу біомаси.

Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі

Вміст Фосфору в біомасі становить близько 3% (за елементом P).

Розраховуємо, що для синтезу 5г/л біомаси вміст Фосфору повинен становити 0,15г/л. Джерелом Фосфору в середовищі для виробництва лимонної кислоти є дигідрофосфат калію (KH_2PO_4).

Молекулярна маса KH_2PO_4 становить 136,086 г/моль, а Фосфору – 31г.

Вміст Фосфору у KH_2PO_4 – $31/136,086 = 23\%$.

Враховуючи ці значення визначаємо, що для одержання 0,15 г Фосфору необхідно внести $(136,086 \times 0,15)/31 = 0,66$ г/л дигідрофосфату калію. В середовище вноситься 0,2 г/л дигідрофосфату калію, що з огляду на приведений розрахунок, є недостатньою кількістю для синтезу біомаси, і потрібно вносити додатково підживлення. З розрахунку визначаємо, що 0,46г/л дигідрофосфату калію потрібно ввести додатково розчином в середовище в процесі культивування.

Тривалість культивування становить 168 годин, прийmemo що гліцерин дробно вноситься в середовище кожні 28 годин. Необхідну ж кількість дигідрофосфату калію, а саме 0,46 г/л, доцільно вносити одразу при приготуванні композиції поживного середовища. Зважаючи що кількість невелика такий підхід дозволить забезпечити сталість концентрації фосфору в середовищі протягом усього періоду накопичення біомаси, спростити технологічний процес зменшивши кількість етапів підготовки.

Інші компоненти середовища

Дигідрофосфат калію виступає як джерелом Фосфору, так і джерелом Калію, сульфат магнію гептагідрат є джерелом Магнію та Сульфуру[5].

Ці солі важливі для нормального росту та метаболізму дріжджових клітин, для підтримки осмотичного балансу, активації ферментів, що беруть участь в метаболізмі органічних кислот.

Таблиця 2.4

Склад поживного середовища для культивування продуцента лимонної кислоти *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT.1/6

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л			
	Сумарний	Початковий	У підживлювальному розчині	В одній порції підживлення
Гліцерин	150,0	50,0	100,0	20,0
NH ₄ Cl	2,0	2,0	-	-
KH ₂ PO ₄	0,66	0,66	-	-
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1,0	1,0	-	-
Дріжджовий екстракт	1,0	1,0	-	-

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

Основними властивостями, що впливають на збільшення об'ємів споживання лимонної кислоти є універсальність її в використанні, безпечність та низька вартість. Це робить її незамінним інгредієнтом у багатьох галузях.

Кількість населення на планеті невідмінно зростає, разом з тим збільшується і потреба в продуктах харчування, при виготовленні та зберіганні яких використовується лимонна кислота. Більш відома як харчова добавка Е 330 вона використовується для регулювання кислотності, підкислювання, здійснення антиокислювального впливу, сприяє пластифікації білків, є природним консервантом та ароматизатором, з бактеріостатичною дією.

Як ефективний підкислювач із м'яким, освіжаючим смаком, що відрізняється від інших харчових кислот, лимонна кислота є ключовим інгредієнтом у кондитерській, лікєро-горілочній та безалкогольній промисловості, зокрема у виробництві газованої води. Вона покращує смак і текстуру морозива, десертів, кремів, варення, джемів та згущеного молока. Також її додають до різноманітних соусів, маргарину, майонезу, кетчупу та харчових концентратів.

Цю речовину використовують у багатьох технологічних процесах: від рафінування рослинної олії та обробки свіжої риби до надання еластичності плавленим сирам. Крім того, вона допомагає облагороджувати тютюн, зв'язуючи його леткі основи, та значно покращує смакові якості есенцій і приправ. Завдяки своїм властивостям, вона забезпечує ніжність та легкість намазування сирів на хліб[12].

Лимонна кислота виконує важливі функції в косметичних засобах, діючи як консервант, що подовжує термін придатності, і як хелатуючий агент, який зв'язує іони металів. Вона також регулює кислотність, допомагаючи підтримувати здоровий рівень рН шкіри, і покращує властивості піни.

					НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ		
		<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Клименко О.А.</i>			РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>						1	9
<i>Керівник</i>	<i>Резніченко Ю.М.</i>				Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>							
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>						

Цей інгредієнт широко використовується в косметиці для шкіри та волосся, а також у засобах особистої гігієни. Лимонну кислоту додають у креми для очищення шкіри, депіляції та освітлення пігментних плям, а також у маски, лосьйони, тоніки, молочко і пінки для тіла. Її можна знайти в шампунях, ополіскувачах, фарбах та фіксаторах для волосся, пілінгах, а також у шипучих сумішах, солях і бомбочках для ванни. Крім того, цитрати застосовуються для надання пластичності милу [12,45].

Лимонна кислота часто використовується у фармацевтиці як функціональна добавка та консервант. Завдяки своєму кислому смаку, вона чудово маскує неприємні присмаки в ліках, роблячи їх більш приємними для вживання.

Цю кислоту залучають до виробництва шипучих таблеток, вітамінів і знеболювальних препаратів, оскільки вона прискорює розчинення твердих та порошкоподібних форм ліків. Окрім того, сіль лимонної кислоти, цитрат натрію, відіграє важливу роль у консервації донорської крові. Вона запобігає її згортанню, шляхом блокування іонів кальцію, що дозволяє заготовляти та зберігати великі обсяги крові [12,13].

Через активний «eco-friendly» рух відбувається зростання попиту на екологічно чисті засоби для миття та прибирання, тому використання лимонної кислоти в побутовій хімії значно збільшилося. Ця речовина є ключовим компонентом у широкому асортименті миючих засобів, які ефективно видаляють накип, іржу та наліт, а також дезінфікують поверхні й усувають неприємні запахи.

Застосування лимонної кислоти у складі чистячих засобів значно підвищує їхню ефективність. Завдяки своїй здатності утворювати комплекси з металами, вона ідеально підходить для миття посуду та чищення металевих поверхонь. Вона чудово справляється з жировими забрудненнями, особливо у твердій воді, і допомагає повертати виробам їхній первісний вигляд, одночасно підвищуючи їхню стійкість до корозії [12,45].

Цю кислоту використовують як у побуті, так і в промисловості для очищення сталі та кольорових металів від нашарувань. Також її застосовують

для хімічного чищення, наприклад, для видалення лужних відкладень у дистилляторах.

Для забезпечення усіх галузей промисловості необхідною кількістю лимонної кислоти важливо шукати шляхи оптимізації її виробництва. Для цього доцільно застосовувати пошук нових штамів продуцентів, використання альтернативних видів сировини.

3.1. Розрахунок потреби у цільовому продукті

В умовах війни в Україні активно популяризується донорство крові, плазми, тромбоцитів. Потреба в донорській плазмі в Україні є постійною та значною, оскільки вона використовується для виготовлення життєво важливих препаратів, таких як альбумін, імуноглобуліни та фактори згортання. Зібрана плазма проходить карантинізацію протягом 6 місяців, після чого її використовують для виготовлення препаратів для хворих. Також свіжозаморожену плазму переливають пацієнтам з кровотечами, опіками та іншими станами, що супроводжуються втратою білків плазми.

Донорський центр «Біофарма» займається залученням донорів, процесом забору плазми крові та її заготовкою. На момент написання роботи в Україні діють 17 донорських центрів, які щодня приймають від 50 до 150 донорів. Можна припустити що загальна кількість донорів на добу в середньому 1500 осіб [13].

За 2024 рік компанія «Біофарма» прийняла близько 100 000 нових донорів [13].

Для заготівлі та зберігання плазми критично необхідний розчин антикоагулянту, адже він запобігає згортанню крові. Цей препарат використовують виключно в спеціальних апаратах для плазмацитозферезу, де кров та її компоненти розділяються. Під час процедури заготівлі, розчин виконує свою основну функцію, забезпечуючи антикоагуляцію крові безпосередньо в апараті. Залежно від типу обладнання, співвідношення крові до розчину становить від 6,5:1 до 12:1, тобто на кожні 100 мл крові необхідно додати 8-15 мл розчину. Після заготівлі, плазма, що вже містить

антикоагулянт, стабілізується. Це дозволяє заморожувати її та зберігати протягом тривалого часу. Таким чином, розчин не лише запобігає згортанню, а й забезпечує збереження функціональних властивостей плазми для подальшого використання у виробництві ліків або для трансфузії [14].

В Україні для цього використовують «Антикоагулянтний і консервуючий розчин для крові людини» розчин по 250 мл у контейнері, що містить у своєму складі лимонну кислоту. Розчин являє собою прозору, безбарвну або блідо-жовту рідину, що не містить механічних часток.

Фармгрупа – Допоміжний засіб для гемотрансфузій. Код АТХ V07A C.

Діючі речовини: 1 л розчину містить натрію цитрату 22,0 г, кислоти лимонної моногідрату 8,0 г або кислоти лимонної безводної 7,3 г, глюкози моногідрату 24,5 г або глюкози безводної 22,3 г;

Допоміжна речовина: вода для ін'єкцій [14].

Виробництво препарату знаходиться в Україні, виробник ДП «Фарматрейд», реєстраційне посвідчення UA/12337/01/01 [15].

Для забезпечення стерильності системи донорські центри на кожного донора використовують одну упаковку об'ємом 250 мл антикоагулянтного розчину. Існують звісно випадки, коли однієї упаковки не досить, але це рідкість. Зазвичай такі донори мають високий гемоглобін та не залучаються до донацій. Під час стандартної процедури плазмаферезу переробляється в середньому 1500 мл крові. Згідно з інструкцією, на кожні 100 мл крові необхідно додати до 15 мл антикоагулянту.

Об'єм крові, що переробляється взятий з практичного досвіду регулярного відвідування донорського центру.

Припустимо, що наше виробництво лимонної кислоти зацікавить ДП «Фарматрейд» і ми зможемо їх забезпечити сировиною для виробництва антикоагулянту. Спираючись на ці дані зможемо спрогнозувати та зробити розрахунки для майбутнього виробництва аналогічного лікарського засобу в Україні.

Таблиця 3.1

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в лимонній кислоті для виробництва «Антикоагулянтного і консервуючого розчину для крові людини»

Група пацієнтів	Доза препарату на донацію, контейнер	Вміст лимонної кислоти в дозі препарату, г	Кількість донацій Україні на 2024 рік, тис. осіб[13,16]	Загальна кількість лимонної кислоти на всіх донорів, кг
Донори плазми крові від 18 років	1	1,825	250	456,25
Донори крові від 18 років	1	1,825	187	341,275
Всього:				797,525

Отже, згідно з даними з таблиці 3.1 – потреба в лимонній кислоті для забезпечення донорів «Антикоагулянтним і консервуючим розчином» становить 797,525 кг.

3.2 Розрахунок потужності виробництва

Потреба ДП «Фарматрейд» для виробництва «Антикоагулянтного та консервуючого розчину» не є великою, і виробництво здатне забезпечити його сировиною – лимонною кислотою – на 100%.

Обраний біологічний агент *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT.1/6 синтезує лимонну кислоту в концентрації 60,4 г/л (кг/м³). [5]

Об'єм культуральної рідини (X), що необхідна для синтезу 797,525 кг лимонної кислоти:

$$60,4 \text{ кг} - 1 \text{ м}^3$$

$$797,525 \text{ кг} - X$$

$$X = (797,525 \times 1) / 60,4 = 13,2 \text{ м}^3$$

Сумарні втрати цільового продукту при виділенні становлять 40 %. У цьому разі необхідно отримати таку кількість культуральної рідини (V_{кр}):

$$13,2 \text{ кг} - 60\%$$

$$V_{\text{кр}} - 100\%$$

$$V_{\text{кр}} = (13,2 \times 100) / 60 = 22,0 \text{ м}^3$$

3.3 Розрахунок геометричного об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для забезпечення річної потреби в лимонній кислоті згідно п. 3.2, потрібно отримати 22,0 м³ культуральної рідини.

Необхідно розрахувати, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість трудоднів – 41. Отже, об'єм культуральної рідини за добу становить (V_д):

$$V_{д} = V_{кр} / T_{тр} = 22,0/41 = 0,537 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл (V_{кр}) буде становити:

$$V_{цк} = (K_1 \times V_{д} \times T_{цф})/24 = 1,5 \times 0,537 \times 178/24 = 6,0 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

T_{цф} — цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (168 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год), K₁ — коефіцієнт запасу, що враховує нестерильність операцій (K₁ = 1,1 — 1,5).

Процес підготовки ферментатора займає 10 годин і складається з послідовних етапів. Спочатку проводять миття та огляд, а потім перевіряють герметичність (по 2 год на кожен етап). Далі йде стерилізація (2 год) та охолодження (1 год). Після цього завантажують живильне середовище (1,5 год), здійснюють засів (0,5 год) і завершують підготовку вивантаженням культуральної рідини (1 год).

Розрахувавши об'єм культуральної рідини за один цикл та знаючи коефіцієнт заповнення ферментера K_s, визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{Гф} = V_{цк} / K_s = 6,0/0,6 = 10 \text{ м}^3$$

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез лимонної кислоти здійснюють у ферментері з геометричним об'ємом (V_{Гф}) 10 м³ з коефіцієнтом заповнення (K_s) 0,6.

