МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»	**«До захисту допущено»**
Директор інституту(декан факультету)	Завідувач кафедри
_____ _Наталія ГРЕГІРЧАК__	_____ Віктор СТАБНІКОВ_
(підпис) (прізвище та ініціали)	(підпис) (прізвище та ініціали)
«___» _____ 2026 р.	«___» _____ 2026 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності_162 «Біотехнології та біоінженерія»_____
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми__«Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»_____

на тему: Культивування базидіоміцетних дріжджів для одержання пігментів медичного призначення

Виконав: здобувач_V_ курсу, групи_ЗБТ-5-1__

_____ІЗОТОВ Максим Серійович_____ _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _____ЛИЧ Інна Валентинівна_____ _____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач_____
(підпис)

Київ – 2026 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри _біотехнології і_____
_____мікробіології_____

_____Віктор СТАБНІКОВ_
“_01_” ___грудня___2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

_____Ізотов Максим Сергійович_____
(прізвище, ім’я, по батькові)

1. Тема роботи _Культивування базидіоміцетних дріжджів для одержання пігментів медичного призначення_____

_____

керівник роботи __доц., к.б.н., _Лич Інна Валентинівна_____
(прізвище, ім’я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28.11.2025 року № 957-кс_____

2. Строк подання здобувачем роботи___30.01.2026_____

3. Вихідні дані до роботи __геометричний об’єм ферментера 63 м^3, кофіцієнт заповнення 0,7 цыльовий продукт у вигляды харчовоъ добавки астаксантину , виробничий штам *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6_____

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)_ РОЗДІЛ 1. Характеристика астаксантину. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу астаксантину. РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу астаксантину виробничий штам Xanthophyllomyces dendrorhous DW6 РОЗДІЛ 7. Основні етапи виділення та очищення астаксантину. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва._____

5. Перелік графічного матеріалу
_Технологічна схема біосинтезу тобраміцину на 2 аркушах формату А2_____
_Апаратурна схема біосинтезу тобраміцину на 2 аркушах формату А1_____

6.Консультанти розділів роботи

Розіл	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Задання видав	Задання прийняв

7. Дата видачі завдання____01 грудня 2025 року_____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. Характеристика цільвого продукту	17.12.25-18.12.25	Виконав
2	Розділ 2. Обгронтуання вибору біологічного агента	17.12.25-18.12.25	
3	Розділ 3 Техніко-економічне обгронтування	17.12.25-18.12.25	
4	Розділ 4. Біосинтез цільового проукта	17.12.25-18.12.25	
5	Розділ 5. Обгронтування вибору технологічної схеми	17.12.25-18.12.25	
6	Розділ 6. Специфікація обладнання	17.12.25-18.12.25	
7	Розділ 7. Опис технологічної схеми	17.12.25-18.12.25	
8	Розділ 8. Контроль виробництва	17.12.25-18.12.25	
9	Вступ, реферат, список використаної літератури	19.12.25-15.01.26	

Здобувач _____ Максим Ізотов
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____ Інна ЛИЧ
(підпис) (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Курсова робота присвячена отриманню астаксантини — кетокаротиноїд - це жиророзчинний пігмент, який має властивості червоного фарбування, що є результатом розширеного ланцюга. Найкращим продуцентом цього ферменту є *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6, який у порівнянні з іншими мікроорганізмами такими як H. aegyptius , H. Ducreyi , дає більше астаксантину а саме було отримано 374,3 мг /л астаксантину з вмістом астаксантину 9,0 мг/г . Одну колонію переносили в 15 мл посівного середовища культивувалипри 22 °C 160 об/хв протягом 48 годин. Потім 10 мл насіння переносили в 100 мл свіжого посівного середовища культивували при 22 °C 160 об/хв протягом 35 годин.

Найбільш близьким аналогом є мутантний штам *Phaffia rhodozyma* ATCC 74219, що забезпечує при двостадійному періодичному культивуванні (температура 20-22°C; pH 5; pO2 - 20-70%, час 3 містять дріжджовий екстракт, глюкозу (на другій стадії - гліцерин), мінеральні солі, вітаміни та мікроелементи, вміст астаксантину близько 5000 мкг/г сухої біомаси У загальній частині наведено характеристику обраного біологічного агента (морфолого-культуральні, фізіолого-біохімічні ознаки, таксономічний статус *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6 шлях катаболізму субстрату) та характеристику лізостафну У розрахунково-графічній частині розраховано показники росту під час періодичного культивування мікроорганізмів, аналіз поживних середовищ для їх культивування та енергетичний баланс.

Курсова робота складається з вступу, шести розділів, висновків та списку літератури з 6 найменувань. Загальний обсяг роботи – 53 сторінки, 1 малюнок, 12 таблиць.

Ключові слова: *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6, Астаксантин , кетокаротиноїд,

ABSTRACT

The coursework is devoted to obtaining astaxanthin — ketocarotenoid — is a fat-

soluble pigment that has the properties of red coloring, which is the result of an extended chain. The best producer of this enzyme is Xanthophyllomyces dendrorhous DW6, which, in comparison with other microorganisms such as H. aegyptius, H. Ducreyi, gives more astaxanthin, namely 374.3 mg / l of astaxanthin with an astaxanthin content of 9.0 mg / g was obtained. One colony was transferred to 15 ml of seed medium and cultivated at 22 ° C 160 rpm for 48 hours. Then 10 ml of seeds were transferred to 100 ml of fresh seed medium and cultivated at 22 ° C 160 rpm for 35 hours

The closest analogue is the mutant strain Phaffia rhodozyma ATCC 74219, which provides during two-stage periodic cultivation (temperature 20-22°C; pH 5; pO2 - 20-70%, time 3 contain yeast extract, glucose (in the second stage - glycerol), mineral salts, vitamins and trace elements, astaxanthin content of about 5000 μg / g of dry biomass. The general part provides a characteristic of the selected biological agent (morphological and cultural, physiological and biochemical characteristics, taxonomic status Xanthophyllomyces dendrorhous DW6 substrate catabolism pathway) and a characteristic of lysostaph. The calculation and graphic part calculates growth rates during periodic cultivation of microorganisms, analyzes nutrient media for their cultivation and energy balance. The course work consists of an introduction, six chapters, conclusions and a list of references from 6 names. Total volume of work – 53 pages, 1 figure, 12 tables.

Keywords: Xanthophyllomyces dendrorhous DW6, Astaxanthin, ketocarotenoid,

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ…… **4**
ЗМІСТ…… **6**
ВСТУП…….. **8**
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ТОБРАМІЦИНУ…….…….... **10**
1.1. фізико хімічні властивості…….……..... 11
1.2. основний механізм дії...…..……..... 11
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА…….……... **14**
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування ...……..…….……..… 13
2.2. Розрахунок складу поживного середовища ……..... 17
2.3 Морфологічні-культоральні та фізеолого-біохімічні ознаки біологіного агента……..... 18
2.4 Таксонимічний статус агента X. dendrorhous DW6……...…. 19
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ……...……. **20**
3.1. Потреба населення України в тобраміцині..…….…….. 23
3.2. Розрахунок потужності виробництва астаксантину…….……. 24
3.3. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для синтезу астаксантину…….. 25
РОЗДІЛ 4.БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТА…… **29**
4.1.Шляхи катаболізу ростового субстракту у біологічного агента…… 29
РОЗДІЛ 5. ОБГРОНТЦУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ…… 32
5.1.Обгронтування способу культивування і типу ферментера…….. 33
5.2. Обгронтування стадій підготовки аераційного повітря…… 34
5.3 Особливості підготовки та стерелізації дпоживого середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках…….. 52
5.3.1 Особливості підготовки та стерелізації поживого середовища для одержання інокуляту……... 53
5.3.2 Особливості підготовки та стерелізації дпоживого середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках…….. 54
5.3.3 Особливості підготовки та стерелізації дпоживого середовища для одержання інокуляту……... 55
5.3.4 Особливості підготовки та стерелізації поживого середовища для одержання інокуляту……... 56
5.3.5 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об’ємом 63 м3……. 57
5.4. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції pH…… 58
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ……..... 59
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ……... 64
РОЗДІЛ 8. ОСНОАВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО…. 72
ПРОДУКТУ……. 77
8.1. Мікробіологічний контроль…….
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту……. 78
8.2.1. Визначення концентрації біомаси…… 78
8.2.2. Визначення концентрація астаксантину…….. 78
8.2.3**.** Визначення концентрації амінного азоту…… 79
8.2.4. Визначення концентрації глюкози……... 80
РОЗДІЛ 9.КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА……. 81
9.1. Мікробіологічний контроль……. 81
9.2 Способи знезараження води…… 81
9.3 Способи знезараження повіттря……... 82

9.4 Способи знезараження тверих відходів…….. 83
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ…….. 85

Вступ

Біотехнологічні виробництва відіграють важливу роль у сучасній економіці та науці, забезпечуючи суспільство інноваційними продуктами для медицини, харчової промисловості, аграрного сектору та інших галузей. Одним із перспективних напрямків біотехнології є виробництво натуральних пігментів, таких як астаксантин — каротиноїд з вираженими антиоксидантними властивостями, що знаходить широке застосування у фармацевтиці, косметології та тваринництві. Однак для успішного розвитку та функціонування біотехнологічних виробництв важливо забезпечити нормативне регулювання, яке б гарантувало не лише безпечність продукції, але й ефективність виробничих процесів. Дотримання нормативних вимог є важливою умовою стабільності та якості кінцевого продукту, що особливо актуально у біосинтезі астаксантину зі штаму *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6.

Метою даної курсової роботи є аналіз нормативного забезпечення біотехнологічних виробництв на прикладі біосинтезу астаксантину зі штаму *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6. У роботі буде розглянуто основні вимоги до сировини, технологічних процесів, якості продукту та умов виробництва, а також особливості застосування сучасних підходів до регуляції виробничого процесу з метою оптимізації отримання астаксантину

Тому на сьогодні є актуальним виробництво Xanthophyllomyces dendrorhous DW6 для синтезу астаксантину через високі показники виходу продукту (374,3 мг/л) відносно невелику вартість цільовго проукту та та найбільший вихід продукту за гоину

Мета кваліфікаційної роботи-проектування доферметаційних процесів моделювання технологічної та апаратурної схеми для біосинтезу астаксантину Xanthophyllomyces dendrorhous DW6

Новизною кваліфікаційної роботи є використання саме штаму Xanthophyllomyces dendrorhous DW6 ля профілактики серцево судинх захворювань так як вихід цього штаму є максимальний на сьогоднішній ень

РОЗДІЛ 1
ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

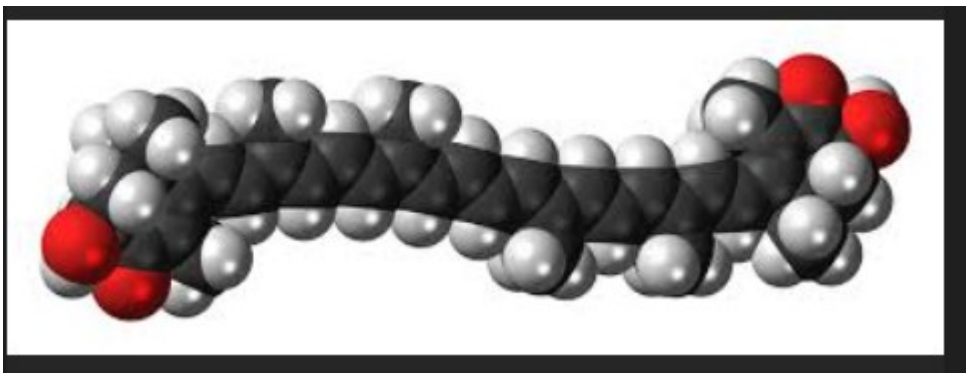
Основними природними джерелами астаксантину є мікроводорості (*Haematococcus pluvialis*), дріжджі (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), криль, а також деякі види риб і ракоподібних, у яких він накопичується через харчовий ланцюг.

Біологічна роль астаксантину обумовлена його потужними антиоксидантними властивостями, у десятки разів вищими, ніж у вітаміну С, Е та бета-каротину [4].

Завдяки цим властивостям, астаксантин широко застосовується:

- у фармацевтиці — як дієтична добавка, нейропротектор, імуномодулятор;
- у косметології — як засіб проти фотостаріння;
- у тваринництві та аквакультурі — як пігмент для покращення кольору м’яса лососевих риб і жовтка яєць;
- у харчовій промисловості — як натуральний барвник E161j [Guerin et al., 2003].

Продуцент *Xanthophyllomyces dendrorhous* вважається одним із найперспективніших мікроорганізмів для біотехнологічного синтезу астаксантину завдяки генетичній стабільності, безпеці та відносно високій продуктивності [5]



1.1 Основні фізико-хімічні властивості

- **Молекулярна маса:** 596,84 г/моль
- **Температура плавлення:** ~215–216 °C (з розкладанням)
- **Колір:** інтенсивно червоно-оранжевий
- **Розчинність:**
    - Добре розчиняється в органічних розчинниках (етанол, ацетон, хлороформ, DMSO, рослинні олії)
    - Практично не розчиняється у воді
- **Полярність:** помірна (завдяки OH- і C=O-групам), але загалом ліпофільна молекула
- **Стабільність:** нестійкий до дії кисню, світла, високих температур — швидко окислюється
- **Світлочутливість:** потребує захисту від УФ-випромінювання при зберіганні

[12]

Астаксантин — один з найпотужніших природних антиоксидантів, що належить до групи ксантофілів. Його унікальна хімічна структура, яка включає полієновий ланцюг з гідроксильними та карбонільними групами на обох кінцях молекули, забезпечує **високу здатність до нейтралізації вільних радикалів** та активних форм кисню (АФК).

1.2 Основні механізми дії:

- **1. Знешкодження синглетного кисню та вільних радикалів**
  Астаксантин ефективно гасить синглетний кисень ($^1O_2$) та стабілізує вільні радикали шляхом переносу електрона або атома водню. Завдяки кон’югованій системі подвійних зв’язків, він забезпечує делокалізацію електронів, зменшуючи окислювальне навантаження на клітини [13].
- **2. Інтеграція в клітинні мембрани**
  Молекула астаксантину вбудовується в фосфоліпідний бішар клітинної мембрани **перпендикулярно**, одночасно захищаючи як зовнішню, так і

внутрішню частину мембрани — це значно ефективніше, ніж у β-каротину чи вітаміну E [1, 2].

- **3. Протизапальний ефект**
  Астаксантин пригнічує активність NF-κB — ключового фактора транскрипції, який запускає експресію прозапальних цитокінів (IL-6, TNF-α) [14].
- **4. Нейропротекторна дія**
  Завдяки здатності долати гематоенцефалічний бар'єр, астаксантин захищає нейрони від оксидативного стресу, підтримуючи їх функціональну активність 15]

РОЗДІЛ 2
ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

Для промислового виробництва астаксантину вибір ефективного біологічного агента і поживного середовища є ключовими елементами, що впливають на продуктивність процесу, якість продукту та економічну ефективність виробництва. У даній роботі вибір біологічного агента та поживного середовища базується на кількох критеріях: ефективність біосинтезу астаксантину, швидкість росту культури, доступність і економічність сировини, а також стійкість до стресових факторів.

Вибір біологічного агента

Як біологічний агент для біосинтезу астаксантину обрано штам ***Xanthophyllomyces dendrorhous*** **DW6** Основні причини вибору цього мікроорганізму:

Високий вихід астаксантину:

Xanthophyllomyces dendrorhous здатний виробляти астаксантин у високих кількостях. Цей штам є одним із небагатьох дріжджів, які природним шляхом синтезують астаксантин у достатніх промислових об'ємах.

Природне походження пігменту:

Астаксантин, отриманий із цього дріжджового штаму, є натуральним продуктом, що робить його більш бажаним для споживачів у харчовій, фармацевтичній та косметичній галузях порівняно з синтетичними аналогами.

Генетична модифікація та адаптивність:

Існують можливості генетичної оптимізації штаму для підвищення продуктивності астаксантину та стійкості до стресових факторів (температура, pH, вміст кисню тощо). Це дозволяє адаптувати штам до умов конкретного виробництва.

Швидкий ріст та простота культивування:

Дріжджі Xanthophyllomyces dendrorhous мають високі темпи росту, що дозволяє ефективно використовувати біореактори і значно скорочувати час виробничого циклу. Їх легко культивувати на різних субстратах.

Вибір поживного середовища

Поживне середовище для культивування дріжджів має забезпечувати оптимальні умови для росту культури та біосинтезу астаксантину.

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Порівняльна характеристика біологічних агентів

Особливості одержання поверхнево-активних речовин на суміші ростових субстратів

—	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація астаксантину, мг/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*
Xanthophyllomyces dendrorhous DW6	Пептон Дріжджовий екстракт Солодовий екстракт Глюкоза Меляса	**5** **3** **3** **10** **10**	168	374,3	Одностадійний, аерація 200 об/хв	www.library.gov.ua/ http://gntb.gov.ua www.nbuv.gov.ua/ www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

	Дріжовий екстракт кукуродзяного сухого борошна $(NH_4)_2SO_4$ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ K_2HPO_4	**1,5** **1,5** **1,5** **1,5**				
ATCC 24202	Сахароза гдріжджовий екстракт NH4Cl K2HPO4 NaCl	15 4 2 1 0,5	144	18,3	Одностадійний, контроль pH на рівні 5,5	www.library.gov.ua/ http://gntb.gov.ua www.nbuv.gov.ua/ www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
Phaffia rhodozyma CECT 2916	Глюкоза соєвий пептон KH2PO4 MgSO4	12 3 2 0,5	168	15,8	Двостадійний, аерація 150 об/хв	www.library.gov.ua/ http://gntb.gov.ua www.nbuv.gov.ua/ www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів ПАР

Продуцент	Компонент поживного середовища	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
1	*2*	*4*	*5*	*6*
***Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6**	Пептон	2180	10,90	1
	Дріжджовий екстракт	1050	3,15	3
	Солодовий екстракт	500	1,50	1
	Глюкоза	38	0,38	1
	Меляса	8	0,8	2
	Дріжовий екстракт кукуродзяного сухого борошна	20	0,20	1
	$(NH_4)_2SO_4$	18	0,03	3
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	20	0,03	8
	K_2HPO_4	205	031	9
		Вартість 1 л середовища – 18,16 грн		
ATCC 24202	Сахароза:	42	0,63	1
	Екстракт дріжджів	1050	4,20	2
	NH4Cl:	80	0,16	3
	K2HPO4	205	0,205	1
	NaCl	15	0,008	1
		Вартість 1 л середовища – 5,20 грн		
Phaffia rhodozyma CECT 2916	Глюкоза	38	0,456	1
	соєвий пептон	2000	6,00	3
	KH2PO4	25	0,1	3
	MgSO4	20	0,01	1
		Вартість 1 л середовища – 6,86 грн		

Примітка. * – Ціни наведено станом на січень 2025 р

1 https://himreactiv.com.ua/pepton-enzimnij-500g

2https://chemlaboratory.com.ua/drozhzhevoy-ekstrakt-100g

3 https://www.labteh.com.ua/product/sukhyy-solodovyy-ekstrakt-500-h/

4 https://saharok.com.ua/products/glyukoza-1kg

5 https://www.agroru.com/doska/melyasa-220882.htm

6 https://agromarket.ua/product/boroshno-kukurudzyane-kg

7 https://agrohimpostach.ua/product/sulfat-amoniyu-nh4-2so4-1kg/

8 https://agrohimpostach.ua/product/magniy-sulfat-7h2o-1kg/

9

https://himlab.com.ua/kupit/khimicheskie_reaktivy/k2hpo4_fosfat_kaliya_dvuzameshchennyy_tr/

10 https://saharok.com.ua/products/sakharoza-1kg

11 https://ximlab.com.ua/hlorid-amoniya-analit-hr-chda/

12

https://himlab.com.ua/kupit/khimicheskie_reaktivy/k2hpo4_fosfat_kaliya_dvuzameshchennyy_tr/

13 https://www.prom.ua/p1570484337-sil-kuhnya-kam-yana.html

14 https://www.biolabmarket.com.ua/pepton-soevyy-500-g-3585/

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Проведемо розрахунок необхідної кількості вуглецю та азоту для отримання 374,3 мг/л астаксантину та біомаси (в статті не наведено кількісне значення біомаси, але в даній роботі наведені дані що 374,3 мг астаксантину в 1 л культуральної рідини відповідає 6,72 мг з 1 г біомаси, отже кількісний показник біомаси становить 374,3 / 6,72 = 55,7 г/л).

Визначення необхідної кількості вуглецю.

Концентрація астаксантину – 374,3 мг/л

$M(C_{40}H_{52}O_4)$ = 596 г/моль;

$M(C_{40})$ = 480 г/моль;

В біомасі вуглець становить 50 % також слід враховувати що під час синтезу біомаси клітина витрачає вуглець для холостого окислення, що приблизно становить 50 % отже для синтезу біомаси витрачається 55,7 г/л вуглецю.

Сумарно на синтез біомаси та астаксантину витрачається 55,7 + 0,301 = 60,001 г/л вуглецю.

Визначити необхідну кількість азоту

В молекулярній формулі астаксантину азот відсутній тому розрахунки загальної кількості необхідного азоту будуть відбуватись лише по біомасі . В біомасі азоту 10 % отже для біомаси необхідно 55,7 * 0,1 = 5,57 г/л азоту .

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

Глюкоза C6H12O6=187 г/л ;

M(C6H12O6)=96 г/л ;

M(C3) = 72 г/моль;

2.3 Морфологічні-культоральні та фізеолого-біохімічні ознаки біологіного агента

Морфологічні ознаки

Ознака	Характеристика
Форма клітин	Овальні, еліпсоїдні або подовжені клітини
Розмір	5–10 × 3–6 мкм
Спосіб розмноження	Брунькування (полярне), статевий цикл включає базидіоспори в природних умовах
Пігментація	Яскраво-жовта до червоної — зумовлена астаксантином

[7]

2.3 Культорологічні ознаки

Ознака	Характеристика
Колонії	Гладкі, блискучі, оранжево-червоні на YPD-агарі
Температура росту	15–28°C (оптимум для астаксантину — 20–22°C)
pH	Оптимум 5.5–6.5
Аеробність	Облігатно аеробна (високий синтез астаксантину за достатнього аерації)

[8,9]

2.3 Фізіолого-біохімічні ознаки

Ознака	Характеристика
Джерела вуглецю	Глюкоза, гліцерин, сахароза, мальтоза, галактоза
Азотні джерела	$(NH_4)_2SO_4$, дріжджовий екстракт, пептон, амінокислоти
Продукція астаксантину	До 5–10 мг/л (можна покращити штучним мутагенезом або генетичною інженерією)
Шлях біосинтезу	Мевалонатний шлях (через ацетил-КоА → IPP → GGPP → астаксантин)

[10,11]

2.4 Таксонимічний статус агента X. dendrorhous DW6

Домен	**Eukaryota (еукаріоти)**
Царство	**Fungi (гриби)**
Тип (відділ)	**Basidiomycota (базидієві гриби)**
Клас	**Tremellomycetes**
Порядок	**Cystofilobasidiales**
Родина	**Cystofilobasidiaceae**

Рід	**Xanthophyllomyces**
Вид	***Xanthophyllomyces dendrorhous***
Штам	**DW6**

[12]

РОЗДІЛ 3
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.