Робочий об'єм ферментера становить (V_{роб}):

$$V_{роб} = V_{Гф} \times K_s = 10,0 \times 0,6 = 6,0 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища. При таких умовах для отримання 6,0м³ культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб1}} = 6,0 \times 0,1 = 600 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна отримати під час культивування в посівному апараті об'ємом:

$$V_{\text{ПА1}} = V_{\text{роб1}} / K_s = 600 / 0,6 = 1 \text{ м}^3$$

Для одержання 600 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб2}} = 600 \times 0,1 = 60 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом:

$$V_{\text{ІН2}} = V_{\text{роб2}} / K_s = 60 / 0,6 = 100 \text{ л}$$

Для одержання 60 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб3}} = 60 \times 0,1 = 6 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом:

$$V_{\text{ІН3}} = V_{\text{роб3}} / K_s = 6 / 0,6 = 10 \text{ л}$$

Для одержання 6 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб4}} = 6 \times 0,1 = 600 \text{ мл посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можливо отримати шляхом культивування дріжджів *Yarrowia lipolytica* в колбах на качалці.

Для цього використовуються качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

При цьому кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = 600 / 750 * 0,2 = 4,0 \text{ шт.}$$

Таким чином, для отримання посівного матеріалу необхідно 4 качалочні колби.

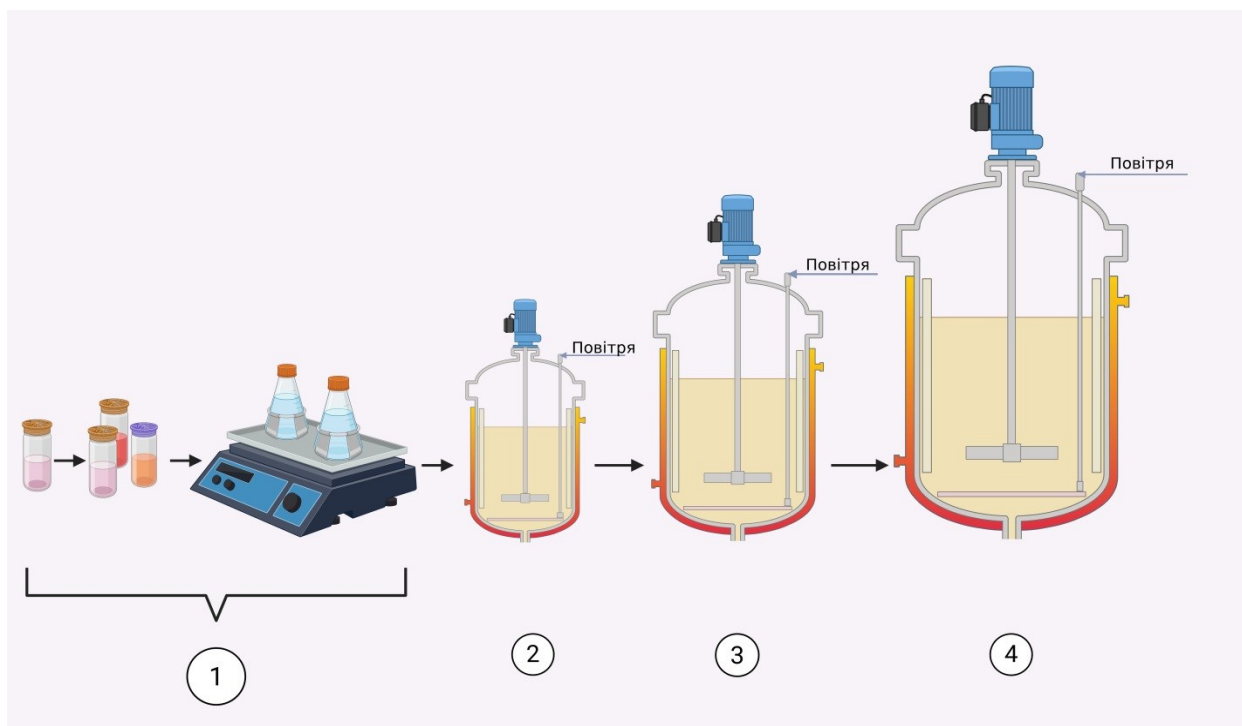
Висновки про кількість стадій підготовки посівного матеріалу, об'ємів ферментаційного обладнання і об'ємів води для підготовки поживного середовища на всіх етапах процесу наведено в таблиці 3.4

**Результати розрахунку об'ємів ферментаційного обладнання для
підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу**

Об'єм ферментера, м ³	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, м ³	Об'єм посівного матеріалу (10%), м ³	Конденсат (10%), м ³	Об'єм підготовки поживного середовища, м ³
10	0,6	6	0,6	0,6	4,8
1	0,6	0,6	0,06	0,06	0,48
0,1	0,6	0,06 (60 дм ³)	0,006 (6 дм ³)	0,006 (6 дм ³)	0,048
0,01 (10 дм ³)	0,6	0,006 (6 дм ³)	0,0006 (0,6 дм ³)	0,0006 (0,6 дм ³)	0,0054
4 × 750 мл	0,2	0,0006 (0,6 дм ³)	-	*-	0,0006

* Конденсат не враховується, так як стерилізація композицій поживного середовища відбуватиметься у колбах в автоклаві.

Отже, згідно розрахунків, процес отримання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу лимонної кислоти у ферментері з об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити в чотири етапи. Схематично стадії приготування посівного матеріалу зображено на рис. 3.3.1



**Рис. 3.3.1 «Схема приготування посівного матеріалу *Y. Lipolytica*
1.31.GUT1/6»**

1- вирощування в лабораторії (в пробірках і в колбах на качалці); 2 – 4 – вирощування в інокуляторах об'ємом (м³): 2 – 0,01; 3 – 0,1; 4 – 1 [17].

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛИМОННОЇ КИСЛОТИ

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Значна частина успішного біотехнологічного процесу полягає в правильно підібраних параметрах для його здійснення. На оптимальний підбір умов культивування безпосередньо впливають фізіологічно-біохімічні особливості обраного біологічного агенту *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6 - біологічний агент що продукує велику кількість метаболітів.

Найперше, з чим необхідно визначитися, це метод культивування біологічного агенту.

Культивування *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6 можна здійснювати як поверхневим так і глибинним методами. Перший зазвичай обирають для проведення лабораторних досліджень, скринінгу штамів, початкового нарощування біомаси. Він не потребує великої кількості поживного середовища і забезпечує краще надходження кисню до біологічного агенту. *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6 є аеробним мікроорганізмом, і доступність кисню для нього є обов'язковою умовою росту [18].

Та для культивування в промислових масштабах з метою одержання метаболітів оптимально використовувати глибинний спосіб культивування, що в такому випадку має ряд переваг. Серед них – широкий вибір ферментерів в залежності від виробничого завдання на культивування, точне підтримування умов культивування, адже сучасне обладнання дає можливість в режимі реального часу відстежувати великий діапазон параметрів (рН, температура, швидкість перемішування, вміст кисню та CO₂) і ефективно реагувати на їх зміни.

Отже для культивування штаму *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6 з метою одержання лимонної кислоти обираємо глибинний спосіб культивування з

					НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ		
		№ докум.	Підпис				
Розроб.	Клименко О.А.			РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва лимонної кислоти	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						1	13
Керівник	Резніченко Ю.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В.П.						

подачею у ферментер стерильного аераційного повітря та здійснення перемішування для кращої його розчинності. Для забезпечення виконання цих умов ферментери оснащують барботерами та мішалками. Автори статті вказують на те, що швидкість перемішування має становити 800 об/хв, а аерація на рівні 0,8л/хв [5].

Для біосинтезу лимонної кислоти оптимально підтримувати рН на рівні 5,5 шляхом додавання 20 % розчину гідроксиду натрію. Оптимум температури культивування становить 29,5°C. За таких умов не виключений розвиток небажаних бактерій та дріжджів. Тому важливо забезпечити асептичні умови під час біосинтезу лимонної кислоти. Для цього потрібно проводити стерилізацію задіяного в виробництві обладнання, комунікацій, поживного середовища для культивування і для приготування інокуляту, титрувального агенту, повітря.

Автори статті [5] вказують на те, що концентрація гліцерину в поживному середовищі становить 150г/л, а отже маємо вносити його періодично, зважаючи на те, що концентрація субстрату в середовищі не повинна перевищувати 40-60 г/л. Для уникнення неприємних явищ, таких як катаболітична репресія та збільшення тривалості лаг-фази, на початку культивування будемо вносити в середовище 50г/л гліцерину, і в процесі виробничого біосинтезу додаватимемо залишок. В статті зазначено, що тривалість культивування в біореакторі становить 168 годин, приймаємо що підживлення будемо вносити кожні 28 годин. З цього виходить що кількість порцій становитиме $(168-28)/28=5$. З кожною порцією підживлення в середовище потрібно буде вносити 20 г/л гліцерину.

Підсумуємо, що біосинтез лимонної кислоти штамом *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6 ефективно здійснюватиметься при забезпеченні таких умов:

- подача стерильного аераційного повітря;
- швидкість перемішування не менше 800 об/хв.
- підтримування рН на рівні 5,5;
- температура 29,5°C;

- Періодичне культивування з дробним внесенням субстрату;
- Глибинне культивування;
- Асептичні умови під час біосинтезу.

Після того, як ми визначилися з умовами культивування біологічного агенту *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6 маємо обрати придатне оснащення для ферментера, що дасть нам можливість забезпечити всі необхідні умови.

Під час культивування продуцента лимонної кислоти необхідно створити аеробні умови. Саме тому ферментер має бути оснащений барботером для подачі стерильного повітря та датчиками, що контролюватимуть вміст O_2 , газоаналізатором для контролю концентрації CO_2 .

Для інтенсифікації масообмінних процесів має бути перемішувачий пристрій з частотою обертів 800об/хв [5]. Культивування не передбачає встановлення перемішувачого пристрою особливої конструкції.

Автори статті зазначають який ферментер вони використовували в своїх дослідженнях. Вони проводили культивування для виробництва цитрату в біореакторі Biostat B Plus 5-L (Sartorius, Мельзунген, Німеччина) [5].

Мішалка в даному ферментері може бути трилопатева або шести лопатева. Барботер трубчастий з отворами вниз або вгору, з системою фільтрації повітря що надходить, що забезпечує його стерильність. Щоб запобігти можливому утворенню піни доцільно використовувати механічний спосіб піногасіння, для цього встановимо мішалку у верхній частині апарату, що обертанням розбиватиме піну.

Прилад має бути оснащений датчиком контролю рН. Нові технологічні рішення дають змогу автоматично регулювати його значення подаванням розчину титранту, в нашому випадку при потребі додавати стерильний розчин гідроксиду натрію 20%.

Також в ньому має бути датчик контролю температури та сорочка. При можливості можна встановити датчик піноутворення, рівня рідини, мутності, окисно-відновного потенціалу, датчик вихідних газів [19].

4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Штам *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6 є облігатним аеробом, а отже достатня та точно контрольована концентрація кисню в середовищі є важливою умовою для ефективного синтезу лимонної кислоти. Ця потреба в кисні впливає на технологію виробництва – надлишок кисню стимулює ріст *Y. Lipolytica* у бажаній дріжджовій формі, пригнічуючи утворення міцелію. Зменшення концентрації розчиненого кисню призводить до пригнічення синтезу лимонної кислоти, а отже до зниження продуктивності [20]. Врахувавши цю потребу в технологічній схемі потрібно передбачити стадії підготовки стерильного аераційного повітря.

У процесі культивування в посівному апараті і ферментері зростаюча культура аерується стерильним повітрям під надлишковим тиском 0,01 – 0,03 Мпа для задоволення біологічної потреби мікроорганізмів.

Забір атмосферного повітря здійснюється за використання вертикальної шахти з повітрязабірником на висоті 20м від рівня землі задля мінімізування потрапляння пилу та смогу. Шахти забору повітря доцільно розташовувати на відстані не менше ніж 12м від труб викиду відпрацьованого повітря. Це запобігає ризику повторного потрапляння відпрацьованого та забрудненого повітря в систему, це забезпечує максимальну чистоту сировини для наступних етапів очищення.

Повітря, що надходить з атмосфери, проходить багатоступінчасту систему фільтрації. Спершу через пласкі тканинні фільтри грубого очищення. Метою цього етапу є вловлювання грубих механічних та біологічних часток з розміром від 10мкм та більше. Ефективність очищення повітря на цьому етапі становить $E = 80\%$. Використання таких фільтрів має певні особливості, наприклад те, що допустимим є перепад тиску не більше 150Па, а заміну фільтрів слід здійснювати вже після 200-250 годин експлуатації, або ж при різких перепадах тиску.

Після первинного грубого очищення відбувається компресування повітря в турбокомпресорі. В результаті спостерігається підвищення робочого тиску повітря до діапазону 0,35-0,5 Мпа. Під час адіабатичного стиснення повітря його температура значно підвищується і сягає 90-100°C. При цьому вологість повітря зберігається на рівні 60%.

Наступним, не менш важливим етапом, що здатен запобігти негативному впливу на стерилізуючі фільтри є видалення надмірної вологи з повітря. На цьому етапі стиснене повітря з температурою 90-100°C подається до кожухотрубних теплообмінників, де охолоджується до температури 25-30°C. Це спричиняє інтенсивну конденсацію вологи. Відділена волога відводиться на нейтралізацію. Вміст вологи в повітрі після цього етапу становить 40%.

Попереднє очищення повітря від дрібних частинок пилу та мікроорганізмів відбувається за використання ємнісних набивних фільтрів. Такі фільтри як правило мають панельну конструкцію, яка наповнена скловолокном. Цей етап очищення дозволяє затримати більшість біологічних та механічних частинок, розмір яких перевищує 1 мкм. Ефективність очищення повітря на цьому етапі складає 99,5%.