Потреба в астаксантині обумовлена його унікальними антиоксидантними властивостями, які роблять його важливим компонентом для профілактики та лікування серцево-судинних захворювань. Серцево-судинні захворювання є провідною причиною смертності у світі, зокрема в Україні, де щороку фіксується близько 400 тисяч випадків ішемічної хвороби серця та пов’язаних із нею ускладнень [1].

Зменшення оксидативного стресу та запалення в організмі є ключовими механізмами дії астаксантину, які дозволяють покращити функцію серця та судин.

Біотехнологічне виробництво астаксантину із використанням дріжджів *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6 є екологічно безпечним і економічно ефективним. Завдяки високій продуктивності цього штаму [2] отримання астаксантину можливе в значних кількостях, що дозволяє знизити його вартість у порівнянні з іншими джерелами, такими як водорості або синтетичний синтез.

Астаксантин використовується для профілактики та лікування таких захворювань, як:ішемічна хвороба серця,артеріальна гіпертензія,

атеросклероз,

хронічна серцева недостатність.

Крім того, астаксантин показав свою ефективність у зміцненні імунної системи та зниженні рівня "поганого" холестерину (ЛПНЩ), що додатково сприяє його популярності як фармацевтичного компонента.

Станом на 2024 рік [1], хвороби серцево-судинної системи зареєстровано в 7,16 млн українців. Враховуючи наведені вище показники, пропонуємо сфокусуватися на лікуванні саме серцево-судинних захворювань у населення України (таблиця 3.1).

Таблиця 3.1

Розрахунок потреби у аксантині

Група пацієнтів	Кі-ть капсул	Доза на добу	Тривалість прийому	Кількість астаксантину на одну людину в грамах	Кількість хворих на 2024 рік [2]	Загальна кількість астаксантину в кг
дорослі	1	10 мг	30 днів	0,3	7,16 мільйонів	2280

Примітка. Для розрахунку взято до уваги, що для лікування пропонується препарат NOW Foods астаксантин посиленої дії, що випускається в капсулах зі вмістом астаксантину 10 мг. [3]

Отже, згідно з даними в таблиці 1.1, потреба в астаксантині для лікування серцево-судинних захворювань становить 2280 кг

Можемо рогляути виробиків препаратів в яких міститься астаксантин

Дані наведені в таблиці 3.2

Таблиця 3.2

Найбільш відомі виробники ЛЗ на основі астаксантину

Виробник	Назва препарату	Дозування
NOW	Астаксантин NOW Astaxanthin	4 мг
Solgar	Solgar Астаксантин	10 мг
Healthy Origins	Астаксантин Healthy Origins Astaxanthin	12 мг
Dr. Mercola	Астаксантин Dr. Mercola Astaxanthin	4 мг
Swanson	Астаксантин Swanson Astaxanthin	4 мг
Double Wood	Астаксантин Double Wood Astaxanthin	12 мг
Haya Labs	Астаксантин Haya Labs Astaxanthin	5 мг

Приймаємо, що в своєму виробництві будем виробляти 20 % від загальної потреби це буде 456 кг.

Згідно з попередніми розрахунками (див. п.1.1), потреба в астаксантині для лікування серцево-судиних хвороб 2280 кг. Враховуючи, що на ринку України стабільно присутні перевірені імпортні препарати з астаксантину пропонуємо виробляти астаксантин для задоволення 20 % від загальної потреби. Отже, вироблятимемо астаксантин в кількості:

Gгп = 2280*20/100 = 456 кг/рік.

В таблиці 1.3 наведеі орієнтовні величини втрат цільового продукту залежно від стадії виробництва

Таблиця 3.3

№ з/п	Спосіб виділення	Величина втрат, %
1	Фільтрування, центрифугування, сепарування	2
2	Осадження солями, розчинниками	3
3	Концентрування (випаровування, ультрафільтрація)	4
4	Хроматографічне виділення	2
5	Сушіння (контактне, конвективне, ліофільне)	5
6	Подрібнення, просіювання, фасування	4 Разом - 20 %

Обраний біологічний агент *Xanthophyllomyces dendrorhous* синтезує астаксантин у концентрації 374 г/л (кг/м^3) [2]. Об'єм культуральної рідини, необхідної для отримання 456 кг астаксантину становить:

0,374 кг – 1 м^3

456 кг – Х кг

Х = 1219 м^3

З урахуванням втрат цільового продукту при виділенні (20%), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$V_{КР}$ = 1219/0,8 = 1524 м^3

(VKP – 1524 м 3 /рік, л/ Трд (Трд = 330) , розрахованого часу циклу роботи ферментера Тцф, визначається об'єм культуральної рідини за цикл Vцк, під який підбирається геометричний об'єм ферментера для виробничого біосинтезу Vгф. Цикл роботи ферментера Тцф обраховується як:

Тцф = Тк +Т пр=168+10=178 год

і складається з часу культивування Тк та часу підготовчих робіт Тпр. У поясненні до обрахунку має бути зазначена тривалість кожної підготовчої операції (розвантаження, миття та огляд, перевірка на герметичність, стерилізація, охолодження, засів, тощо). При цьому слід враховувати, що залежно від об'єму ферментера тривалість підготовчих робіт Тпр буде різною.

$$Vцк = (К_1 \times V_{КР} \times Тцф)/Т_{рд} \times 24 = (1,1 \times 1524 \times 178)/330 \times 24 = 37,67 = 38 \text{ м}^3$$

де К1 = 1,1 – коефіцієнт запасу, який враховує втрати цільового продукту від нестерильних операцій, які визначаються величиною мають

(К1 = 1,1). VКР 1524 м^3 – кількість культуральної рідини за рік, м^3 (л)

Тцф = 178 год – тривалість циклу роботи ферментера, год

Трд – кількість робочих днів на рік (Трд = 330)

За обрахованим об'ємом Vцк = 38 м^3 визначають найближчий геометричний об'єм ферментера.

3.1. Розрахунок геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення річної потреби у астаксантині (згідно п.1.2) потрібно отримати (з урахуванням втрат під час виділення) 2280 м3 культуральної рідини. Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість трудоднів – 280, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_д = V_{кр} / T_{тр} = 1524/330 = 4,62 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$Vцк = (К1 * Vд * Тцф)/24 = (1,1 * 4,62 * 178)/24 = 37,69 \text{ м}^3 \text{ /цикл, де}$$

Тцф – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (178 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год). К1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій (К1 = 1,1).

Визначивши об’єм КР за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення $К_З$=0,7, визначаємо геометричний об’єм ферментера

$$V_г = V_{цк} / К_з = 37,67/0,7= 53,84$$

Згідно з таблицею найближчим за геометричним об’ємом є ферментер об’ємом 63 м^3.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення $К_з$= 37,67/63 = 0,6 – не перевищує заданого значення

3.2 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу астаксантину

За один виробничий цикл отримують 37,67 м^3 культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (Еф), які становлять від 10 – 15%. Отже, з урахуванням покриття 10% втрат об’єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити:

$$Vроб.1 =37,67/0,9=41,86 м3 ,$$

Отже, робочий об’єм ферментера дорівнює 41,86 м^3. За вибраного коефіцієнта заповнення 0,7 геометричний об’єм ферментера становить: Vф = 41,86/0,7 = 59,8 м^3. Приймаємо найближчий за об’ємом стандартний ферментер Vст1 = 63 м^3

*Уточнюємо коефіцієнт заповнення: Кз1 = 41,86/0,7 = 59,8. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів (0,55-0,7), отже геометричний об’єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об’єму поживного середовища.

Для засіву Vроб.1 = 41,86 м^3 середовища необхідно приготувати

$$Vпм1 = Vроб.1* Хф = 41,86 * 0,1 = 4,19 м^3$$ посівного матеріалу,

де Хф = 0,1 – доза посівного матеріалу для ферментера.

Тоді об’єм поживного середовища в ферментері буде становити:

$$Vпс1 = Vроб.1 - Vпм1 = 41,86 – 4,19 = 37,67 м^3$$

Врахуємо, що під час одержання 4,19 $м^3$ інокуляту в посівному апараті 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. З урахуванням цього об’єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

3.3 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для синтеу астаксантину

$$Vроб.2 = 4,19/0,9=4,66 м^3$$

Об’єм інокуляту 4,66 $м^3$ за коефіцієнта заповнення 0,7 можна отримати в посівному апараті об’ємом: $Vпа2 = 4,66 /0,7 = 6,65 м^3$. Приймаємо найближчий за об’ємом стандартний ферментер $Vст2 = 10 м^3$.

*Уточнюємо коефіцієнт заповнення: Кз2 = 4,66/10 = 0,47. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів (0,5-0,7), отже геометричний об’єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 10 % від об’єму поживного середовища. Отже, для засіву $Vроб.2 = 4,66 м^3$ необхідно приготувати

$$Vпм2 = Vроб.2* Хф = 4,66 * 0,1 = 0,466 м^3$$ посівного матеріалу

де Хф = 0,1 – доза посівного матеріалу для посівного апарата. Тоді об’єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$Vпс2 = Vроб.2 - Vпм2 = 4,66– 0,466 = 4,194 м^3$$

Врахуємо, що під час одержання 0,466 м3 (470 л) посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об’єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$Vроб.3 = Vпм2/Кзв=0,466/0,9=0,52 м^3$$

Об’єм інокуляту 0,52 $м^3$ за коефіцієнта заповнення 0,7 можна отримати в посівному апараті об’ємом: Vпа2 = 0,59/0,7 = 0,84 $м^3$. Отже обираємо апарат Vст3 = 1 $м^3$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: Кз.3 = 520/1000 = 0,52. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об’єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об’єму поживного середовища. Для засіву поживного середовища об’ємом 520 л необхідно
Vпм3 = Vроб.3* Хф = 520*0,1 = 52 л посівного матеріалу де Хф = 0,1 – доза посівного матеріалу для посівного апарата. Тоді об’єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

Vпс3 = Vроб.3 - Vпм3 = 520 – 52= 468 л

Врахуємо, що під час одержання 52 л посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об’єм поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме:
Vроб.4 = 52/0,9=58 л

Об’єм інокуляту 58 л за коефіцієнта заповнення 0,7 можна отримати в інокуляторі об’ємом: Vін2 = 58/0,7 = 82,9 л. Приймаємо найближчий за об’ємом стандартний інокулятор Vст4 = 100 л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: Кз.4 = Vроб.4/ Vст4 = 58/100 = 0,58. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об’єм інокулятора обрано правильно

Тоді об’єм поживного середовища в інокуляторі буде становити:

Vпс4 = Vроб.4 - Vпм4 = 58 – 5,8 = 52,2 л

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об’єму поживного середовища. Для засіву інокулятора необхідно підготувати
Vпм4 = Vроб.4 Хф = 58*0,1=5,8 л

Об’єм інокуляту 5,8 л за коефіцієнта заповнення 0,7 можна отримати в посівному апараті об’ємом: Vпа2 = 5,8/0,7 = 8,28 л. Цей об’єм є стандартним, отже обираємо апарат Vст4 = 10 л

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: Кз.5 = 5,8 л/10 л = 0,58 л. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об’єм посівного апарату обрано правильно.

Тоді об’єм поживного середовища становить: Vпс5 = Vроб.5 – Vпм5 = 5,8 – 0,580 = 5,22 л

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об’єму поживного середовища.

Одержання посівного матеріалу Vпм5 = 580 мл для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням у колбах на качалці.

Для цього використовують качалочні колби об’ємом Vколб = 750 мл з коефіцієнтом заповнення Кзк = 0,2. Тоді кількість колб становить:

$$Nколб = Vпм4/(Vколб*Кзк) =580/(750*0,2) = 4 колби$$

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу астаксантину *Xanthophyllomyces dendrorhous* необхідно встановити ферментер для біосинтезу об’ємом 63 м3, інокулятори: 10 м^3, 1 м^3, інокулятор об’ємом 100 л, 10 л і 4 качалочні колби.

Для наочності розрахунки кількості стадій підготовки посівного матеріалу та об’ємів необхідного обладнання краще оформити у вигляді підсумкової таблиці. Під час складання таблиці необхідно враховувати, що у технологіях мікробного синтезу для засіву рідкого поживного середовища концентрація інокуляту (доза) зазвичай становить 5−10 % (Хф = 0,05…0,1). 19 При розрахунках об’ємів культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (Еф), які становлять від 10 - 15% (Еф = 0,1…0,15).

Таблиця 1.4

№	Об’єм культуральної рідини Vкр, м3 (л)	Уточнений об’єм культуральної рідини* Vроб., м^3 (л)	Об’єм посівного матеріалу, Vпм, м3 (л)	Об’єм поживного середовища , Vпс, м3 (л)	Коефіцієнт заповнення , Кзап, частка	Геометричний об’єм ферментера , Vст, м3 (л)
1	2	3	4	5	6	7
VI	37,67	41,86	4,19	37,67	0,7	63
V	4,19	4,66	0,466	4,19	0,7	10
IV	0,466	0,52	52 л	468 л	0,7	1
III	52 л	58 л	5,8 л	52,2 л	0,7	100 л
II	5,8 л	5,8 л	580 мл	5,22 л	0,7	10 л
I	580 мл	580мл	-	580 мл	0,2	4 колби

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТИЗ ЦІЛЬВОГО ПРОДУКТА

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

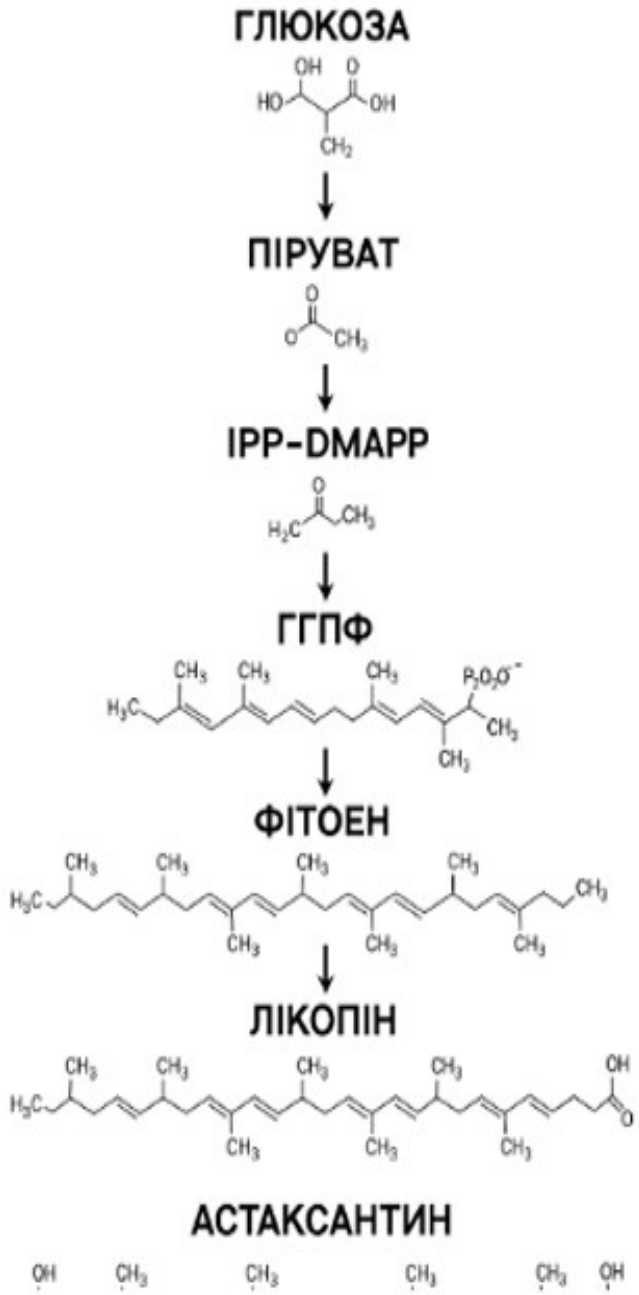


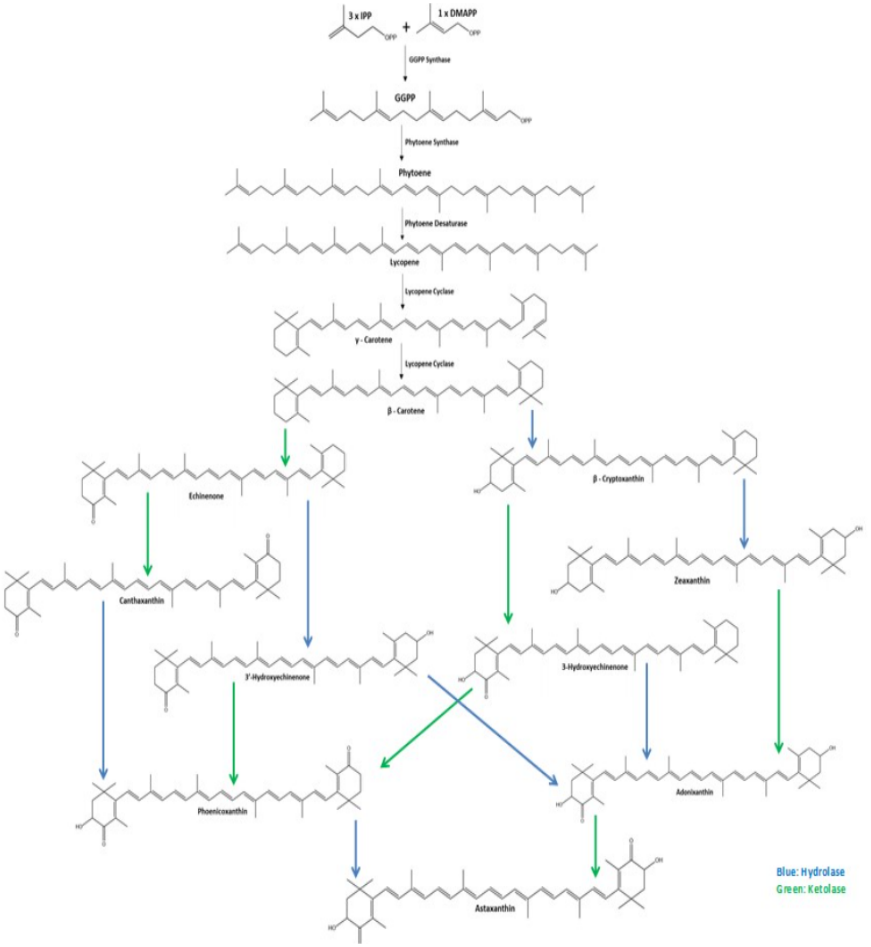
Рис.4.1 Шлях катаболізму астаксантину .

Етапи біотрансформації у *X. dendrorhous*:

1. Вуглецевий субстрат (наприклад, глюкоза) → метаболізується до ацетил-КоА
2. Ацетил-КоА → через мевалонатний шлях утворює ізопренові блоки
3. ГГФФ (гергеранілгеранілфосфат) → ферментативно перетворюється в β-каротин
4. β-каротин → за участю астаксантин-синтази → астаксантин

Приклади основних шляхів утворення амінокислот

Група	**Основне джерело (предшественик)**	**Амінокислоти, що синтезуються**
α-кетоглутарат	з Циклу Кребса	Глутамат, глутамін, пролін, аргінін
3-фосфогліцерат	з гліколізу	Серин, гліцин, цистеїн
Оксалоацетат	з Циклу Кребса	Аспартат, аспарагін, лізин, метіонін, треонін
Піруват	з гліколізу	Аланін, валін, лейцин, ізолейцин
Рибозо-5-фосфат / Еритрозо-4-фосфат	пентозофосфатний шлях	Фенілаланін, тирозин, триптофан


3 x IPP
1 x DMAPP
GGPP Synthase
GGPP
Phytoene Synthase
Phytoene
Phytoene Desaturase
Lycopene
Lycopene Cyclase
γ - Carotene
Lycopene Cyclase
β - Carotene
Echinenone
β - Cryptoxanthin
Canthaxanthin
Zeaxanthin
3'-Hydroxyechinenone
3-Hydroxyechinenone
Phoenicoxanthin
Adonixanthin
Astaxanthin
Blue: Hydrolase
Green: Ketolase

РОЗДІЛ 5.
ОБГРОНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Для ефективного біосинтезу астаксантину в процесі культивування штаму *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6 необхідним є підбір оптимальних фізико-хімічних умов, що забезпечують як високу швидкість росту, так і максимальну продукцію цільового метаболіту. Цей мікроорганізм є аеробним дріжджовим продуцентом, здатним до вторинного метаболізму, зокрема до біосинтезу ксантофільного пігменту астаксантину. Найбільш сприятливими температурними умовами для його культивування є діапазон 20–22 °C. Підвищення температури до 25 °C і вище може пришвидшити ріст клітин, однак істотно знижує рівень накопичення пігменту. Реакція середовища (pH) відіграє важливу роль у регуляції метаболічної активності. Оптимальним для культивування є слабокисле середовище з pH у межах 5,5–6,5, що сприяє стабільному росту культури та синтезу астаксантину. Як джерело вуглецю можуть застосовуватись глюкоза, сахароза, гліцерин або недорогі побічні продукти харчової промисловості, зокрема меляса. На початковій стадії культивування вуглець стимулює біомасоутворення, а його обмеження в фазі стаціонарного росту сприяє переходу до синтезу вторинних метаболітів, включаючи астаксантин. Джерелами азоту слугують як органічні сполуки (пептон, дріжджовий екстракт), так і мінеральні солі (сульфат амонію). Для підвищення синтезу астаксантину бажаним є контрольований дефіцит азоту після активного росту культури. Через аеробний тип метаболізму штаму необхідно забезпечити високий рівень аерації та ефективне перемішування середовища — це дозволяє підтримувати насичення киснем та рівномірний розподіл поживних речовин. Таким чином, раціональний вибір джерел живлення та фізико-хімічних параметрів культивування є ключовим фактором у досягненні високої продуктивності цільового біотехнологічного процесу.

5.1 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

У процесі біотехнологічного виробництва біологічно активних речовин, зокрема каротиноїдів, критичним є вибір оптимального типу ферментера. Для штаму *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6, який є перспективним продуцентом астаксантину, особливо важливо забезпечити стабільні умови культивування, ефективне перемішування та достатній рівень аерації. Це обумовлено тим, що даний дріжджовий мікроорганізм є облігатно аеробним — тобто не здатен здійснювати ефективний метаболізм за відсутності кисню.

Найдоцільнішим варіантом для культивування *X. dendrorhous* DW6 є використання **мішаного ферментера з механічною мішалкою**, або так званого **stirred-tank reactor (STR)**. Такий біореактор забезпечує інтенсивне перемішування середовища, що сприяє рівномірному розподілу поживних речовин, підтриманню гомогенності середовища та, що найважливіше — ефективному переносу кисню з газової фази до рідинної. Це критично для реалізації високопродуктивного метаболізму, пов’язаного з біосинтезом астаксантину, який утворюється шляхом мевалонатного шляху — енергозалежного та кисневозалежного процесу.

Окрім того, STR дозволяє здійснювати **точний контроль параметрів середовища**, таких як температура, pH, швидкість аерації та концентрація розчиненого кисню (pO_2). Такий контроль забезпечує оптимальні умови для росту клітин дріжджів та продукції цільового метаболіту. STR також є придатним для різних режимів культивування — **періодичного (batch)**, **напівперіодичного (fed-batch)** та **безперервного (continuous)**. У промисловій практиці при виробництві астаксантину найчастіше застосовується **fed-batch режим**, оскільки він дозволяє зменшити ефект катаболітної репресії (особливо від глюкози) та підтримувати контрольований ріст і продукцію каротиноїдів на стаціонарній фазі розвитку культури.