Заключний етап очищення проходить на глибинних фільтрах, які заповнені базальтовим скловолокном (HEPA). Ці фільтри встановлюються безпосередньо біля біореакторів, перед місцем використання. Завдяки використанню HEPA-фільтрів затримуються біологічні та механічні частинки, розмір яких менший за 0,01 мкм. Ефективність очистки аераційного повітря після даного етапу становить 99,9%, а отже воно є готовим для використання.

Повітря в лабораторних умовах для вирощування посівної культури стерилізується з використанням УФ-ламп.

4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Виробничий біосинтез відбувається в ферментері об'ємом 10 м³, що містить 6 м³ поживного середовища. Це підтверджено розрахунками, що приведені в розділі

3. Інокулянт отримують у чотири етапи: у колбах на качалці, в інокуляторах об'ємом 10, 100 л і 1 м³ (табл.3.4).

Для виробничого біосинтезу лимонної кислоти продуцентом *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6 використовується середовище такого складу [5]:

- Гліцерин – 150 г/л;
- NH₄Cl – 2,0 г/л;
- KH₂PO₄ – 0,2 г/л;
- MgSO₄×7H₂O – 1,0 г/л;
- Дріжджовий екстракт – 1,0 г/л;

Стерилізації підлягають усі компоненти окрім гліцерину, так як трьохатомний спирт гліцерин є досить специфічним субстратом і споживати його здатні обмежені види мікроорганізмів. Гліцерин вноситься до розчинів солей після їх стерилізації.

Для одержання посівного матеріалу з метою вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу мікроелементи можна вносити в композицію з фосфорнокислим калієм.

Оскільки при взаємодії мікроелементів з K₂HPO₄ утворюватимуться практично нерозчинні у воді фосфати марганцю, для унеможливлення їх утворення стерилізацію композиції цих солей необхідно здійснювати при рН 4–4,5. Для того щоб забезпечити такий рН розчинам солей готують титранти: розчини соляної кислоти 6%, а також і гідроксиду натрію 6% для нейтралізації середовища перед внесенням посівного матеріалу.

Розчин соляної кислоти використовується для підкислення композиції солей перед стерилізацією, тому доцільно приготувати один розчин кислоти для всіх стадій виробництва. Стерилізація середовища для виробничого біосинтезу здійснюється в установці безперервної стерилізації (УБС), тому розчини кислоти і лугу для цієї стадії не використовуються.

У табл. 4.3 наведено розрахунки об'ємів кислоти і лугу, а також об'єму гліцерину, необхідних для приготування поживного середовища на кожну зі стадій виробництва.

Таблиця 4.3

Розраховані вміст та об'єми з особливостями приготування деяких компонентів поживного середовища та розчинів титрувальних агентів

Об'єм поживного середовища, л	Дріжджовий екстракт		Гліцерин		HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Вміст, г	Особливість підготовки	Об'єм, г	Ємність для внесення	Об'єм, мл	Особливість підготовки	Об'єм, мл	Особливість підготовки
0,6	0,6	У колбі на 500 мл	30	Колба на 100 мл	-	-	-	-
6	6	У колбі на 1 л	300	Колба на 500 мл	12	У колбі на 250 мл	12	У колбі на 250 мл
60	60	У колбі на 2 л	3000	Реактор на 1 м ³	120		120	
600	600	У реакторі на 10 л	30 кг			1200	У колбі на 2л	1200
6000	6000	В УБС-5	900 кг	-	-	-	-	-

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

Для отримання посівного матеріалу продуцента *Y. Lipolytica* 1.31.GUT1/6 на качалці у колбах, об'єм яких 750 мл, потрібно приготувати 600 мл поживного середовища. Використовують поживне середовище з наступним складом[5], г/л: гліцерин – 50; NH₄Cl – 1,0; KH₂PO₄ – 0,2; MgSO₄× 7H₂O – 1,0; дріжджовий екстракт – 1,0.

Так як об'єм поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках невеликий, а саме 0,6 л, його стерилізацію доцільно здійснювати в автоклаві. Після того, як ми проаналізували склад поживного середовища для вирощування *Y.lipolytica* 1.31.GUT1/6, в залежності від режимів стерилізації ділимо його на такі композиції:

Композиція А: дріжджовий екстракт – режим стерилізації становить: 112°C, 30хв.

Дріжджовий екстракт є чутливим до високих температурних режимів стерилізації і потребує м'якого режиму стерилізації.

Композиція Б: NH₄Cl , MgSO₄× 7H₂O – режим стерилізації становить: 131°C, 40хв.

Такий режим стерилізації є стандартним для розчинів солей.

Композиція В: K_2HPO_4 – режим стерилізації становить: 131°C, 40 хв.

Фосфати рекомендовано стерилізувати окремо, для того щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію.

Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці наведений у табл. 4.3.1:

Таблиця 4.3.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 600 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
Гліцерин	50,0	30,0	-	24,0
Дріжджовий екстракт	1,0	0,6	Композиція А	280,0
Вода		280 мл		
NH_4Cl	1,0	0,6	Композиція Б	200,0
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,0	0,6		
Вода		200 мл		
K_2HPO_4	0,2	0,12	Композиція В	100,0
Вода		100 мл		
Разом:				600

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

Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л.

Кількість компонентів, яка необхідна для приготування 6,0 л поживного середовища в інокуляторі об'ємом 10л приведена в таблиці 4.3.2. Зважаючи на те, що стерилізацію здійснювали в реакторі, потрібно врахувати конденсат -10%.

Композиція А: дріжджовий екстракт – режим стерилізації становить: 112°C, 30хв.

Композиція Б: NH_4Cl , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 – режим стерилізації становить: 131°C, 40хв, рН 4,0-4,5.

Композицію А готують в колбі об'ємом 2л, шляхом розчинення наважки

дріжджового екстракту в 1 л дистильованої води. Стерилізацію здійснюють в автоклаві при температурі 112°C протягом 30 хвилин.

Солі композиції Б розчиняють в 1 л питної води в колбі інтенсивно перемішуючи. Після розчинення солей додають ще 3,3 л питної води в інокулятор. При перемішуванні до розчину солей додають 6% розчин соляної кислоти для отримання значення рН – 4,5. Стерилізацію здійснюють в інокуляторі об'ємом 10л при температурі 131°C протягом 40 хвилин. До стерильної композиції Б додають композицію А та гліцерин.

Таблиця 4.3.2

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Гліцерин	50,0	300,0	-	0,24
Дріжджовий екстракт	1,0	6,0	Композиція А	1,0
Вода		1,0		
NH ₄ Cl	1,0	6,0	Композиція Б	4,3
MgSO ₄ × 7H ₂ O	1,0	6,0		
KH ₂ PO ₄	0,2	1,2		
Вода		4,3		
Конденсат		0,43	-	0,43
Разом:				6,0

Вирощування інокуляту в в інокуляторі об'ємом 100 л

Кількість компонентів, яка необхідна для приготування 60,0 л поживного середовища і інокуляторі об'ємом 100л приведена в таблиці 4.3.3. Зважаючи на те, що стерилізацію здійснювали в реакторі, потрібно врахувати конденсат -10%.

Композиція А: дріжджовий екстракт – режим стерилізації становить: 112°C, 30хв.

Композиція Б: NH₄Cl , MgSO₄× 7H₂O, KH₂PO₄ – режим стерилізації становить: 131°C, 40хв, рН 4,0-4,5.

Композицію А готують в колбі об'ємом 5л, шляхом розчинення наважки дріжджового екстракту в 3 л дистильованої води. Стерилізацію здійснюють в автоклаві при температурі 112°C протягом 30 хвилин. Стерильну композицію А

необхідно подати в інокулятор об'ємом 100 л, в якому знаходиться гліцерин та стерильна композиція Б.

Солі композиції Б розчиняють в 1 л питної води інтенсивно перемішуючи. Після розчинення солей додають ще 48,7 л питної води в інокулятор. При перемішуванні до розчину солей додають 6% розчин соляної кислоти для отримання значення рН – 4,5. Стерилізацію здійснюють в інокуляторі об'ємом 100л при температурі 131°C протягом 40 хвилин. До стерильної композиції Б додають стерильну композицію А та гліцерин.

Таблиця 4.3.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 60 л середовища, г(л)	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Гліцерин	50,0	3000,0	-	2,4
Дріжджовий екстракт	1,0	60,0	Композиція А	3,0
Вода		3,0		
NH ₄ Cl	1,0	60,0	Композиція Б	49,7
MgSO ₄ × 7H ₂ O	1,0	60,0		
KH ₂ PO ₄	0,2	12,0		
Вода		49,6		
Конденсат		4,9	-	4,9
Разом:				60,0

Вирощування інокуляту в в інокуляторі об'ємом 1м³

Кількість компонентів, яка необхідна для приготування 600,0 л поживного середовища приведена в таблиці 4.3.4. Зважаючи на те, що стерилізацію здійснювали в інокуляторі, потрібно врахувати конденсат -10%.

Склад поживного середовища ділимо на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: дріжджовий екстракт – режим стерилізації становить: 112°C, 30хв.

Композиція Б: NH₄Cl , MgSO₄× 7H₂O, KH₂PO₄ – режим стерилізації становить: 131°C, 40хв, рН 4,0-4,5.

Композицію А готують в інокуляторі об'ємом 10л, шляхом розчинення 0,6 кг

дріжджового екстракту в 6,0 л питної води. Стерилізація в реакторі здійснюється при температурі 112°C протягом 30 хвилин. Простерилізовану композицію А перистальтичним насосом подають у інокулятор об'ємом 1 м³ зі стерильною композицією Б та гліцерином.

Солі композиції Б завантажують в реактор – змішувач об'ємом 10 л, додають 6 л питної води. Перемішування здійснюють до повного розчинення компонентів. Після цього розчин перекачують перистальтичним насосом у інокулятор об'ємом 1 м³, доливають 510,0 л води, додають 6% розчин соляної кислоти для отримання значення рН – 4,5. Стерилізацію здійснюють в інокуляторі при температурі 131°C протягом 40 хвилин. До стерильної композиції Б додають стерильну композицію А та гліцерин.

Таблиця 4.3.4

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1,0 м³

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 600 л середовища, кг (л)	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Гліцерин	50,0	30,0	-	23,8
Дріжджовий екстракт	1,0	0,600	Композиція А	6,6
Вода		6,0		
Конденсат		0,660	-	0,660
NH ₄ Cl	1,0	0,600	Композиція Б	517,3
MgSO ₄ × 7H ₂ O	1,0	0,600		
KH ₂ PO ₄	0,2	0,120		
Вода		516,0		
Конденсат		51,7	-	51,7
Разом:				600,0

4.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³

Для цієї стадії необхідно 6,0 м³ поживного середовища. Такий об'єм поживного середовища економічно доцільніше стерилізувати в установці безперервної стерилізації. Це дозволить зменшити витрати води, пари та скоротити час обробки поживного середовища. Обираємо УБС-5 з продуктивністю 5 м³/год .

Для композиції, стерилізацію якої здійснювали в УБС-5, потрібно врахувати конденсат – 20%.

Композиція А, що в складі своєму має 6 кг дріжджового екстракту, 12,0 кг NH_4Cl , 6,0 кг $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 4,0 кг KH_2PO_4 не допускає нагріву вище 112°C , в процесі стерилізації використовується насичена водяна пара під тиском 0,3Мпа.

Розчин усіх компонентів поживного середовища готується в одному реакторі-змішувачі. Для кращого розчинення компонентів композиції в сорочку реактора можна подати пар для досягнення температури 40°C в реакторі.

Розчин солей і дріжджового екстракту, що отримали шляхом перемішування в реакторі-змішувачі, перекачують відцентровим насосом до УБС-5. В установці відбувається стерилізація насиченою паром при температурі 112°C протягом 85 хв.

Стерильну композицію А перекачують до ферментера, куди подають також гліцерин в кількості 238 л. Об'єм гліцерину, що лишився, дробно подаватиметься в процесі культивування.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м^3 наведений у табл. 4.3.5:

Таблиця 4.3.5

Склад композицій для стерилізації поживного середовища в УБС

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6 м^3 середовища, кг (л)	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Гліцерин	50	300,0 + 600,0	-	238,0 + 476,0
Дріжджовий екстракт	1,0	6,0	Композиція А	4405
NH_4Cl	2,0	12,0		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,0	6,0		
KH_2PO_4	0,66	3,96		
Вода		4377		
Конденсат		881	-	881
Разом:				6000,0

4.4. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для регуляції рН у процесі виробничого біосинтезу цільового продукту

Біосинтез з найбільшим виходом цитрату відбувається при рН 5,5, при

зниженні значення рН до 3,0 починається не бажаний для виробництва лимонної кислоти процес - синтез еритриту [5]. В процесі культивування продукт біологічного синтезу, лимонна кислота, знижує показники рН, а отже для того, щоб підтримувати значення рН оптимальним для виробництва цитрату додають 20% - й розчин NaOH.