В окремих випадках, для зменшення механічного навантаження на клітини, можуть використовуватись **ферментери типу airlift**, де циркуляція середовища здійснюється завдяки потокам повітря. Однак через нижчу ефективність

масообміну та менший контроль над умовами ферментації, ці системи менш підходять для високопродуктивного синтезу астаксантину у дріжджів, порівняно з класичним STR.

Таким чином, з урахуванням фізіолого-біохімічних характеристик штаму *X. dendrorhous* DW6, його потреб в кисні, а також технологічних вимог до виробництва астаксантину, **оптимальним вибором є мішалковий ферментер типу STR з можливістю контролю параметрів процесу**

[21] [22]

5.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря

Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря для *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Фізіолого-біохімічні особливості біологічного агента:

Xanthophyllomyces dendrorhous є строгим аеробом, тобто потребує кисню для забезпечення метаболізму та біосинтезу цільових продуктів.

Основний цільовий продукт – астаксантин – синтезується внаслідок окиснювальних реакцій, які потребують постійного доступу до молекулярного кисню. Недостатня аерація або кисневе голодування призводять до зниження рівня біосинтезу астаксантину та пригнічення росту культури.

Необхідність стадії підготовки аераційного повітря:

Високі вимоги до стерильності процесу культивування обумовлюють необхідність використання стерильного аераційного повітря. Це запобігає контамінації культури небажаними мікроорганізмами.

Забезпечення оптимального рівня кисню у ферментері є критично важливим для підтримання стабільного метаболізму.

Етапи підготовки аераційного повітря:

Забір повітря: використовують вертикальні труби для забору повітря на висоті 2-3 м від поверхні землі, щоб зменшити ризик потрапляння пилу та великих частинок [4, 5].

Очищення повітря:

Фільтри грубого очищення для видалення частинок розміром >50 мкм (наприклад, тканинні або сітчасті фільтри).

Головні фільтри ємнісного типу зі ступенем очищення до 95%.

Індивідуальні фільтри на ферментерах зі ступенем очищення 99,99% (HEPA-фільтри).

Стиснення повітря: повітря компримується в компресорах або турбоповітрядувках, що забезпечує необхідний тиск для подачі.

Охолодження та видалення вологи: охолодження до точки роси та видалення конденсату у ресиверах. Це також сприяє стабілізації температури й тиску.

Фінальна стерилізація: підігрівання повітря до 45-50 °C забезпечує додаткову стерильність і запобігає конденсації в системі подачі.

Обґрунтування вибору фільтрувальних матеріалів:

Для грубого очищення використовуються тканинні фільтри, які мають високу пропускну здатність і ефективно видаляють великі частинки.

Головні фільтри (ємнісні або набивні) застосовуються для видалення дрібного пилу і частинок, що можуть знизити ефективність подальших етапів очищення.

Індивідуальні фільтри (HEPA) забезпечують ультрависокий рівень очищення, критично важливий для уникнення контамінації в ферментері [4, 5]..

Витрати аераційного повітря:

Для культивування *Xanthophyllomyces dendrorhous* оптимальний обсяг подачі аераційного повітря становить 1,0–2,0 м³/м³ середовища на хвилину. Це забезпечує достатній рівень кисню для підтримання інтенсивного метаболізму.

1) Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирається турбокомпресором через забірну шахту, що розташована на певній висоті будівлі. Для забезпечення чистоти та зменшення концентрації мікроорганізмів, забір повітря зазвичай здійснюється на висоті 15 м від найвищої точки будівлі. Це дозволяє уникнути забруднення

повітря, яке може бути присутнім поблизу земної поверхні, та гарантує, що забране повітря буде мати меншу кількість часток і мікроорганізмів

для звільнення повітря від грубого аерозолю- чищення повітря від великих часток пилу, бруду та інших грубих аерозолів. Це досягається за допомогою фільтрів попереднього очищення, які використовуються для захисту системи подачі повітря (зокрема компресорів і інших компонентів) від забруднень. Фільтри для попереднього очищення можуть бути виготовлені з різних матеріалів, таких як синтетичні волокна, сітки або пористі матеріали [4, 5].

2) Стиснення повітря в турбокомпресорі

Після того, як атмосферне повітря очищене від грубих аерозолів, воно піддається стисненню за допомогою **турбокомпресора**. Це дозволяє підвищити тиск повітря до необхідних значень (0,35–0,5 МПа), щоб забезпечити достатній потік повітря в ферментер. Під час стиснення температура повітря значно підвищується (до 120–250°C), що супроводжується збільшенням вологості повітря на одиницю об'єму.

3) Перевищення тиску для подолання опору фільтрувальних матеріалів

Підвищення тиску є необхідним для подолання **опору фільтрувальних матеріалів** на етапах очищення повітря, коли воно проходить через фільтри. Стиснене повітря допомагає подолати опір і забезпечує ефективне очищення повітря від мікроорганізмів та інших забруднень, що можуть залишатися на фільтрувальних матеріалах [4, 5].

4) Подача повітря в культуральну рідину

Після стиснення та очищення, повітря подається в культурульну рідину через систему розподілу, що дозволяє забезпечити рівномірне аераційне середовище для культури *Xanthophyllomyces dendrorhous DW6*. Підвищений тиск дозволяє подолати **гідравлічний опір** під час розподілу повітря в культурі та сприяє ефективному розподілу газу в об'ємі ферментера.

5) Технічне забезпечення підвищеного тиску

Для забезпечення стабільного підвищеного тиску у системі можуть використовуватися **ресивери** для накопичення стисненого повітря, що дозволяє

регулювати тиск і подавати його безперервно в ферментери. Ресивери допомагають згладжувати коливання тиску та забезпечують постійний потік стерильного повітря в культурульну рідину.

6) Видалення надлишкової вологи

Важливо також врахувати, що стиснене повітря має підвищену температуру і підвищену вологість. Тому перед подачею в культурульну рідину повітря повинно пройти через **краплевловлювачі** або **теплообмінники**, де волога конденсується і видаляється, щоб не допустити утворення надмірної вологи в системі [4, 5].

Завдяки цьому процесу повітря, яке подається до ферментера, буде мати підвищений тиск, що дозволяє забезпечити необхідну аерацію та сприяє ефективному біосинтезу астаксантину у культурі *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6.

7) Очищення на індивідуальних фільтрах:

Для додаткового очищення і забезпечення ще вищого рівня стерильності, на кожному **ферментері** встановлюються **індивідуальні фільтри**. Ці фільтри є частиною кожної аераційної системи і використовуються для очищення повітря безпосередньо перед його подачею в кожен ферментер. Індивідуальні фільтри виконують функцію **фільтрації з високим ступенем очищення**, затримуючи до 99,999% мікроорганізмів та інших дрібних часток, які могли б залишитися після головної фільтрації.

Фільтри, що використовуються для індивідуального очищення, можуть мати спеціальні матеріали для **механічного фільтрування** або **адсорбції**, які забезпечують вищу ефективність і гарантують стерильність повітря, що подається в кожен ферментер [4, 5].

Підрозділ 5.3. Обгрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

На підприємствах біотехнологічної, хіміко-фармацевтичної та харчової промисловості зазвичай використовуються лише зареєстровані мийні, дезінфікуючі та антисептичні засоби, які відповідають вимогам чинних

нормативно-правових актів, таких як Санітарні правила і норми № 5179-90, Державні санітарні норми та правила (ДСанПіН), а також правила належної виробничої практики (GMP). Вони застосовуються для санітарної обробки приміщень, обладнання (включаючи інокулятори, реактори, ферментери) та дезінфекції рук персоналу на всіх етапах виробничого процесу. [16]

На будь-якому виробничому процесі критично важливим є обґрунтований вибір та належне застосування засобів для очищення та знезараження. Слід уникати тривалого використання одного й того ж дезінфектанту, оскільки це може спровокувати появу стійких до нього мікроорганізмів. Для запобігання адаптації мікроорганізмів до дезінфікуючих засобів рекомендується їх змінювати кожні 3 місяці.

Мийно-дезінфікуючі засоби повинні зберігатися в сухих, вентильованих приміщеннях, відповідно до вимог інструкцій виробника та санітарних норм МОЗ України. Вибір засобів здійснюється з урахуванням їх антимікробної ефективності, простоти застосування, корозійної стійкості, економічності та токсичності. [16]

Як мийно-дезінфікуючі засоби для обробки обладнання можуть використовуватись наступні перелічені засоби: (інструкції до використанняя всіх нижче зазначених мийних та дезінфікуючих розчинів додано в додатки курсової роботи)

Divosan TC 86 — це високоефективний **лужний миючий засіб**, призначений для **CIP-очищення обладнання** на підприємствах біотехнологічного профілю, зокрема під час виробництва біологічно активних речовин, таких як **астаксантин**, отриманий з дріжджів *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

У процесі біотехнологічного виробництва астаксантину з дріжджів *Xanthophyllomyces dendrorhous* критично важливим є підтримання **гігієнічних умов та стерильності обладнання**, що забезпечує:

- відсутність сторонньої мікрофлори,
- стабільність продуктивності культури-продуцента,
- відповідність вимогам GMP (Good Manufacturing Practice).

Для цього застосовуються системи **механізованого очищення CIP (Clean-In-Place)**, які потребують використання високоефективних та безпечних миючих засобів. Серед доступних на ринку препаратів було обрано **Divosan TC 86**, з огляду на такі технологічні та санітарно-хімічні переваги:

Ефективна лужна дія

Засіб містить **20–30% гідроксиду натрію**, що забезпечує потужне розщеплення органічних забруднень, таких як білки, жири та залишки середовища культивування дріжджів.

Комплексоутворювальні агенти у складі

Присутність хелатуючих речовин (EDTA або аналогів) дозволяє ефективно боротися з відкладеннями солей жорсткості, запобігаючи утворенню біоплівок на поверхні обладнання.

Сумісність з CIP-системами

Divosan TC 86 розроблений спеціально для **автоматизованого внутрішнього миття ферментерів**, трубопроводів, сепараторів без потреби у демонтажі. Це значно знижує час простою обладнання та підвищує ефективність виробництва.

. **Сертифікована якість та сумісність із біотехнологічними процесами**

Засіб має відповідні **сертифікати якості для харчової, фармацевтичної та біотехнологічної галузей**, що підтверджує його безпечність та ефективність у виробництві БАР, таких як астаксантин

Вибір **Divosan TC 86** як основного миючого засобу для підприємства з біосинтезу астаксантину з *Xanthophyllomyces dendrorhous* є обґрунтованим з позиції **ефективності, безпечності, технологічної сумісності та економічної доцільності**. Його застосування забезпечує високу якість очищення обладнання, мінімізує ризики контамінації та сприяє стабільності біопроцесу. [16]

Обґрунтування вибору миючого засобу Alkoclean P3 (Ecolab)

Підтримання чистоти обладнання є критичним етапом у біотехнологічному виробництві, особливо при культивуванні продуцентів астаксантину, таких як *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Одним із ключових завдань є ефективне

видалення біомаси, залишків поживних середовищ і мікроорганізмів, що вимагає застосування надійних CIP-засобів.

Серед мийних засобів, сумісних із біореакторами, резервуарами та трубопроводами, було обрано Alkoclean P3 (виробник: Ecolab), з огляду на такі переваги:

Alkoclean P3 містить гідроксид натрію (до 35%), що дозволяє розщеплювати білкові, жирові та вуглеводневі залишки після ферментації дріжджів *X. dendrorhous*. Засіб демонструє високу очисну здатність навіть за короткого часу експозиції (10–20 хвилин при 50–60 °C).

Засіб розроблено спеціально як непінний, що дозволяє ефективно працювати в автоматизованих CIP-системах, без ризику гідравлічного опору чи перевитрати води при промиванні.

Наявність хелатуючих агентів (EDTA або NTA) дає можливість ефективно видаляти мінеральні відкладення та солі жорсткості, особливо у випадках використання неідеально підготовленої води.

Засіб не містить агресивних речовин, які спричиняють корозію. Повністю сумісний з харчовою та фармацевтичною нержавіючою сталлю (AISI 316L), що актуально для біореакторів, гомогенізаторів та фільтраційних систем.

Alkoclean P3 має сертифікати відповідності для застосування у фармацевтичній та харчовій промисловості згідно з вимогами ISO 9001, GMP та HACCP.

Засіб доцільно застосовувати для післяпроцесного миття ферментерів, мембранних фільтрів та трубопроводів після завершення культивування дріжджів-продуцентів. Також використовується для підготовки обладнання перед новим виробничим циклом, оскільки не залишає токсичних залишків [17]

Divosan ACID (Diversey) — кислотного миючого засобу для біотехнологічних підприємств, зокрема для виробництва астаксантину з *Xanthophyllomyces dendrorhous*

У біотехнологічному процесі виробництва астаксантину важливо застосовувати комплексну схему очищення обладнання. Лужне миття ефективно розчиняє

органічні залишки, однак мінеральні відкладення вимагають кислотної обробки. **Divosan ACID** ідеально доповнює CIP-програму, забезпечуючи повне видалення всіляких забруднень, що підвищує якість і стабільність виробництва. Divosan ACID використовується як другий етап CIP-очищення після лужного миття (наприклад, Divosan TC 86) для:

- Усунення мінеральних відкладень, що залишаються після лужного очищення.
- Підтримання санітарного стану обладнання — ферментерів, трубопроводів, теплообмінників.
- Запобігання накопиченню біоплівок, що покращує ефективність ферментації.

[18]

Обґрунтування вибору **Topax 66 Acid (Ecolab)** для CIP-очищення
Виробництво астаксантину з *Xanthophyllomyces dendrorhous* вимагає суворого контролю чистоти обладнання, оскільки на його поверхнях накопичуються як органічні залишки, так і мінеральні відкладення. Для забезпечення стабільної роботи та високої якості продукту застосовується двоетапна CIP-програма, де кислотне очищення є невід'ємним етапом.
Переваги Topax 66 Acid:

1. **Ефективне видалення мінеральних відкладень**
   Органічні кислоти у складі Topax 66 Acid розчиняють кальцієві, магнієві та інші солі жорсткості, що залишаються після лужного очищення, забезпечуючи глибоке очищення поверхонь.
2. **Захист обладнання від корозії**
   Корозійні інгібітори запобігають пошкодженню нержавіючої сталі (AISI 316L), продовжуючи термін служби обладнання.
3. **Оптимальна формула для CIP-систем**
   Низьке піноутворення забезпечує безперебійну роботу автоматизованих систем очищення.

4. **Відповідність галузевим стандартам**

   Засіб сертифікований відповідно до GMP та HACCP, що гарантує безпеку використання у харчовій та фармацевтичній промисловості.

Таким чином, **Topax 66 Acid (Ecolab)** є оптимальним вибором для кислотного етапу CIP-очищення на підприємствах з виробництва астаксантину з *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

[19]

Обґрунтування вибору **Suma Foam D2.3 (Diversey)** для очищення обладнання **Suma Foam D2.3** — це високоефективний **піноутворюючий** лужний миючий засіб, спеціально розроблений для видалення стійких органічних забруднень у харчовій, фармацевтичній та біотехнологічній промисловості. Засіб створює стійку піну, що дозволяє збільшити контакт миючого розчину з поверхнями, покращуючи якість очищення.

Обґрунтування застосування у виробництві астаксантину:

1. **Видалення стійких органічних забруднень:**

   В процесі культивування *Xanthophyllomyces dendrorhous* на обладнанні накопичуються жирові, білкові залишки та біоплівки. Suma Foam D2.3 завдяки лужному складу ефективно розщеплює ці забруднення, забезпечуючи високу якість очищення.

2. **Піноутворення для поліпшення контакту:**

   Піна підвищує час контакту активних речовин з поверхнею, що особливо важливо для вертикальних та складних конструкцій у біореакторах, забезпечуючи глибоке очищення.

3. **Сумісність з CIP-системами:**

   Suma Foam D2.3 може використовуватись як у ручному, так і в автоматизованому режимі очищення (CIP), що забезпечує гнучкість виробничих процесів.

4. **Безпека для обладнання:**

   Засіб не містить агресивних компонентів, що можуть пошкодити нержавіючу сталь (AISI 316L), застосовувану у ферментерах і

трубопроводах.

5. **Сертифікація:**
   Відповідає вимогам GMP, HACCP та є безпечним для застосування у харчовій та фармацевтичній промисловості.

Вибір **Suma Foam D2.3** зумовлений необхідністю ефективного очищення органічних забруднень з обладнання для культивування *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Його лужна формула та піноутворювальні властивості забезпечують якісний, безпечний та економічний процес очищення, що є важливим для стабільності виробництва астаксантину.[20]

Обґрунтування вибору **Incidin Pro (Ecolab)** для дезінфекції обладнання

Incidin Pro — це високоефективний, швидкодіючий дезінфікуючий засіб на основі четвертинних амонієвих сполук, розроблений для застосування у харчовій, фармацевтичній та біотехнологічній промисловості. Засіб забезпечує надійне знищення широкого спектра мікроорганізмів, включно з бактеріями, грибками та вірусами.

Обґрунтування застосування у виробництві астаксантину:

1. **Широкий антимікробний спектр:**
   Виробництво астаксантину із *Xanthophyllomyces dendrorhous* вимагає контролю над мікробіологічною чистотою, оскільки сторонні мікроорганізми можуть конкурувати з культурою або продукувати небажані метаболіти. Incidin Pro ефективно знищує патогени і контамінанти, що забезпечує безпеку і стабільність процесу.
2. **Сумісність з матеріалами:**
   Засіб безпечний для нержавіючої сталі (AISI 316L), силіконів та інших матеріалів, що використовуються у обладнанні для ферментації та біосинтезу.
3. **Зручність застосування:**
   Можливість застосування у різних формах (розчин для занурення, обприскування, CIP) забезпечує гнучкість у дезінфекції обладнання різної конфігурації.

4. **Відповідність санітарним стандартам:**
   Відповідає вимогам GMP, HACCP та харчової промисловості, що гарантує безпеку кінцевої продукції.

Вибір **Incidin Pro (Ecolab)** обумовлений його високою антимікробною активністю, безпекою для обладнання та гнучкістю застосування. Це робить його оптимальним засобом для дезінфекції технологічного обладнання на підприємствах, що виробляють астаксантин з *Xanthophyllomyces dendrorhous*.[21]

Обґрунтування вибору **Oxonia Active (Diversey)** для дезінфекції обладнання **Oxonia Active** — це інноваційний окисний дезінфікуючий засіб на основі пероксиду водню та пероцтової кислоти, який забезпечує швидке і ефективне знищення бактерій, вірусів, грибків і спор. Засіб не залишає шкідливих залишків, розкладаючись на воду і кисень, що робить його екологічно безпечним.

Обґрунтування застосування у виробництві астаксантину:

1. **Широкий антимікробний спектр і швидкодія:**
   Oxonia Active ефективно знищує широкий спектр патогенів, включаючи стійкі спори, що особливо важливо для підтримки стерильності у виробництві астаксантину, де присутність контамінантів може значно вплинути на якість продукту.
2. **Відсутність шкідливих залишків:**
   Засіб розкладається на безпечні компоненти, що виключає ризик забруднення продукту хімічними залишками, особливо важливо у біотехнологічних процесах.
3. **Сумісність з матеріалами:**
   Підходить для очищення нержавіючої сталі (AISI 316L) і не пошкоджує матеріали, що використовуються у ферментерах та CIP-системах.
4. **Екологічність:**
   Завдяки природному розпаду на воду і кисень, Oxonia Active є безпечним для навколишнього середовища, що відповідає сучасним вимогам сталого

виробництва.

Вибір **Oxonia Active (Diversey)** зумовлений його високою ефективністю проти стійких мікроорганізмів, безпекою для обладнання і продукту, а також екологічністю, що робить його оптимальним засобом для дезінфекції у виробництві астаксантину з *Xanthophyllomyces dendrorhous*. [22]

Обґрунтування вибору **Perform® CID (Dr. Weigert)** для дезінфекції обладнання

Perform® CID — це високоефективний багатофункціональний дезінфікуючий засіб на основі **комбінації пероксидних сполук**, що забезпечує потужну дію проти бактерій, вірусів, грибків і спор. Розроблений спеціально для галузей, де потрібен **високий рівень санітарії**, зокрема в біотехнологіях, харчовій промисловості та охороні здоров'я.

Обґрунтування використання у виробництві астаксантину:

1. **Потужна окисна дія проти патогенів і спор:**
   У виробництві астаксантину з *X. dendrorhous* стерильність обладнання має критичне значення. **Perform® CID** ефективно знищує як вегетативні форми мікроорганізмів, так і спорові форми, що запобігає забрудненню культури.
2. **Швидкодія + залишковий ефект:**
   Засіб діє швидко, при цьому утворює тонку антимікробну плівку на поверхні, яка **забезпечує пролонгований захист**, особливо корисний у виробництвах із паузами між циклами ферментації.
3. **Біоекологічність і відсутність шкідливих залишків:**
   При правильному використанні Perform® CID не залишає токсичних залишків, оскільки активні речовини розкладаються до **води, кисню та нешкідливих метаболітів**, що **повністю безпечно** для біосинтезу продуктів з високою біологічною активністю.
4. **Сумісність з обладнанням:**
   Засіб не агресивний до матеріалів, з яких виготовлене типове біотехнологічне обладнання (нержавіюча сталь, силікони, полімери).

5. **Сертифікація відповідно до стандартів GMP, ISO 9001, HACCP:** Придатний для використання в умовах, де потрібна фармацевтична чи харчова чистота.

Perform® CID (Dr. Weigert) — ідеальний вибір для дезінфекції технологічного обладнання на підприємствах з виробництва астаксантину з *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Завдяки **потужній антимікробній дії, екологічності та безпеці для біотехнологічного процесу**, цей засіб забезпечує стабільні умови для отримання якісного біопродукту.[23]

Узагальнювальна таблиця характеристик мийно-дезінфікуючих засобів

Назва засобу	Склад	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація / режим)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість**	Джерело
«Divosan TC 86 »	Азотна кислота (HNO_3) Фосфорна кислота (H_3PO_4) – Вода – основа розчину **Неіоногенні ПАР**	знижує мікробне навантаження, руйнує біоплівки, перешкоджає росту бактерій на технологічних поверхнях.	Кислотний низькопінний мийний засіб для видалення неорганічних відкладень у CIP-системах. Містить азотну й фосфорну кислоту та поверхнево-активні речовини	Нержавіючою сталлю (AISI 304, 316L) Склом Поліпропіленом (PP), поліетиленом (PE), PVDF Тефлоном	**0,5–2 %** (залежно від ступеня забруднення). Рекомендована температура: **40–60 °C**, час дії — **10–30 хв**.	внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів **20.10.2021**. Термін дії до: **20.10.2026**.	150 грн /л	[16]
Alkoclean P3	Гідроксид натрію (NaOH) Комплексоутворювачі Неіоногенні ПАР Інгредієнти для стабілізації піни та pH	Значно знижує мікробне навантаження за рахунок руйнування органічних залишків і біоплівок; Покращує ефективність подальшої дезінфекції за рахунок	Прозора рідина, pH ~13,5. Використовується при 40–70 °C у CIP-системах	Нержавіючої сталі (AISI 304, 316L) Поліпропілену (PP), поліетилену (PE) Полівінілденфториду (PVDF) Тефлону (PTFE)	Концентрація: 0,5–2,0 % (залежно від ступеня забруднення) Температура: 40–70 °C Час обробки: 15–30 хвилин	внесено до Державного реєстру мийних засобів України **15.03.2022**. Термін дії реєстрації — до **15.03.2027**.	130 грн /л	[17]