Отже, технологічна схема виробництва лимонної кислоти включає такі додаткові стадії:

- 1) Підготовка аераційного повітря та очистка відпрацьованого повітря до вимог екологічної безпеки;
- 2) Приготування 6% розчину HCl для підкислення композиції солей (Композиція Б) до рН 4,0–4,5 перед стерилізацією в інокуляторах (об'ємом 10 л, 100 л і 1,0 м³);
- 3) Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації рН поживного середовища перед початком внесення посівного матеріалу в інокуляторах (об'ємом 10 л, 100л і 1,0 м³).
- 4) приготування та стерилізація 20% розчину NaOH для підтримання рН на рівні 5,5 упродовж виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³;

Крім того, необхідно передбачити таке обладнання:

В цеху підготовки посівного матеріалу:

- для гліцерину: реактор на 1м³, колби на 100 та 500мл;
- реактор для приготування і стерилізації 6% розчину NaOH та реактор для приготування 6% розчину HCL ;
- Колби для стерилізації композицій об'ємом 250мл, 1л, 2л, 5 л, реактори – змішувачі для приготування композицій об'ємом 10 л для вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 10 л, 100 л і 1,0 м³ відповідно;

В цеху виробничого біосинтезу:

- реактор-змішувач об'ємом 10 м³ для змішування всіх компонентів перед стерилізацією в УБС;
- реактор для 20% розчину NaOH;
- Ферментер об'ємом 10м³ для виробничого біосинтезу.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ЛИМОННОЇ КИСЛОТИ

Узагальнений перелік обладнання, що використовується під час виробничого біосинтезу лимонної кислоти наведено в таблиці 5. Обладнання представлено у графічній частині, додаток «Апаратурна схема».

Таблиця 5

Специфікація обладнання для біосинтезу лимонної кислоти

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
I-1	Інокулятор	1	Інокулятор BZLB-502 об'ємом 10 л. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L; подвійна сорочка, мішалка – 50–1000 об/хв; потужність двигуна мішалки — 0,1 кВт; датчики вимірювання рН, рО ₂ , температури, а також манометром. Габаритні розміри установки: 850×700×1250 мм. [21].
I-2	Інокулятор	1	Інокулятор HyPerforma 5:1 100 L Single-Use, об'ємом 100 л. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316 L; має сорочку, мішалку: 50-1000 об/хв; із датчиками вимірювання рН, рО ₂ , температури, біомаси, манометром; Габаритні розміри, мм: 1140×797×2010 мм [22].
P-3	Реактор для гліцерину	1	Промисловий реактор об'ємом 1 м ³ («Zhengzhou Hengxing»). Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304; тиск: 0,3 Мпа; частота обертів мішалки: 530 об/хв; з сорочкою та датчиком температури; габаритні розміри, мм: 1131 × 1130 × 1492 [23].
H-4	Перистальтичний насос	1	Перистальтичний насос для гліцерину («Акваградус»). Продуктивність: 8–10 л/хв; потужність двигуна: 0,5 кВт; максимальний робочий тиск: 3 бар; сумісний з в'язкими рідинами; матеріал корпусу: хімічно стійкий пластик; габаритні розміри, мм: 350 × 150 × 200 [24].

				НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ			
		№ докум.	Підпис				
Розроб.	Клименко О.А.			РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання для виробництва лимонної кислоти	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						1	3
Керівник	Резніченко Ю.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В.П.						

P-5	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Хімічний реактор об'ємом 10 л із сорочкою, з нержавіючої сталі (SUS304/316L). Потужність змішувача: 200 Вт; швидкість перемішування: 0–460 об/хв; робочий тиск: – 0,1-0,3 Мпа; габарити: 480 × 480 × 1560 мм[25].
H-6	Перистальтичний насос	1	Перистальтичний насос SEKO серії CR, модель SKCR0010M3000. Продуктивність: 10 л/год (0,17 л/хв); максимальний тиск: 0,1 бар; висота самовсмоктування: до 2 м; живлення: 24–240 В змінного струму[26].
P-7	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Хімічний реактор об'ємом 10 л із сорочкою, з нержавіючої сталі (SUS304/316L). Потужність змішувача: 200 Вт; швидкість перемішування: 0–460 об/хв; робочий тиск: – 0,1...0,3 Мпа; габарити: 480 × 480 × 1560 мм[25].
H-8	Перистальтичний насос	1	Перистальтичний насос SEKO серії CR, модель SKCR0010M3000. Продуктивність: 10 л/год (0,17 л/хв); максимальний тиск: 0,1 бар; висота самовсмоктування: до 2 м; живлення: 24–240 В змінного струму[26].
I-9	Інокулятор	1	Промисловий інокулятор SUB1000-C об'ємом 1м ³ («Lab1st»). Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L; розрахунковий тиск в ємності: 0,3 Мпа; частота обертів мішалки: 50–700 об/хв; з сорочкою; оснащений датчиками вимірювання рН, рО ₂ , температури, біомаси; манометром; габаритні розміри, мм: 1464 × 1202 × 2811 [28].
P-10	Реактор-змішувач композиції А	1	Промисловий реактор-змішувач об'ємом 10 м ³ («Zhejiang Jhen Ten»). Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L; розрахунковий тиск в ємності: 0,25 Мпа; частота обертів турбінної мішалки: 450 об/хв; з сорочкою та термодатчиком; оснащений датчиками температури та рівня рідини; габаритні розміри, мм: 1250 × 1250 × 2600[30].
H-11	Насос перистальтичний для перекачування композиції А від Р-10 до УБС-5	1	Verderflex Rollit (Hygienic series) Продуктивність: до 6,9 м ³ /год; Максимальний тиск: до ~4 бар; Висота самовсмоктування: ≈ 6–8 м Н ₂ О; Живлення: зазвичай 230/400 В змінного струму [29].
У-12	Установка безперервної стерилізації УБС-5	1	Матеріал: нержавіюча сталь; потужність – 5 м ³ /год; Виготовлення на замовлення.
P-13	Реактор-змішувач для приготування 20 % розчину	1	Хімічний реактор об'ємом 10 л із сорочкою, з нержавіючої сталі (SUS304/316L). Потужність змішувача: 200 Вт; швидкість

	натрію гідроксиду		перемішування: 0–460 об/хв; робочий тиск: – 0,1...0,3 Мпа; габарити: 480 × 480 × 1560 мм[25].
Н-14	Перистальтичний насос для подачі титранту	1	Перистальтичний насос SEKO KRONOS KSFM0025M1000. Продуктивність: 0,42 л/хв, тиск: 0,1 бар; регулювання швидкості: 0–100 об/хв; живлення: 230 В змінного струму [27].
Ф -15	Ферментер	1	Нержавіючий хімічний реактор об'ємом 10 000 л із сорочкою, барботером та сенсорами. Потужність змішувача: 20 кВт; швидкість перемішування: 20–150 об/хв; робоча температура: –10...+150 °С; робочий тиск: до 0,5 Мпа; матеріал: нержавіюча сталь (SS 304/316L); кількість портів: 12; оснащений: барботером; киснеміром; датчиками температури; рН-сенсором для вимірювання кислотності середовища [31].
Н-16	Насос перистальтичний для перекачування композиції А від УБС-5 до ферментера	1	Перистальтичний насос Verderflex Rollit Thru 6/9. Продуктивність: до 6,9 м³/год (≈115 л/хв); Максимальний тиск: 2 бар; Висота самовсмоктування: до 6 м; Живлення: 230/400 В змінного струму [32].
Н-17	Насос відцентровий для перекачування культуральної рідини у збірник	1	Відцентровий насос GemmeCotti НТМ 15 SS316. Продуктивність: до 6 м³/год; Максимальний напір: 16 м; Матеріал контакту з рідиною: нержавіюча сталь AISI 316; Тип герметизації: магнітна муфта (без сальника); Живлення: 230/400 В змінного струму [33].

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ЛИМОННОЇ КИСЛОТИ

В технологічній схемі виробництва лимонної кислоти продуцентом *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6 можна виділити такі стадії, як допоміжні роботи, що позначаються індексом «ДР», основний технологічний процес «ТП»[17]. До допоміжних стадій належать підготовка стерильного повітря, приготування титрантів – 6% розчини HCl та NaOH, 20% розчин NaOH, приготування та стерилізація композицій для поживного середовища. До стадій основного технологічного процесу відносять приготування посівного матеріалу, виробничий біосинтез.

ДР 1. Підготовка повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря відбувається через забірну шахту на висоті 20м.

ДР 1.2. Очищення повітря від грубих домішок

Проводять очищення повітря (від ДР 1.1) використовуючи фільтри грубого очищення, що затримують пил та механічні частинки. Ступінь очищення повітря – до 80%.

ДР 1.3. Компресування повітря

При стисканні температура повітря (від ДР 1.2) підвищується до 90-100°C на виході з повітродувної установки. Тиск при стисканні становить 0,35-0,5 Мпа.

ДР 1.4. Видалення вологи з повітря

Подача стисненого (від ДР 1.3) повітря до ресивера. Повітря охолоджується до 25-30°C, вміст вологи становить 50%.

ДР 1.5. Попереднє очищення повітря від пилу і мікроорганізмів

Очищення повітря (від ДР 1.4) здійснюється в головному фільтрі, що являє собою циліндричну ємність, що має сферичні кришку та дно. В фільтрі

					НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ		
		№ докум.	Підпис				
Розроб.	Клименко О.А.			РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу лимонної кислоти	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						1	10
Керівник	Резніченко Ю.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В.П.						

розміщені дві решітки, між якими знаходиться фільтрувальний матеріал з базальтового волокна, ступінь очищення – 99,5%.

ДР 1.6. Заключний етап очищення повітря

Заключний етап очищення повітря (від ДР 1.5) відбувається в індивідуальному фільтрі кожного з біореакторів до ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 5.7, ТП 6, ступінь очищення – 99,99%. Фільтр має вигляд металевого циліндра всередині якого фтор пластикові втулки, товщина яких складає 4мм.[14,18]

ДР 2. Приготування та стерилізація розчинів титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування 6% розчину кислоти соляної

Для запобігання утворення осаду при стерилізації розчину солей необхідно створити кисле середовище з рН 4,0-4,5. Для цього до розчину солей необхідно додати 6% розчин HCl у розрахунку 2 мл на 1 л.

Потреба в 6% розчині HCl розрахована в таблиці 2.2. Для невеликих об'ємів поживного середовища розчин HCl можна приготувати в колбі на 250 мл. Для цього необхідно взяти 22 мл HCl 36% та 110 мл води. Щоб приготування розчин соляної кислоти більшого об'єму використаємо колбу на 2 л. До 165мл HCl 36% додають до 1035 мл води.

ДР 2.2. Приготування й стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію

Потреба в 6% розчині NaOH розрахована в таблиці 2.2. Невеликий об'єм розчину NaOH 6% можна приготувати в колбі на 250 мл шляхом розчинення 8,0г NaOH в 132 мл води. Стерилізацію даного розчину здійснюють в автоклаві при 131 °C протягом 30хв. Натрій гідроксид слід додавати до води обережно, постійно помішуючи до повного розчинення. Для приготування більшого об'єму розчину NaOH 6% використаємо Колбу на 2л. Для цього 72г NaOH розчинимо в 1128 мл води. Стерилізацію даного розчину здійснюють в автоклаві при 131 °C протягом 30хв.

ДР 2.3. Приготування й стерилізація 20% розчину гідроксиду натрію

Біосинтез з найбільшим виходом цитрату відбувається при рН 5,5, при рН 3,0 починається синтез еритриту. В процесі культивування продукт

біологічного синтезу, лимонна кислота, знижує показники рН, а отже для того, щоб підтримувати значення рН оптимальним для виробництва цитрату додають 20% -й розчин NaOH. Для регулювання значення рН під час культивування необхідно приготувати 20% - й розчин гідроксиду натрію. Для приготування даного розчину титранту на 1 дм³ питної води використовують наважку пластівців NaOH вагою 200г, зважування проводять на технічних терезах. Розчин стерилізують при температурі 131°C протягом 30хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування та стерилізація 600 мл поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці.

Для приготування 600 мл поживного середовища компоненти зважують на технічних терезах. Для невеликих об'ємів поживного середовища, концентрація розчинених речовин в яких теж незначна, при визначенні об'єму води, яку потрібно додати до композицій в процесі підготовки, масою компонентів можна знехтувати. Адже при стерилізації композицій в автоклаві в результаті випаровування через ватно-марлевий корок їх об'єм зменшиться.

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах необхідно зважити 0,6 г дріжджового екстракту, наважку помістити в колбу об'ємом 1 л, додати 360 мл дистильованої води, перемішати та закрити ватно-марлевым корком. Стерилізацію здійснюють в автоклаві при температурі 112°C протягом 30 хвилин. В колбу зі стерильним дріжджовим екстрактом додають простерилізовані композиції Б та В, гліцерин, ретельно перемішують. Готове поживне середовище розливають в колби, закриті гумовими корками.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах необхідно зважити по 0,6 г NH₄Cl та MgSO₄ × 7H₂O. Наважки помістити в колбу об'ємом 250 мл, додати 180 мл дистильованої

води, перемішати та закрити ватно-марлевым корком. Стерилізацію здійснюють в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хвилин. Простерилізовану композицію Б додати до колби об'ємом 1 л з стерильною композицією А та гліцерином, додають стерильну композицію В, ретельно перемішують. Готове поживне середовище розливають в колби, закриті гумовими корками.

ДР 3.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних терезах необхідно зважити 0,12 г KH_2PO_4 , наважку помістити в колбу об'ємом 50 мл, додати 36 мл дистильованої води, перемішати та закрити ватно-марлевым корком. Стерилізацію здійснюють в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хвилин. Простерилізовану композицію В додати до колби об'ємом 1 л з стерильною композицією А та Б, гліцерином, ретельно перемішують. Готове поживне середовище розливають в колби, закриті гумовими корками.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 10 л.

Стерилізацію здійснюють в інокуляторі (І-1), тому потрібно врахувати конденсат -10%.

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах необхідно зважити 6,0 г дріжджового екстракту, наважку помістити в колбу об'ємом 2 л, додати 1,0 л води, перемішати та закрити ватно-марлевым корком. Стерилізацію здійснюють в автоклаві при температурі 112°C протягом 30 хвилин. Стерильну композицію А необхідно подати в інокулятор об'ємом 10 л, в якому знаходиться гліцерин та стерильна композиція Б.

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах необхідно зважити по 6,0 г NH_4Cl та $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, в також 1,2г KH_2PO_4 . Наважки необхідно розчинити в колбі об'ємом 2 л додавши до них 1 л води та інтенсивними обертовими рухами перемішувати до повного розчинення солей. Після розчинення компонентів розчин

переливають до інокулятора (I-1) з об'ємом 10 л та доливають залишок, призначеної для приготування композиції Б, води, а саме 2,900 л. При перемішуванні до розчину солей додають 6% розчин соляної кислоти (від ДР 2.1) для отримання значення рН – 4,5. Стерилізацію здійснюють в інокуляторі (I-1) при температурі 131°C протягом 40 хвилин. До стерильної композиції Б додають композицію А (від ДР 3.2.1) та гліцерин.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 100 л.

Зважаючи на те, що стерилізацію здійснювали в інокуляторі (I-2), потрібно врахувати конденсат -10%.

ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах необхідно зважити 60,0 г дріжджового екстракту, наважку помістити в колбу об'ємом 5 л, додати 3,0 л води, перемішати та закрити ватно-марлевим корком. Здійснити стерилізацію в автоклаві при температурі 112°C протягом 30 хвилин. Стерильну композицію А необхідно подати в інокулятор (I-2) об'ємом 100 л, в якому знаходиться гліцерин та стерильна композиція Б (від ДР 3.3.2).

ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах необхідно зважити по 60,0 г NH_4Cl та $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, в також 12,0 г KH_2PO_4 . Наважки необхідно розчинити в колбі об'ємом 2 л додавши до них 1 л води та інтенсивними обертливими рухами перемішувати до повного розчинення солей. Після розчинення компонентів розчин переливають до інокулятора (I-2) з об'ємом 100 л та доливають залишок, призначеної для приготування композиції Б, води, а саме 48,6 л. При перемішуванні до розчину солей додають 6% розчин соляної кислоти (від ДР 2.1) для отримання значення рН – 4,5. Стерилізацію здійснюють в інокуляторі (I-2) при температурі 131°C протягом 40 хвилин. До стерильної композиції Б додають композицію А (від ДР 3.3.1) та гліцерин.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 1м³.

Зважаючи на те, що стерилізацію здійснювали в інокуляторі (І-9), потрібно врахувати конденсат -10%.

ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах необхідно зважити 600г дріжджового екстракту, наважку поміщають в реактор – змішувач (Р-5) об'ємом 10 л та додають 6 л води. Стерилізація в реакторі здійснюється при температурі 112°C протягом 30 хвилин. Простерилізовану композицію А перистальтичним насосом (Н-6) подають у інокулятор (І-9) об'ємом 1 м³ зі стерильною композицією Б (від ДР 3.4.2) та гліцерином.

ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах необхідно зважити по 600,0 г NH₄Cl та MgSO₄×7H₂O, в також 120,0 г KH₂PO₄. Наважки завантажують в реактор – змішувач (Р-7) об'ємом 10 л, додають 6 л води. Перемішування здійснюють до повного розчинення компонентів. Після цього розчин перекачують перистальтичним насосом (Н-8) у інокулятор (І-9) об'ємом 1 м³, доливають 510,0 л води, додають 6% розчин соляної кислоти (від ДР 2.1) для отримання значення рН – 4,5. Стерилізацію здійснюють в інокуляторі (І-9) при температурі 131°C протягом 40 хвилин. До стерильної композиції Б додають композицію А (від ДР 4.2.1) та гліцерин, що перекачується від реактора (Р-3) перистальтичним насосом (Н-4).

ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³

Зважаючи на те, що стерилізацію однієї з композицій здійснювали в УБС (У-12) потрібно врахувати конденсат – 20%.

ДР 3.5.1. Приготування і стерилізація композиції А в УБС-5

Композиція А, що в складі своєму має 6 кг дріжджового екстракту, 12,0 кг NH₄Cl, 6,0 кг MgSO₄×7H₂O, 4,0 кг KH₂PO₄ не допускає нагріву вище 112°C, в процесі стерилізації використовується насичена водяна пара під тиском 0,3Мпа.

В реактор-змішувач (Р-10) подають перераховані компоненти поживного середовища, зважені на ваговому дозаторі, додають 4377 л води та запускають процес перемішування.

Для кращого розчинення компонентів композиції в сорочку реактора (Р-10) можна подати пар для досягнення температури 40°C в реакторі. Розчин солей і дріжджового екстракту, що отримали шляхом перемішування в реакторі-змішувачі (Р-10), перекачують перистальтичним насосом (Н-11) до УБС-5 (У-12). В установці відбувається стерилізація насиченою парою при температурі 112°C протягом 85 хв.

Стерильну композицію А перекачують до ферментера (Ф-15), куди подають також гліцерин з реактора (Р-3) перистальтичним насосом (Н-4) в кількості 238 л. Об'єм гліцерину, що лишився, дробно подаватиметься в процесі культивування до ТП 6 кожні 28 годин.

ДР 4. Підготовка та зберігання гліцерину для виробничого біосинтезу

Для того, щоб приготувати поживне середовище для виробничого біосинтезу необхідно 300,0 л гліцерину, в процесі культивування дробно додають ще 600,0 л гліцерину, що зберігається в збірнику (Р-3) об'ємом 1 м³, при температурі 25°C та постійному перемішуванні 70 об/хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6

ТП 5.1. Підтримання культури в музеї культур

Музейну культуру *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6 зберігають у пробірках на скошеному поживному середовищі УМ при температурі 4,0°C.

Пересів на свіже середовище проводять щомісяця при дотриманні асептичних умов.

ТП 5.2. Отримання робочої культури на чашках Петрі

Музейну культуру в асептичних умовах висівають на чашки Петрі на мінеральне середовище для мікрокультур Spark Tecan [8], зі складом г/л : гліцерин — 20; NH₄Cl — 9,6; KН₂PO₄ — 2,0; MgSO₄ × 7H₂O — 1,4 та тіамін — 3 мкг/л. Інкубація в термостаті відбувається при температурі 28,5-29,5°C протягом 48 годин.

ТП 5.3 Вирощування інокуляту в пробірках

Ізольовані колонії з чашок Петрі (від ТП 5.2.) пересівають за допомогою петлі в пробірки на скоси з середовищем для приготування інокуляту. [8] Інкубація в термостаті відбувається при температурі 28,5-29,5°C протягом 24 годин.

ТП 5.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

З дотриманням асептичних умов в колбу об'ємом 1 л зі стерильною композицією А (від ДР 3.1.1.) додають гліцерин та простерилізовані композиції Б (від ДР 3.1.2) та В (від ДР 3.1.3.). Перемішують, та розливають по 150 мл в колби Ерленмейєра об'ємом 750 мл.

У пробірку з одержаною робочою культурою *Y.lipolytica* 1.31.GUT1/6 (від ТП 5.3.) вносять 5 мл 0,9% розчину NaCl, суспендують клітини, і піпеткою переносять бактеріальну суспензію в качалочні колби з поживним середовищем. Інкубують на роторному шейкері при температурі 29°C та 140 об/хв протягом 72 годин.

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

В інокуляторі (І-1) з поживним середовищем (від ДР 3.2.) вмикають мішалку, 6% розчином NaOH (від ДР 2.2) доводять значення рН до 5,5. Культуру, що виросла в колбах на качалках (від ТП 5.4.) вносять у апарат з поживним середовищем через засівну колбу. Вносять з розрахунку 1г біомаси продуцента на 1 л поживного середовища в посівному апараті. Температуру підтримують на рівні 29,5°C шляхом подачі питної води з температурою 20°C. Стерильне повітря (від ДР 1.6) подається через барботер на рівні 0,8 л/хв, частота обертання мішалки – 800 об/хв. Коефіцієнт заповнення апарату – 0,6. Культивують протягом протягом 72 годин.

ТП 5.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 100 л

В інокуляторі (І-2) з поживним середовищем (від ДР 3.3.) вмикають мішалку, 6% розчином NaOH (від ДР 2.2) доводять значення рН до 5,5.

Культуру, що виросла в інокуляторі (І-1) (від ТП 6.5.) вносять у апарат об'ємом 100 л (І-2) з поживним середовищем, перекачуючи стерильним трубопроводом. Вносять 6 л культури. Температуру підтримують на рівні 29,5°C. Стерильне повітря (від ДР 1.6) подається через барботер на рівні 0,8 л/хв, частота обертання мішалки – 200об/хв. Коефіцієнт заповнення апарату – 0,6. Культивують протягом протягом 72 годин.

ТП 5.7. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 1м³

В інокулятор (І-9) з поживним середовищем (від ДР 4.4.) при перемішуванні подають 6% розчином NaOH (від ДР 2.2), доводять значення рН до 5,5. Культуру (від ТП 5.6.) , що виросла в інокуляторі(І-2) вносять у апарат об'ємом 1000 л (І-9) з поживним середовищем, перекачуючи стерильним трубопроводом. Вносять 60л культури. Температуру підтримують на рівні 29,5°C. Стерильне повітря (від ДР 1.6) подається через барботер на рівні 0,8 л/хв, частота обертання мішалки – 200 об/хв. Коефіцієнт заповнення апарату – 0,6. Культивують протягом протягом 72 годин.

ТП 6. Виробничий біосинтез у ферментері з об'ємом 10м³

У попередньо простерилізований та перевірений ферментер (Ф-15) з об'ємом 10 м³ за допомогою перистальтичного насосу перекачують компоненти поживного середовища для біосинтезу лимонної кислоти. Гліцерин надходить з 1м³ реактора (Р-3), композиція А (від ДР 3.5.1.) перекачується від УБС-5 (У-12) в якому відбувався процес стерилізації з дотриманням асептичних умов, після стерилізації та охолодження, з реактора (Р-13) перистальтичним насосом (Н-14) подається 20% - й розчин NaOH (від ДР 2.3) для регуляції значення рН до 5,5. Культуру стерильним трубопроводом від інокулятора (І-9) на 1 м³ (від ТП 5.7) перекачують до ферментеру в кількості – 600 л.

В процесі культивування, що триває 168 годин, значення рН важливо тримати на рівні 5,5. Це досягається автоматичним вимірюванням значення рН в об'ємі та регулюванням цього значення подачею 20% р-ну NaOH (від

ДР 2.3) через автоматичну систему дозування. Культивування відбувається при постійній аерації, стерильне повітря (від ДР 1.6.) через барботер надходить у ферментер на рівні 0,8 л/хв, частота обертання мішалки – 200 об/хв. Коефіцієнт заповнення апарату – 0,6.

Кожні 28 годин вноситься підживлення – гліцерин. Гліцерин з резервуару (Р-3) подається (від ДР 4) в концентрації 20 г/л, що становить 120 кг (95 л) гліцерину за одне підживлення.

Вирощують культуру до набрання максимальної концентрації біомаси у значенні 5 г/л. Після закінчення процесу виробничого біосинтезу отриману культуральну рідину за допомогою відцентрового насосу (Н-17) відкачують.

РОЗДІЛ 7. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЛИМОННОЇ КИСЛОТИ

Одними із значущих етапів біотехнологічного процесу виробництва лимонної кислоти є етапи виділення та очищення. Саме ці стадії формують якість та споживчу цінність кінцевого продукту.

У випадку біосинтезу лимонної кислоти важливе значення має не лише її кількісний вихід, але й ступінь очищення від клітинної маси, побічних продуктів метаболізму та мінеральних домішок.

Високий рівень чистоти лимонної кислоти забезпечує широкий перелік галузей промисловості, для її використання, підвищує її конкурентну здатність серед інших виробників лимонної кислоти.

Технічна лимонна кислота має найменшу собівартість, використовується в процесах і виробництвах, де не висувається жорстких вимог до фармакопейної чистоти продукту. Наприклад, у виробництві чистячих та миючих засобів, засобів для видалення накипу.

Харчова лимонна кислота має відповідати вимогам стандартів та сертифікатів якості, бути хімічно чистою, не мати сторонніх запахів та кольору. Застосовується в багатьох виробництвах харчової промисловості.

Фармакопейна лимонна кислота має найвищий клас чистоти, має відповідати вимогам Державної фармакопеї України, гармонізованої з Європейською фармакопеєю. Контролюється вміст важких металів, мікробіологічна чистота, обов'язкове дотримання меж для зольності та домішок. Фармакопейна лимонна кислота застосовується для виробництва інфузійних розчинів, лікарських засобів, біомедичних препаратів, буферних систем.

Літературні джерела виділяють також лимонну кислоту з дуже високою хімічною чистотою, що застосовується в лабораторній практиці для

					НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ		
		<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Клименко О.А.</i>			РОЗДІЛ 7. Основні етапи виділення та очищення лимонної кислоти	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>						1	10
<i>Керівник</i>	<i>Резніченко Ю.М.</i>				Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>							
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>						

проведення аналітичних досліджень. Досить дорого вартісна та не є економічно доцільною для масштабного виробництва.

Лимонну кислоту, що буде отримано в процесі біологічного синтезу, планується використовувати у складі «Антикоагулянтного і консервуючого розчину для крові людини». Отже до неї висуваються підвищені вимоги щодо чистоти та безпечності. Лимонна кислота повинна відповідати фармакопейним стандартам, вимогам Державної фармакопеї України (ДФУ) та Європейської фармакопеї (Ph.Eur.), які гарантують відсутність шкідливих домішок, контроль зольності, відсутність важких металів, а також мікробіологічну чистоту.