		очищення поверхонь; Має помірну бактерицидну активність через високу лужність, але не замінює спеціалізовані антимікробні засоби..			Методи: CIP-мийка, циркуляція, замочування			
Divosan ACID	Лимонна кислота Молочна кислота Фосфорна кислота Неіоногенні поверхнево-активні речовини Вода	*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*	Прозора рідина, pH близько 1,5–2,5. Використовується при 40–60 °C у CIP-системах для видалення мінеральних відкладень і біоплівок.	Нержавіючої сталі (AISI 304, 316L) Поліпропілену (PP) Поліетилену (PE) Полівінілденфториду (PVDF)	Концентрація: 0,5–2,0 % Температура: 40–60 °C Час дії: 10–30 хвилин Методи: CIP-мийка, циркуляція, замочування Після обробки — обов’язкове ретельне	внесено до Державного реєстру дезінфекційних та мийних засобів України **12.08.2021**. Термін дії реєстрації — до **12.08.2026**.	160 грн /л	[18]

					промивання чистою водою.			
Topax 66 Acid	Фосфорна кислота10–20 %Основний кислотний компонентСульфамінова кислота5–10 %Кислотний агент, очищенняНеіоногенні ПАР1–5 %Змочування і емульгуванняОрганічні кислоти (лимонна, молочна)< 5 %Підсилюють мийний ефектВодаРештаРозчинник	*Staphylococcus aureus* (включно з MRSA), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.	Прозора рідина, pH ~1,5. Кислотний мийний і дезінфікуючий засіб. Ефективно видаляє мінеральні відкладення та біоплівки. Використовується при 40–60 °C у CIP-системах.	Нержавіючою сталлю (AISI 304, 316L) Термостійкими кислотостійкими пластиками (PE, PP, PVDF)	1–3 % гарячий (50–60 °C) розчин для замочування або протирання; витрата 100 мл/м²; ретельне ополіскування	внесено до Державного реєстру дезінфекційних та мийних засобів України **27.09.2021**. Термін дії реєстрації — до **27.09.2026**.	170 грн / л	[19]
Suma Foam D2.3	**КомпонентФункція ВмістГідроксид натрію (NaOH)**Лужна основа, розщеплення білків і жирів5–15 %**Неіоногенні ПАР**Змочування,	Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa.	Лужний рідкий концентрат на основі гідроксиду натрію (5–15 %) та поверхнево-активних речовин. Ефективно розчиняє жирові та білкові забруднення,	Нержавіючої сталі (AISI 304, 316L) Поліпропілену (PP), поліетилену (PE), ПВДФ (PVDF)	Концентрація: 0,05–0,5 % (залежно від ступеня забруднення) Методи: піноутворення, зрошення,	внесено до Державного реєстру мийних та дезінфікуючих засобів України **12.05.2022**. Термін дії реєстрації — до **12.05.2027**.	130 грн/л	[20]

	емульгування< 5 %**Аніонні ПАР**Піноутворення, очищення< 5 %**Комплексоутворювачі (EDTA)**Пом'якшення води, стабілізація формули< 1 %**Вода**РозчинникРешта	Обмежена фунгіцидна дія проти дріжджів і пліснявих грибків (Candida albicans).	утворюючи стійку піну для тривалого контакту з поверхнею. Розчин має прозорий жовтуватий колір і щільність близько 1,1 г/см³.	Скло, кераміка. Не рекомендується для: Алюмінію та алюмінієвих сплавів Цинку, міді та латуні	циркуляційна мийка (CIP), ручне миття Температура: 40–60 °C Час експозиції: 10–30 хвилин			
Incidin Pro	Четвертині амонієві сполуки (4-го покоління) — 12,5 % (діюча речовина) Етанол — 7,0 % Неіоногенні поверхнево-активні речовини — 3,5 % Вода очищена — решта (до 100 %)	(Staphylococcus aureus, Enterococcus faecium) і грамнегативних бактерій (Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa). Віруліцидна: активний проти вірусів з оболонкою (в тому числі вірус грипу,	Рідкий концентрат на основі четвертинних амонієвих сполук із вираженими бактерицидними, віруліцидними та фунгіцидними властивостями; ефективний у широкому діапазоні температур (20–40 °C); робочі розчини прозорі, безбарвні або з легким жовтуватим відтінком, мають характерний легкий запах.	Нержавіючої сталі (AISI 304, 316L) Полімерів (PP, PE, PVC) Емальованих і скляних поверхонь Уникайте застосування на: Алюмінії та його сплавах (можливе корозійне пошкодження)	Концентрація: 0,5–2,0 % (залежно від рівня забруднення та типу поверхні) Методи: протирання, зрошення, занурення, CIP (циркуляційна мийка) Температура: 20–40 °C	внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів України **15.03.2021**. Термін дії реєстрації — до **15.03.2026**	70 грн/л	[21]

		коронавіруси, ВІЛ). Фунгіцидна: ефективний проти грибів роду Candida.		Чутливих до хімії пластмас (рекомендується тестування)	Час експозиції: 5–15 хвилин			
Oxonia Active	Перекис водню (Hydrogen Peroxide) — 8,0–12,0 % Пероксид карбаміду (Urea Peroxide) — 5,0–8,0 % Органічні кислоти (оцтова, щавлева) — 2,0–4,0 % Поверхнево-активні речовини — до 2,0 %	Бактерицидна активність: проти Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus hirae Віруліцидна активність: проти вірусів з оболонкою — вірус грипу А, вірус герпесу, коронавіруси	Концентрований окислювальний дезінфікуючий засіб на основі перекису водню та органічних кислот. Забезпечує швидку та ефективну очистку і дезінфекцію поверхонь (5–10 хв), руйнує органічні забруднення, безпечний для більшості матеріалів, не залишає токсичних залишків.	Пластиків (PP, PE, PVC) Емальованих і скляних поверхонь Керамічної плитки Уникайте застосування на: Алюмінії та алюмінієвих сплавах (можлива корозія) Чутливих до окислювачів матеріалах	Концентрація: 0,5–2,0 % (залежно від ступеня забруднення) Методи: зрошення, занурення, CIP (циркуляційна мийка) Температура: 20–55 °C Час експозиції: 5–10 хвилин	внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів України **20.11.2021**. Термін дії реєстрації — до **20.11.2026**	200 грн/л	[22]

	Вода очищена — до 100 %	(включно з SARS-CoV-2) Фунгіцидна активність: проти Candida albicans Спороцидна активність: ефективний проти спор Bacillus subtilis та Clostridium difficile						

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

Xanthophyllomyces dendrorhous астаксантину використовується середовище такого складу (г/л) для колб на качалках та іконулятів :

ПЕПТОН-5Г/Л

ДРІЖДЖОВИЙ ЕКСТРАКТ - 3Г/Л

СОЛОДОВИЙ ЕКСТРАКТ - 3Г/Л

ГЛЮКОЗА - 10Г/Л

Таблиця 2.1

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах-качалках

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**приготування 0,58 л Середовища, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, л**
ГЛЮКОЗА	10	5,8 г	А	0,58
ПЕПТОН	5	2,9 г		
СОЛОДОВИЙ ЕКСТРАКТ	3	1,74		
ДРІЖДЖОВИЙ ЕКСТРАКТ	3	1,74		
ВОДА			0,58	

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (0,58 л).

Проаналізувавши склад поживного середовища, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: глюкоза, пептон, солодовий та дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа).

Глюкоза та пептон потребують м’якіших умов стерилізації, тому що містять вуглеводи та білки відповідно. Крім цього, ці компоненти потребують попереднього розварювання на водяній бані. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках.

5.3.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту

Таблиця 2.2

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі 10 л

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**приготування 5800мл середовища**	**Композиція**	**Об’єм композиції, V, л**
ГЛЮКОЗА	10	58 г	А	5,8
ПЕПТОН	5	29 г		
СОЛОДОВИЙ ЕКСТРАКТ	3	17,4		
ДРІЖДЖОВИЙ ЕКСТРАКТ	3	17,4		
Конденсат 10 %		567,82		
ВОДА		5110,38		

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об’єм невеликий (5,8 л).

Проаналізувавши склад поживного середовища, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: глюкоза, пептон, солодовий та дріжевий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа).

Глюкоза та пептон потребують м’якіших умов стерилізації, тому що містять вуглеводи та білки відповідно.

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

Xanthophyllomyces dendrorhous використовується середовище такого складу (г/л) для інокуляторів:

Таблиця 2.3

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі 100 л

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**приготування 58 л середовища**	**Композиція**	**Об’єм композиції, V, л**
ГЛЮКОЗА	10	580 г	А	58,0
ПЕПТОН	5	290 г		
СОЛОДОВИЙ ЕКСТРАКТ	3	174		

ДРІЖДЖОВИЙ ЕКСТРАКТ ВОДА кондесат 10 %	3	174		
Конденсат 10 %		5,6782		
ВОДА		51,1038		

Для цієї стадії необхідно 58 л поживного середовища. Склад поживного середовища ділимо на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Проаналізувавши склад поживного середовища, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: глюкоза, пептон солодовий та дріжевий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа).

Глюкоза, пептон та дріжевий екстракт потребують м’якіших умов стерилізації, тому що містять вуглеводи та білки відповідно.

5.3.3 Особливості підготовки та стерелізації дпоживого середовища для одержання інокуляту

Тіамін і рибофлавін подається в інокулятор після стерилізації всіх інших компонентів (для зменшення ймовірності контамінації). Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об’ємом 1 м^3 наведений у табл.

Таблиця 2.4

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті 1 м^3

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**приготування 520 л середовища**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, л**
ГЛЮКОЗА	10	5,2 кг	А	520 л
ПЕПТОН	5	2,6 кг		
СОЛОДОВИЙ ЕКСТРАКТ	3	1,56 кг		
ДРІЖДЖОВИЙ ЕКСТРАКТ	3	1,56 кг		
ВОДА кондесат 10 %				
Конденсат 10 %		50,908 л		
ВОДА		458,172 л		

Для цієї стадії необхідно 520 л поживного середовища. Склад поживного середовища ділимо на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Для цієї стадії необхідно 520 л поживного середовища. Склад поживного середовища ділимо на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Проаналізувавши склад поживного середовища, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: глюкоза, пептон солодовий та дріжевий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа).

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 1 м^3 наведений у табл. 2.5

5.3.4 Особливості підготовки та стерелізації поживого середовища для одержання інокуляту

Таблиця 2.5

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті 10 м^3

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**приготування 4,66 м^3 середовища**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, л**
ГЛЮКОЗА	10	46,6 кг	А	4660,0
ПЕПТОН	5	23,3 кг		
СОЛОДОВИЙ ЕКСТРАКТ	3	13,98 кг		
ДРІЖДЖОВИЙ ЕКСТРАКТ	3	13,98 кг		
ВОДА				
кондесат 10 %		466,0 л		
Вода		4194,0 л		

Для цієї стадії необхідно 4,66 м^3 поживного середовища. Склад поживного середовища ділимо на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Для цієї стадії необхідно 4,66 м^3 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 м^3/год (час стерилізації становитиме 0,85 год). Температура

стерилізації – 130 °С. Розчин усіх компонентів поживного середовища готується в одному реакторі-змішувачі.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м^3

5.4.5 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 63 м3

Для цієї стадії необхідно 41.86 м^3 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-15 з продуктивністю 15 м^3/год (конструктивно аналогічну УБС-20) (час стерилізації становитиме 0,85 год). Температура стерилізації – 130 °С. Розчин усіх компонентів поживного середовища готується в одному реакторі-змішувачі.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 50 м^3

Таблиця 2.6

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в ферментері 63 м^3

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**приготування 41,86 м^3 середовища**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, м^3**
Меляса	10	445,8 кг	А	26,674 м^3
Дріжевий екстракт	1,5	62,79 кг		
кукурудзяного сухого борошна	10	418,6 кг		
$(NH_4)_2SO_4$	1,5	62,79 кг	А	5 м^3
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5	62,79 кг		

K_2HPO_4	1,5	62,79 кг	А	5 $м^3$
кондесат 10 %		4,186 $м^3$		
Вода		36,674 $м^3$		

Для цієї стадії необхідно 41.86 $м^3$ поживного середовища. Склад поживного середовищаділимо на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: меляса, дріжевий екстракт, кукурудзяного сухого порошку (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0.05 МПа).