7.1 Виділення лимонної кислоти з культуральної рідини після здійснення біосинтезу *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6

Після завершення виробничого біосинтезу, що тривав 168 годин, у ферментері об'ємом 10м³ утворюється культуральна рідина. В ній містяться залишки поживного середовища, біомаса дріжджів, побічний продукт метаболізму – ізолимонна кислота, та цільовий продукт – лимонна кислота в концентрації - 60,4г/л[5].

7.1.1. Обґрунтування стадії відділення біомаси дріжджів *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6

Відділення біомаси з дріжджових клітин продуцента *Y.lipolytica* 1.31.GUT1/6 від культуральної рідини базується на розділенні твердої (клітини) та рідкої (супернатант) фаз.

Найчастіше з метою розділення фаз використовуються такі методи, як центрифугування, фільтрація, сепарація та інколи флотація. Кожен з цих методів, в залежності від властивостей культури та вимог до подальшої очистки, має свої переваги та недоліки.

Центрифугування являє собою метод розділення рідких неоднорідних систем під дією відцентрових сил. Широко застосовується у мікробіологічній промисловості для відокремлення твердої фази, в якій містяться клітини мікроорганізмів, амінокислоти, ферменти від рідкої фази

в якій містяться продукти біосинтезу. Забезпечує отримання супернатанту максимальної чистоти для подальшого виділення цільового продукту.

Використовують цей метод за умов поганого фільтрування осаду, за потреби одержання біомаси, чистої від допоміжних фільтрувальних матеріалів, задля безперервного процесу в стерильних умовах. Перевагою є висока продуктивність, компактні розміри обладнання, а недоліком виступає негативна дія відцентрової сили і температури на клітини [19,34].

Фільтрування – пропускання культуральної рідини через пористу перегородку – фільтр. Підходить для виробництв, де цільовий продукт розчинений у культуральній рідині. Основною характеристикою оцінювання даного процесу є швидкість фільтрації. Також фільтрація є простим, зручним методом, селективним і енергонезатратним [19].

Сепарування - . Застосування сепарування дає можливість швидко обробляти великі обсяги суспензій, які важко фільтруються. Проте сепаратори мають істотний недолік, дуже швидко мундштуки та міжтарільчатий простір забивається механічними включеннями та дріжджовими клітинами. Поліпшити це може застосування попередньо стадії флотації, та це збільшить час оброблення, а отже і отримання цільового продукту [19].

На мою думку, найдоцільнішим способом відділення біомаси з метою отримання чистого супернатанту при виробництві лимонної кислоти є сепарація.

Y.lipolytica 1.31.GUT1/6 є дріжджовою культурою. У промисловості для розділення дріжджових суспензій використовують переважно сепаратори безперервної дії.

Рекомендується використовувати сепаратори з сопловим або клапанним вивантаженням осаду. Вони забезпечують безперервне відведення всіх фракцій, які утворюються. Даний метод дозволяє повністю механізувати процес вивантаження осаду під дією відцентрової сили, а завдяки пакету

конічних тарілок збільшується поверхня осадження, що забезпечує якісне відділення клітин навіть при високій продуктивності [19].

Пропонується використання компактного дискового сепаратора Alfa Laval Clara 20 від шведського виробника Alfa Laval Corporate AB, що призначений для ефективного розділення твердої і рідкої фаз у суспензіях при ферментації. Серія Clara має перевірену ефективність і забезпечує якісне видалення біомаси з мінімальними втратами продукту.

Основні характеристики: Дисковий сепаратор з верхнім приводом, потужність двигуна складає 4кВт, продуктивність складає до 4000л/год, всі частини, що контактують з поживним середовищем виготовлені з дуплексної нержавіючої сталі ASTM/UNS S31803, трубопроводи з нержавіючої сталі AISI 316L, рама та корпус з нержавіючої сталі AISI 304, а ущільнення і прокладки – з матеріалів, що схвалені для фармацевтичних і харчових виробництв. Сепаратор дозволяє автоматично очищувати його без демонтажу. Габаритні розміри складають 1900×665×1430мм [36].



Рис. 7.1.1.1. «Дисковий сепаратор Alfa Laval Clara 20»

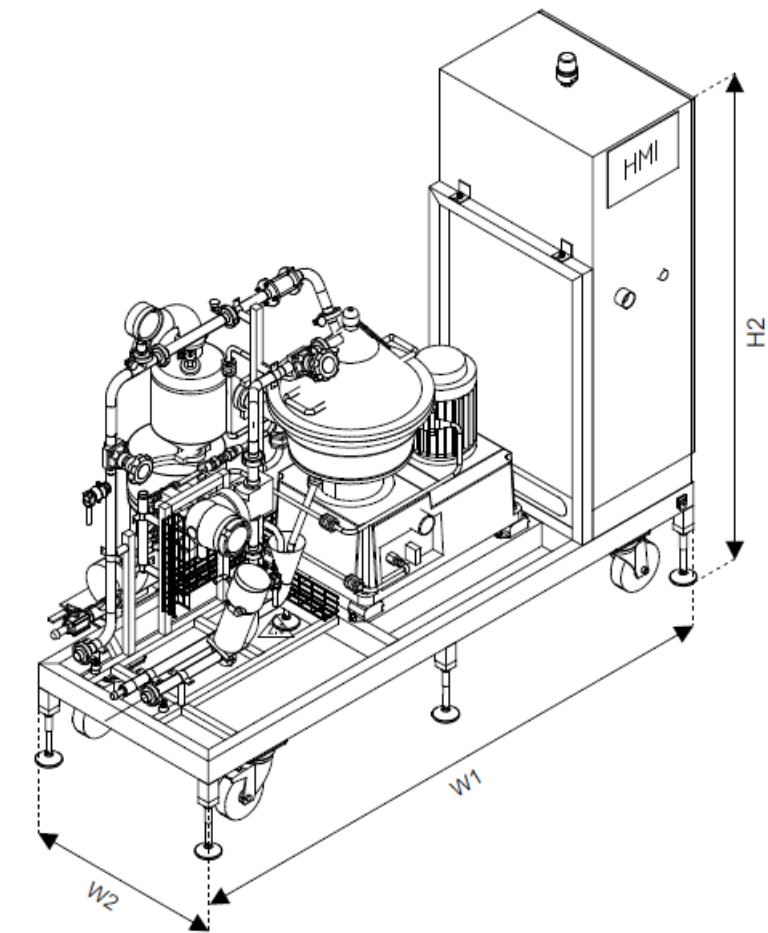


Рис.7.1.1.2 «Розмірне креслення дискового сепаратора Alfa Laval Clara 20»

Відділена біомаса збирається в збірники та транспортується для її подальшого знешкодження. Розчин кислот або супернатант направляється до наступного етапу – виділення лимонної кислоти.

7.1.2 Обґрунтування та вибір методу виділення та очищення лимонної кислоти

Сучасні дослідження, що присвячені біотехнологічному виробництву лимонної кислоти, значну увагу приділяють етапам її виділення та очищення, оскільки саме вони визначають якість та подальше використання отриманого продукту. Проаналізувавши основні методи з виділення та концентрування органічних кислот з культуральної рідини можна сказати що найбільш поширеними є: мембранна фільтрація, екстрагування, а саме

реакційна екстракція, класичний метод осадження лимонної кислоти з обробленням вапняним молоком, адсорбція.

Мембранна фільтрація, така як нанофільтрація чи ультрафільтрація дозволяє відокремлювати високомолекулярні домішки та частково концентрувати лимонну кислоту без внесення додаткових реагентів. Процес ультрафільтрації зазвичай здійснюється при робочому тиску 0,1-0,3 МПа та температурі 20-35°C зі застосуванням полімерних мембран. Нанофільтрація проводиться за підвищеного тиску 1,0-3,0 МПа, поріг відсівання 200-500 дальтон. Також дає можливість частково концентрувати органічні кислоти в 1,5-2,0 рази.

Оптимальне значення рН для мембранної фільтрації становить 2,0-3,5, що мінімізує осадження солей кальцію чи магнію на поверхні мембран.

Проте мембранні процеси мають обмежену селективність щодо ізомерів лимонної кислоти, зокрема ізолимонної кислоти, а також мають значну схильність до забруднення мембран, що ускладнює їх тривалу експлуатацію. У зв'язку з цим використання мембранних технологій доцільніше розглядати як попередню стадію підготовки розчину, а не як основний метод очищення фармакопейного продукту [19,35,46].

Метод реакційної екстракції ґрунтується на перенесення лимонної кислоти в органічну фазу за участі спеціальних екстрагентів, що утворюють з нею комплекси. Проводиться за умов атмосферного чи злегка підвищеного тиску 0,1-0,3 МПа, рН -1,5-2,5, і значення температури 20-35°C.

Найбільш поширеними екстрагентами є третинні аміни, наприклад три-*n*-октиламін (ТОА), який зазвичай розчиняється в інертних органічних розчинниках, керасині чи ізооктані. Він здатен демонструвати високий коефіцієнт екстракції лимонної кислоти за значень рН 1,5-2,5 та температури 20-30°C, однак потребує ретельної стадії зворотної екстракції.

Також застосовуються фосфорорганічні екстрагенти, зокрема три-*n*-бутилофосфат (ТВР) та ді-(2-етилгексил)фосфорну кислоту (D2ЕНРА). Ці речовини забезпечують стабільне зв'язування органічних кислот.

Розчинниками-носіями виступають керосин, додекан, гексан, ізооктан. Для зворотної екстракції лимонної кислоти з органічної фази використовують водні розчини карбонату натрію чи гідроксиду натрію 0,1-1,0М [47, 48].

Незважаючи на те, що процес відбувається зі значною швидкістю, та дає можливість працювати з розбавленими розчинами в даному методі використовуються органічні розчинники. Це суттєво обмежує його застосування у фармацевтичній галузі, а також підвищує вартість очищення, що відобразиться на собівартості готового продукту.

Додаткові складнощі також виникають на стадії регенерації екстрагентів, та на стадії очищення кінцевого продукту від слідів органічної фази. Це здійснює негативний вплив на економічну та технологічну ефективність технології [19,34].

Традиційні методи, зокрема упарювання з подальшою кристалізацією, досі широко використовуються у промисловому виробництві лимонної кислоти. Процес упарювання відбувається за температури 70-90°C, під атмосферним чи частково вакуумним тиском 0,1-0,2МПа. Для кристалізації використовується CaCO_3 або Ca(OH)_2 для утворення цитрату кальцію, з подальшим обробленням водою або розчином H_2SO_4 . Кристалізацію проводять у вакуумному кристалізаторі, охолоджуючи розчин лимонної кислоти нижче 35°C, або підігрівуючи до 62°C, залежно від форми продукту – моногідрат чи безводна. Для мінімізування втрат продукту перед кристалізацією концентрація лимонної кислоти в розчині має складати до 700 г/л [49].

Та нажаль ці процеси не забезпечують селективного видалення домішок, оскільки під час упарювання концентруються всі розчинені компоненти культуральної рідини. Тому використання такого роду методів можливе лише після попереднього глибокого очищення розчину [19,35].

Адсорбційні методи ґрунтуються на селективному зв'язуванні молекул лимонної кислоти поверхнею твердого сорбенту, зазвичай іонообмінної чи полімерної природи. При цьому більшість розчинених компонентів, що

містяться в супернатанті, зокрема залишкові субстрати, барвники, білкові домішки, мінеральні солі, не взаємодіють з сорбентом і виводяться на стадії промивання. Це дозволяє отримати високий ступінь очищення продукту. Окрім того метод адсорбції не потребує органічних розчинників, що підвищує безпечність процесу та зменшення ризику контамінації готового продукту токсичними домішками. Недоліком даного методу є відносно висока вартість якісних сорбентів і необхідність їх регенерації. Однак у промислових умовах ці фактори компенсуються можливістю багаторазового використання адсорбентів і стабільністю отримуваної якості продукту [19,35].

Оцінивши вимоги до якості лимонної кислоти та планування, щодо використання її в складі антикоагулянтного та консервуючого розчину для крові людини, найбільш обґрунтованим є вибір адсорбційного методу, як основного етапу відділення та очищення цільового продукту. Він дозволить забезпечити досягнення високого ступеня чистоти, мінімізує ризик потрапляння сторонніх домішок.

Освітлений супернатант після відділення біомаси може безпосередньо подаватися на адсорбційну колону, оскільки для ефективного зв'язування лимонної кислоти попереднє концентрування розчину не є обов'язковим. У промислових умовах процес реалізується в колонних адсорберах із можливістю регенерації сорбенту, що дозволяє забезпечити стабільну роботу установки та відтворювану якість кінцевого продукту.

У роботі Mores et al.(2021)[35] описано ефективний метод очищення лимонної кислоти з використанням колонного адсорбційного апарата. Для селективного виділення кислоти застосовується вертикальна колонна система періодичної дії, що заповнена полі(4-вінілпіридиновою) (PVP) смолою, яка забезпечує високу селективність адсорбції лимонної кислоти та можливість регенерації адсорбенту водними сольовими чи спиртовими розчинами. Об'єм колони при обробці до 6м^3 супернатанту становить $0,15-0,2\text{м}^3$, висота колони $2,0\text{м}$, а діаметр становить $0,35-0,4\text{м}$. Швидкість подачі

супернатанту встановлюють на рівні 1-2BV/год, що забезпечує повний контакт рідини зі стаціонарною фазою. Температура процесу підтримується на рівні 25-30°C, а рН розчину на вході колони становить 2,5-3,0 після центрифугування та відділення біомаси.

Для елюції, тобто вимивання лимонної кислоти із смоли, використовують 0,1-0,2 М розчин цитрату натрію або 0,1М розчин NaCl, що забезпечує повне відділення продукту зі збереженням фармакопейної чистоти $\geq 99\%$. Продуктивність устаткування дозволяє обробити за один цикл увесь об'єм супернатанту, при цьому час одного циклу, включаючи елюцію та регенерацію сорбенту, становить 3-4 год.

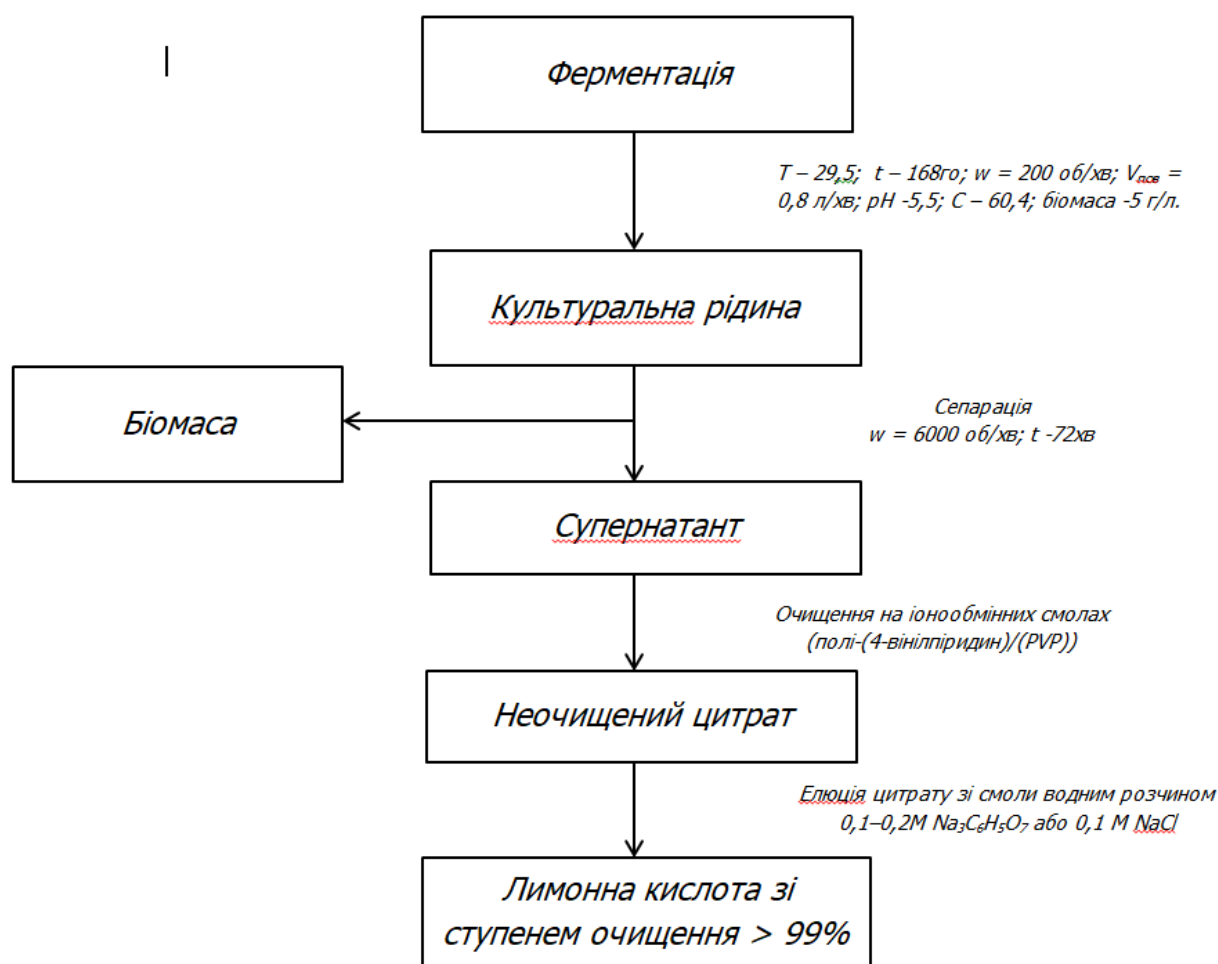


Рис. 7.2 «Узагальнена блок-схема етапів виділення лимонної кислоти»

Обладнання, що пропонується для реалізації цього етапу, виготовлено компанією CXRD Machine Co., Ltd (Китай). Модель представлена як Stainless Steel Preparative Chromatography Column з діаметром 0,35м та

висотою 2,0м. Корпус колони виготовлений з нержавіючої сталі AISI 316L і відповідає стандартам GMP. Регенерація сорбенту здійснюється шляхом промивання водним розчином та 0,1М NaOH або NaCl, при цьому використовується система CIP/SIP для стерилізації обладнання [37].

Даний метод дозволяє отримати лимонну кислоту фармакопейної чистоти, готову для подальшого концентрування чи кристалізації, при цьому не потребує попереднього концентрування супернатанту. Адсорбційна колона забезпечує високу селективність, можливість регенерації сорбенту, інтегрується в технологічний потік періодичної чи напівбезперервної дії, що робить її використання оптимальним рішенням.

РОЗДІЛ 8. КІНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ЛИМОННОЇ КИСЛОТИ

Впродовж культивування періодично (кожні 8 години) відбирають проби культуральної рідини під час культивування продуцента в інокуляторах та культуральної рідини під час виробничого біосинтезу для проведення мікробіологічного контролю, а також для здійснення технологічного контролю показників росту та біосинтезу. Контролюють концентрацію лимонної кислоти і біомаси продуцента *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6, рівень джерела азоту та вуглецю у середовищах.

8.1 Мікробіологічний контроль

Культивування *Yarrowia lipolytica* 1.31.GUT1/6 здійснюється в асептичних умовах. Саме тому мікробіологічний контроль необхідно проводити на кожному етапі, щоб підтвердити відсутність контамінації, або ефективно відреагувати у разі її виявлення.

В загальному, мікробіологічний контроль включає в себе комплекс заходів, що дозволяє виявити, надати якісну та кількісну оцінку мікроорганізмам. Регулярне здійснення мікробіологічного контролю необхідне для забезпечення стерильності та безпечності виробничого процесу, виконання вимог до класів чистоти приміщень, надання документованого підтвердження тому, що виробничий процес здійснювався згідно технологічним вимогам, і продукт є безпечним.

Мікробіологічний контроль здійснюється до всіх ймовірних джерел контамінації: повітря робочої зони та аераційне повітря, вода, обладнання, одяг та руки персоналу, стерильні поживні середовища.

Дослідження мікробіологічної чистоти культури *Yarrowia lipolytica* має бути обов'язковим і регулярним, здійснюватися не рідше одного разу на місяць. Контроль відбувається шляхом мікроскопічного аналізу та прямим висівом на агаризовані поживні середовища [38,2].

					НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ		
		№ докум.	Підпис				
Розроб.	Клименко О.А.			РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва лимонної кислоти	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						1	6
Керівник	Резніченко Ю.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В.П.						

8.1.1. Контроль шляхом прямого посіву

Перевірка мікробіологічної чистоти біологічного агента

Прямий посів виконують на YM-агар, який зазвичай використовується для культивування дріжджів, плісняви та інших ацидофільних організмів. Це середовище виготовляється із суміші дріжджового екстракту, декстрози, солодового екстракту та пептону. YM-агар та бульйонні середовища забезпечують організми джерелом мікроелементів, вітамінів, амінокислот, вуглецю та білка [2]. Культивують в термостаті відбувається при температурі 28,5-29,5°C протягом 120 годин. Через 5 днів на середовищі YM колонії мають вигляд від маслянистих до міцеліальних та коричнево-білого кольору [43,44].

Перевірка стерильності середовищ

Стерильною бактеріологічною петлею пробу поживного середовища розсівають штрихом по поверхні агаризованого середовища – МПА або сусло-агару. Після цього чашки інкубують протягом 3 діб при температурі 37±1°C для виявлення бактерій та 24-26°C для виявлення грибів та дріжджів. Опісля інкубації розглядають чашки на наявність росту по штриху. Ріст має бути відсутнім.

8.1.2. Контроль мікроскопіюванням

Мікроскопування проводять у світловому мікроскопі з використанням імерсійної системи. Для цього готують фіксований мазок. У центр чистого, знежиреного предметного скла наносять краплю фізіологічного розчину та з допомогою бактеріологічної петлі додають невелику кількість культуральної рідини. Суміш ретельно перемішують і рівномірно розподіляють по склу. Мазок висушують при кімнатній температурі, після чого фіксують, повільно проводячи скло над полум'ям пальника три–чотири рази нижньою поверхнею догори.

На висушений і зафіксований препарат наносять краплю імерсійної олії, встановлюють об'єктив 90× та, дивлячись збоку, обережно опускають тубус так, щоб об'єктив занурився в олію, але фронтальна лінза не торкнулася

скла. Після цього, спостерігаючи через окуляр, макрогвинтом обережно піднімають тубус до появи зображення та фіксують об'єктив, а точне фокусування виконують за допомогою мікрогвинта.

Після завершення мікроскопічного огляду тубус мікроскопа піднімають, препарат обережно прибирають, а поверхню фронтальної лінзи очищують від залишків імерсійної олії, щоб запобігти її накопиченню та забезпечити чіткість подальших спостережень.

На мікроскопічному рівні *Yarrowia lipolytica* демонструє помітну різноманітність морфологічних форм. Поряд із типовими дріжджоподібними клітинами, що можуть бути кулястими, еліпсоїдними або трохи видовженими, часто видно їхнє розташування у вигляді поодиноких елементів, пар або компактних невеликих груп. У полі зору можуть з'являтися й тонкі видовжені клітини, інколи схожі на вузькі трубчасті структури. Таке поєднання двох різних морфотипів — дріжджового та ниткоподібного — є характерним для диморфних грибів і свідчить про їхню здатність змінювати форму залежно від умов.

Морфологічний профіль *Y. lipolytica* значною мірою залежить від зовнішніх факторів: наявності поживних речовин, рН, температури та інших параметрів середовища. За сприятливих умов переважає дріжджова форма, тоді як зміна ресурсів або стресові фактори можуть стимулювати перехід до ниткоподібного типу росту. Розміри окремих дріжджоподібних клітин зазвичай варіюють у межах 3–10 мкм, вони залишаються нерухомими та мають чіткі контури, що добре вирізняються при спостереженні за високого збільшення [39,42,44].



Рис. 5.1 «Макроколонії *Y. Lipolytica* на агаризованому середовищі УМ (ліворуч), мікроскопічне зображення клітин (праворуч)»

Ліворуч зображено колонії *Yarrowia lipolytica*, що ростуть на агарі для підрахунку в чашці Петрі в лабораторії. Кожна колонія походить з однієї дріжджової клітини та розрослася. Праворуч – мікроскопічне (1000-кратне збільшення) зображення клітин *Yarrowia lipolytica*. Суміш гіф та дріжджових клітин утворює хвилясті колонії, показані ліворуч [40,43,44].

8.2 Визначення концентрації цільового продукту

Зразки культури (10 мл) відбирають з ферментера, центрифугують 10 хвилин при 5000 об/хв при температурі 4°C, та фільтрують на мембранному фільтрі з розміром пор 0,45мкм. Концентрацію лимонної кислоти вимірюють в супернатанті за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Для аналізу лимонної кислоти використовують Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 HPLC System [41] з колонкою Carbohydrate H⁺ (Thermo Scientific, Waltham, MA), з'єднаної з УФ-детектором ($\lambda = 210$ нм) та детектором показника заломлення (Shodex, Oigimachi, Японія). Колонку елюють 25 М трифтороцтовою кислотою при 65 °C та швидкості потоку 0,6 см³ хв⁻¹. Визначення рівня рН проводять потенціометричним методом.

8.3 Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси визначають ваговим методом. Біомасу, на висушеному до постійної ваги фільтрі, сушать на ваговій сушарці (RADWAG MAC 110/NH, Радом, Польща) при 105 °C до постійної ваги.

Знову зважують, та розраховують різницю між кінцевою та початковою вагою фільтра, поділену на об'єм культуральної рідини, що використана (якщо використовувався об'єм) або просто фіксують як суху вагу (якщо використовувався осад).

8.4 Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом Карбону при культивуванні є гліцерин. Для визначення концентрації гліцерину в культуральній рідині можна використати комбінований метод, в якому поєднані реакція Малапрада та реакція Ганча. Принцип методу полягає в дії періодату натрію (NaIO_4) на гліцерин, в результаті чого той окиснюється до формальдегіду. Утворений формальдегід взаємодіє з ацетилацетоном в ізоаміловому спирті та утворює забарвлену сполуку з назвою 3,5-діацетил-1,4-дигідролутидин. За інтенсивністю його забарвлення визначають концентрацію формальдегіду. Концентрацію 3,5-діацетил-1,4-дигідролутидину визначають спектрофотометрично вимірюванням оптичної густини при довжині хвилі 410 нм.

Пробу готують відбираючи 10 мл культуральної рідини з ферментера, центрифугують 10 хвилин при 5000 об/хв центрифугують 10 хвилин при 5000 об/хв для вилучення біомаси. Отриманий супернатант використовують для дослідження вмісту гліцерину. 0,2 мл розчину вносять в пробірку, додають 0,2 мл періодату натрію, інкубують 10 хв, додають 0,6 мл розчину ацетилацетону, перемішують, вимірюють оптичну густину. Концентрацію гліцерину розраховують за допомогою калібрувального графіку, що побудований з використанням стандартних розчинів гліцерину [39].

8.5 Визначення концентрації джерела азоту

Джерелом Нітрогену в поживному середовищі є хлорид амонію. Визначення вмісту хлориду амонію використовується реакція з реактивом Неслера. Для цього в мірну колбу об'ємом 50 мл вносять 100мкл попередньо відділеного від біомаси супернатанту, до мітки доводять дистильованою водою, додають 1 мл реактиву Неслера, інкубують 10 хв при кімнатній температурі, та

на спектрофотометрі (MAPADA V-1200, Китай) вимірюють оптичну густину при 430 нм. Концентрацію амонію розраховують за допомогою калібрувального графіку, що побудований з використанням стандартних розчинів амоній-іону[40].

Список літератури:

1. Ксьонжек, Е. Лимонна кислота: властивості, мікробне виробництво та застосування в промисловості. Молекули 2024, 29 (1), 22. <https://doi.org/10.3390/molecules29010022>
2. Rakicka, M., Wolniak, J., Lazar, Z. та ін. Виробництво високого титру лимонної кислоти з інуліну. ВМС Biotechnol 19 , 11 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0503-0>
3. Citric Acid. (n.d.). Molecule of the Week Archive. American Chemical Society. Retrieved from <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/c/citric-acid.html>
4. Історія відкриття лимонної кислоти. (б.д.). Zbaqchem. Retrieved from <https://ua.zbaqchem.com/news/what-is-the-history-of-citric-acid-discovery-60010075.html>
5. Rywińska, A.; Tomaszewska-Hetman, L.; Lazar, Z.; Juszczak, P.; Sałata, P.; Malek, K.; Kawecki, A.; Rymowicz, W. Application of New *Yarrowia lipolytica* Transformants in Production of Citrates and Erythritol from Glycerol. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 1475. <https://doi.org/10.3390/ijms25031475>
6. Національний центр біотехнологічної інформації (2025). Резюме PubChem Compound для CID 311, лимонна кислота. Отримано 23 березня 2025 року з <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Citric-Acid>
7. ДСТУ ГОСТ 908:2006 Кислота лимонна моногідрат харчова. Технічні умови (ГОСТ 908-2004, IDT)
8. Sutherland, J. B., Cornelison, C., & Crow, S. A. (2014). CANDIDA | *Yarrowia lipolytica* (*Candida lipolytica*). Encyclopedia of Food Microbiology, 374–378. doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00056-2
9. Darvishi Harzevili F. *Biotechnological Applications of the Yeast Yarrowia lipolytica*. SpringerBriefs in Microbiology. Springer Nature, Cham, 2014. Available at: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-06437-6>

10. Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Delisi, R., & Pagliaro, M. (2017). *Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product*. *Chemistry Central Journal*, 11, 22. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0251-y>
11. Börekçi, B.S.; Kaya, M.; Kaban, G. Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1094: Optimization of pH, Fermentation Time and Glucose Concentration Using Response Surface Methodology. *Fermentation* 2022, 8, 731. <https://doi.org/10.3390/fermentation8120731>
12. Застосування лимонної кислоти у виробництві та побуті [Електронний ресурс] // SySOPT. — Режим доступу: https://www.systopt.com.ua/article-zastosuvannya-lymonnoyi-kysloty-u-vyrobnnytvi-ta-pobuti?srsltid=AfmBOooEQ9o6vor7aIdGpYAcNEsrwHv8K6Zk_fXxE6iDtsXhjeIYE17o
13. Біофарма [Електронний ресурс] // Біофарма. — Режим доступу: <https://biopharma.ua/>
14. Антикоагулянтний і консервуючий розчин для крові людини [Електронний ресурс] // Tabletki.ua. — Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%90%D0%BD%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%BE%D0%B0%D0%B3%D1%83%D0%BB%D1%8F%D0%BD%D1%82%D0%BD%D1%8B%D0%B9-%D0%B8-%D0%BA%D0%BE%D0%BD%D1%81%D0%B5%D1%80%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%8E%D1%89%D0%B8%D0%B9-%D1%80%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE%D1%80-%D0%B4%D0%BB%D1%8F-%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B8-%D1%87%D0%B5%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D0%B5%D0%BA%D0%B0/26048/>
15. Інформаційний ресурс "Державний реєстр лікарських засобів України" [Електронний ресурс] // ДЛЗ. — Режим доступу: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=%EB%E8%EC%EE%ED>

16. Український центр донорства крові [Електронний ресурс] // Donor.ua. — Режим доступу: <https://www.donor.ua/news/3055>
17. BioRender. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.biorender.com/>
18. Пирог Т.П., Пенчук Ю.М. Біохімічні основи мікробного синтезу: підручник– К. :Ліра-К, 2020. – 258 с. https://elibrary.nuft.edu.ua/library/DocDescription?doc_id=387446
19. Карлаш Ю.В., Красінько В.О Основи проєктування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: навч. посібник. Нац. ун-т харч. технол. – Київ :НУХТ, 2022. – 373 с.
20. Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Delisi, R., & Pagliaro, M. (2017). Лимонна кислота: нові сфери застосування основного промислового продукту біотехнології. Хім Сент Дж, 11(22). doi: 10.1186/s13065-017-0251-y
21. Labzee. Stainless Steel Bioreactor BZLB-502 [Електронний ресурс] // Labzee Scientific. – Режим доступу: <https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-502> (дата звернення: 28.10.2025).
22. Thermo Fisher Scientific. HyPerforma 5:1 100 L Single-Use Bioreactor [Електронний ресурс] // Thermo Fisher Scientific. – Режим доступу: <https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/hyperforma-5-1-100l-single-use-bioreactor-data-sheet.pdf> (дата звернення: 28.10.2025).
23. Zhengzhou Hengxing Heavy Equipment Co., Ltd. Промисловий реактор з перемішуванням об'ємом 1 м³, модель ХВ-1000 [Електронний ресурс] // Zhengzhou Hengxing Heavy Equipment Co., Ltd. – Режим доступу: <https://zzhxpsj.en.made-in-china.com/product/QBtkrpxoTRe/China-High-Efficiency-Liquid-Mixing-Tank-Widely-Used-for-Mining-Plant.html> (дата звернення: 28.10.2025).
24. Акваградус. Перистальтичний насос для гліцерину, продуктивність 8–10 л/хв, модель AN-10 [Електронний ресурс] // Акваградус. – Режим доступу: <https://www.akvogradus.com.ua/product/peristalticheskiy-nasos-10-l-min> (дата звернення: 28.10.2025).

25. LABOAO. Нержавіючий хімічний реактор LSR-10L [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.laboaoequipment.com/products/stainless-steel-reactor/10l-jacketed-stainless-steel-chemical-reactor> (дата звернення: 28.10.2025).
26. SEKO. Перистальтичний насос KRONOS KSFM0025M1000 [Електронний ресурс] // *SEKO*. – Режим доступу: https://dosingtech.com.ua/uk/product/peristaltichnij-nasos-seko-kronos-ksfm0025m1000-25-l-god-0-1-bar-santoprene/?srsltid=AfmBOoo414v2-Q_tdfmfZtQZug433LUlkFxx-mC8-OloBqKa-fyrhf7 (дата звернення: 28.10.2025).
27. SEKO KRONOS KSFM0025M1000 перистальтичний насос. [Електронний ресурс] // *SEKO*. – Режим доступу: <https://dosingtech.com.ua/product/peristaltichnij-nasos-seko-kronos-ksfm0025m1000-25-l-god-0-1-bar-santoprene/>
28. Pasquet, M., Boulogne, F., Saint-Anna, J., Restagno, F., & Rio, E. (2022). Impact of physical-chemistry on the film thinning in surface bubbles. arXiv preprint arXiv:2202.03231. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2202.03231>
29. Verderflex. Rollit series hose/roller pump technical brochure. 2016. Available at: https://www.verderliquids.com/fileadmin/user_upload/Website_documents_2016/Verderflex/Documents/Peristaltic-Pump-Verderflex-Rollit.pdf
30. Zhejiang Jhen Ten Machinery Co., Ltd. Промисловий реактор-змішувач об'ємом 10 м³, модель ХВ-10000М [Електронний ресурс] // Zhejiang Jhen Ten Machinery Co., Ltd. – Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/10000L-2000L-Stainless-Steel-Reactor-Chemical_1600947555434.html (дата звернення: 28.10.2025).
31. Jinzong Machinery. Stainless Steel 10 000 л реактор з барботером та сенсорами [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://jinzongmachinery.en.made-in-china.com/product/GXrmINJUbcWZ/China-Jinzong-Machinery-Stainless-Steel-10000L-Reactor.html>

32. Verderflex. Rollit series hose/roller pump technical brochure. 2016. Available at:
https://www.verderliquids.com/fileadmin/user_upload/Website_documents_2016/Verderflex/Documents/Peristaltic-Pump-Verderflex-Rollit.pdf
33. GemmeCotti HTM SS316 Mag Drive Centrifugal Pump: GemmeCotti S.r.l. HTM SS 316 – AISI 316 Mag Drive Centrifugal Pumps. (n.d.). Available at:
<https://www.gemmecotti.com/chemical-pumps/htm-ss-316-mag-drive-centrifugal-pumps/>
34. Cavallo, E., Charreau, H., Cerrutti, P., & Foresti, M. L. (2017). *Yarrowia lipolytica: a model yeast for citric acid production*. FEMS Yeast Research, 17(8), fox084. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox084>
35. Mores, S., Porto de Souza Vandenberghe, L., Irineudo Magalhães Júnior, A., de Carvalho, J. C., de Mello, A. F., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2021). *Citric acid bioproduction and downstream processing: Status, opportunities, and challenges*. *Bioresource Technology*, 320, 124426. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124426>
36. Alfa Laval Clara 20 product leaflet — технічний листок для моделі Clara 20, що підтверджує сферу застосування і принцип конструкції:
<https://www.alfalaval.com/globalassets/documents/products/separation/centrifugal-separators/disc-stack-separators/product-leaflet/clara/clara-20-pd-leaflet-new.pdf>
37. Stainless steel chromatography column. Опис та технічні параметри колони з нержавіючої сталі для адсорбційного/хроматографічного розділення рідких розчинів у фармацевтичній і хімічній промисловості. Доступно на: [Колонка для хроматографії из нержавеющей стали — Anhui Chenxiang Ruida Machinery Co., Ltd.](#)
38. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П., Гуляєв В.М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.

39. Кун, Д., Мюллер, Х., Зальціг, Д., & Чермак, П. Швидкий метод визначення гліцерину в автономному режимі під час мікробної ферментації. *European Journal of Biotechnology*, 19, 29-34. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.01.005>
40. Малек, Р., Боннарм, П., Ірлінгер, Ф., Фрей-Клетт, П., Онесіме, Д., Обер, Д., Лукс, В., & Бекеріх, Ж.-М. Транскриптомічна відповідь *Debaryomyces hansenii* під час змішаного культивування в рідкому модельному сирному середовищі з *Yarrowia lipolytica*. *Міжнародний журнал харчової мікробіології*, 264, 53-62. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.026
41. Система ВЕРХ Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 [Електронний ресурс]: Режим доступу: <https://ferusmedical.com/product/dionex-ultimate-3000>
42. "6.3.1. Правила роботи з імерсійною системою мікроскопа"// Епізоотологія. Частина I. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://vukladach.pp.ua/MyWeb/manual/wetmed/epizootologia_I_chastuna/epizootologia_I_chastuna/6/6-.htm (дата перегляду: 16.05.2025)
43. Петер Г., Надь Е. С. та Длауші Д. (2019). Систематика, різноманітність та екологія роду *Yarrowia* та дріжджів, що асимілюють метанол. *Нетрадиційні дріжджі: від фундаментальних досліджень до застосування*, 297–339. doi:10.1007/978-3-030-21110-3_9
44. Wolfe, B. (2014, August 2). Довідник мікробів: *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Foods*. Retrieved [14.05.2025], from <https://microbialfoods.org/microbe-guide-yarrowia-lipolytica/>
45. Застосування лимонної кислоти у виробництві та побуті [Електронний ресурс] // SySOPT. — Режим доступу: https://www.systopt.com.ua/article-zastosuvannya-lymonnoyi-kysloty-u-vyrobnyctvi-ta-pobuti?srsltid=AfmBOooEQ9o6vor7aIdGpYAcNEsrwHv8K6Zk_fXxE6iDtsXhjeIYE17o
46. Mulder, M., et al. (2023). Nanofiltration membranes types and applications: operating pressure and properties. *Sustainable Water Resources Management*,

- 9(142). DOI: 10.1007/s40899-023-00899-y. [Электронный ресурс] // —
Режим доступа: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40899-023-00899-y>
47. Thakre, N., Dhanavade, M., Shinde, S. (2017) Reactive Extraction of Citric Acid Using Different Extractants: Equilibrium, Kinetics and Modeling. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 31(4). DOI: 10.15255/CABEQ.2016.859 [Электронный ресурс] // — Режим доступа: <https://hero.epa.gov/reference/7856856/>
48. Małgorzata Djas, Marek Henczka. (2016) Reactive extraction of citric acid using supercritical carbon dioxide. The Journal of Supercritical Fluids, 117,1-9. — Режим доступа: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.05.005>
49. Moresi, M., Parente, E.(2014). FERMENTATION (INDUSTRIAL) | Production of Some Organic Acids (Citric, Gluconic, Lactic, and Propionic). In Encyclopedia of Food Microbiology (2nd ed.). Elsevier. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00111-7>