Композиція Б: $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (режим стерилізації: 131 °С, 0,15 МПа впродовж 40 хв).

Композиція В: K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 0,15 МПа впродовж 40 хв).

5.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції pH

Необхідність у приготуванні титрувальних агентів виникає:

- для підкислення композиції поживного середовища, яка містить одночасно фосфорні солі і солі кальцію і магнію перед процесом стерилізації для попередження утворення нерозчинних солей під час стерилізації такої композиції (зазвичай 4 моль на літер H_3PO_4) та доведення pH до оптимального рівня після охолодження та перед початком біосинтезу

Орієнтовні витрати: таких розчинів складають 2 мл на 1 л поживного середовища. При цьому слід враховувати, що розчин соляної кислоти не потребує стерилізації (добавляється у нестерильне поживне середовище, а розчин лугу має бути стерильним).

Специфічні швидкості росту штаму DW6 протягом 0–72 годин 72–168 годин за двоступеневої стратегії pH-ферментаціїї (примітка: контроль означає періодичне бродіння з підживленням при pH 5,5, два етапи означає періодичне

бродінняя з підживленням при pH 6,5 від 0–72 та за pH 5,5 від 72–168 год); синтез астаксантину швидкість за двоступеневої стратегії pH-ферментації (примітка: контроль означає порційне бродіння з підживленням при pH 5,5, два етапи означає періодичнее бродіння з підживленням при pH 6,5 від 0 до 72 годин при pH 5,5 від 72 до 168 годин); кінетика переодичної ферментаціїї з живленням при pH 5,5.

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання. Виробництво астаксантину

ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозбірник А1И 031.000 Температура до 50 °С Тиск до 0,4 МПа https://www.teplotech.ru/
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Модель: ФГО-1.0 Ефективність фільтрації: Затримує частки до 5-10 мкм. Пропускна здатність: до 5000 м³/год. Фільтруючий елемент: багатошаровий волокнистий поліпропілен Ефективність фільтрації по часткам: Затримує до 95% Висота: 600 мм Ширина: 500 мм Глибина: 300 мм Маса: 5-7 кг https://www.eurofilter.ru/
К-3	Компресор	1	Поршневий компресор (модель: К-500) Продуктивність: до 5000 м³/год. Тиск: до 0,5 МПа (5 бар). Довжина: 1200 мм Ширина: 800 мм Висота: 1350 мм Маса: 500-600 кг (залежно від модифікації) https://www.dalgakiran.com/

Узагальнений перелік обладнання, використовуваного для біосинтезу астаксантину наведено у табл. 3.1. Відповідне обладнання представлене у графічній частині (апаратурна схема).

Продовження Таблиці 3.1

Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Пластинчастий теплообмінник (модель: ТКП-1000) Продуктивність охолодження: до 1000 кВт Довжина: 1600 мм Ширина: 1000 мм Висота: 1800 мм Маса: 450-500 кг Продуктивність: 100 000 м³/год
Р-5	Ресивер	1	Ресивер стисненого повітря РС-10 Об'єм: від 1 м³ до 10 м³. Тиск: до 0,6 МПа (робочий тиск 0,35–0,5 МПа). Габарити: для об'єму 1 м³ — 1200 мм (висота) × 600 мм (діаметр); для 10 м³ — 3000 мм (висота) × 1000 мм (діаметр). https://www.dalgakiran.com/
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Модель: ТН-1000 (приклад). Максимальний робочий тиск: до 1,0 МПа. Габаритні розміри: 1500 мм (довжина) × 800 мм (ширина) × 1200 мм (висота) https://www.zelko.ru/
Г-7	Головний фільтр очистки	1	Модель: ФГ-5000 (приклад моделі для головного фільтра).

			Фільтрувальний матеріал: Набивне волокно E>95% https://www.newfilter.ru/
ІФ-8	Індивідуальний фільтр	1	Технічні характеристики: Фільтр повітряний SPF-005. Фільтруючий матеріал: боросилікатне волокно; температура: 1,5-150°C; ступінь очищення: 99,999%. https://www.newfilter.ru/
Р-9	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Технічна характеристика: Реактор УПЭС-0.02/1.1 об'ємом 20 л («Промбіофіт»). Матеріал: нержавіюча сталь; потужність мішалки: 0,2 кВт; швидкість перемішування: 0-200 об/хв; габарити: 1000х250х680 мм. http://www.prombiofit.com
Н-10	Насос мембранний	1	Технічна характеристика: Мембранний насос для рідин («АгроТех»). Потужність: до 15 Вт; продуктивність: 1,5 л/хв; максимальний робочий тиск: 3,5 бар https://www.agrotech.ua/
І-11	Інокулятор	1	Технічна характеристика: Інокулятор BioFlo-4500 об'ємом 20 л («AWTech»). Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; містить сорочку, мішалку з регульованою швидкістю перемішування (50-1000 об/хв); габарити: 890х754х1194 мм. https://www.awtech.com/

Продовження Таблиці 3.1

ІФ-12	Індивідуальний фільтр очищення повітря	1	Технічна характеристика: Фільтр ULPA TNBSU30561050 класу U16 («Thenow»). Робоча температура: 70°C; фільтрувальна площа: 3,88 м²; E = 99,999%; матеріал: ультратонке скловолокно. https://www.thenow.com/
Р-13	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Технічна характеристика: Реактор-змішувач «МашХім» , об'єм: 160 л. Потужність змішувача: до 5,5 кВт; швидкість перемішування: 20-3000 об/хв; габарити: 500х875х1850 мм https://www.mashhim.com
Н-14	Насос відцентровий	1	Технічна характеристика: Насос відцентровий CAM INOX 80-HL («Speroni»). Максимальний тиск: до 8 бар; продуктивність: 3 м³/год; потужність: 600 Вт https://www.speroni.com/
З-15	Реактор-змішувач для відходів виробництва біодизелю	1	Виробник: Amar Equipments (Індія) Об'єм: 5 л Мішалка: Турбінна, розділ обертів 100-1450 Максимальна температура: 300 ºС Габаритні розміри: 410 х 1100 мм (із контрольною панеллю) Матеріал: високоякісна сталь https://www.evhimmash.com
І-16	Інокулятор	1	Технічна характеристика: Інокулятор BLBIO-200SJ об'ємом 200 л («BLBIO»). Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 316L; турбінна мішалка: 200-400 об/хв; габарити: 1400х820х2200 мм

			https://www.blbio.com/
ІФ-17	Індивідуальний фільтр очищення повітря	1	Технічна характеристика: Фільтр ULPA ФяС-U класу U16 («Фолтер»). Максимальна робоча температура: до 80°С; Е = 99,999%; стійкість до вологи до 100%. https://www.camfil.com/
Д-18	Ваговий дозатор для подачі компонентів композиції А	1	Технічна характеристика: Ваговий дозатор «АгроТех» (Україна) для реактора-змішувача об'ємом 1,6 м³. Мінімальна межа дозування – 100 г, максимальна – 60 кг; напруга: 20 В; потужність: 2,2 кВт. https://www.agrotech.ua/

Продовження Таблиці 3.1

Р-19	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Технічна характеристика: Реактор із еліптичним днищем об’ємом 1,6 м³ фірми «МашХім» Потужність змішувача: до 5,5 кВт; швидкість перемішування: 20-3000 об/хв; габарити: 1940х2595 мм. https://www.mashhim.com
Д-20	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Технічні характеристики: Дозатор рідини та води Serv_W21. Об'єм дозованої води: 0,1 – 999,9 л; витрата води: 12 л/хв. https://www.servw21.com/
Н-21	Насос відцентровий	1	Технічна характеристика: Насос Відцентровий CBM 152 («Speroni»). Потужність: 0,85 кВт; висота напору:

			21 м; продуктивність: 18 м³/год; тиск: 10 бар. https://www.speroni.com/
Р-22	Реактор-змішувач для відходів виробництва біодизелю	1	Технічна характеристика: Реактор-змішувач «МашХім» , об'єм: 100 л. Потужність змішувача: до 5,5 кВт; швидкість перемішування: 20-3000 об/хв; габарити: 400х1825х770 мм https://www.mashchim.com/
Р-23	Реактор-змішувач для приготування 6% розчину соляної кислоти	1	Технічна характеристика: Реактор серії A2000 об'ємом 5 л («Amar Equipments»). Турбінна мішалка: 100-1450 об/хв; максимальна температура: 300°C; габарити: 410х1100 мм. https://www.amarequipments.com/
Д-24	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Технічна характеристика: Дозатор рідини та води mBev. Об'єм дозованої води: 0,1 – 999,9 л; витрата води: 1 л/хв. https://www.mbev.com/
Р-25	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації 6% розчину гідронатріюксиду	1	Т Технічна характеристика: Реактор стерилізації «BioFlow» об'єм: 50 л. Потужність: 2,5 кВт; швидкість змішування: 0-1000 об/хв; температурний режим: 5–250°C https://www.bioflow.com/
Д-26	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Технічна характеристика: Дозатор води для реактора об'ємом 10 л з регулюванням подачі в межах 10-1000 мл на раз. Потужність: 1 кВт https://www.dosingsolutions.com/

І-27	Інокулятор	1	Технічна характеристика: Інокулятор BIOFLO 5000 об'ємом 150 л («AWTech»). Мішалка зі швидкістю перемішування: 0-2000 об/хв. https://www.awtech.com/
ІФ-28	Індивідуальний фільтр очищення повітря	1	Технічна характеристика: Фільтр класу G3 для аерації («Camfil»). Продуктивність: 2300 м³/год; ступінь очищення: 95% https://www.camfil.com/
Д-29	Ваговий дозатор для подачі компонентів композиції А	1	Технічні характеристики: Ваговий дозатор 1 кг до 1000 кг, точність: ±5 г. Потужність: 2,2 кВт https://www.weighingsystems.com/
Р-30	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Технічна характеристика: Реактор об'ємом 100 л. Мішалка з діаметром 30 см, потужність: 1,5 кВт https://www.reactormix.com/
Д-31	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Технічна характеристика: Мікродозатор для води об'ємом до 500 мл за 1 цикл. https://www.microdosing.com/
Н-32	Насос відцентровий для перекачування композиції А від Р-30 до УБС-34	1	Технічні характеристики: Потужність: 7 кВт; продуктивність: 40 м³/год. https://www.centrifugalpumps.com/
Р-33	Реактор-змішувач для відходів виробництва біодизелю	1	Технічна характеристика: Реактор для роботи з біодизелем об'ємом 100 л; матеріал корпусу: нержавіюча сталь; тиск: до 10 бар https://www.biodieselreactor.com/

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.

Технологічна схема біосинтезу астаксантину включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес – підготовка посівного

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

*А*тмосферне повітря відбирають за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1) у найвищій точці – на висоті 10 м (враховуючи висоту ферментера об'ємом 63 м3 –__ м, а також висоту поверху –__ м, косий дах будівлі ~1,5 м)

ДР 1.2. Очистка повітря від грубих часток

Попереднє очищення повітря проводять у фільтрі (Ф-2), що забезпечує ступінь очищення до 90%, затримуючи при цьому частинки діаметром 50 мкм.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Стискання повітря здійснюють у компресорі (К-3), щоб забезпечити аерацію та подолати гідравлічний тиск стовпа рідини у ферментері. Умови процесу: тиск – 0,35 МПа, температура – до 250°С.

ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи

Стиснене повітря, утворене при компресуванні, (від *ДР 1.3*) надходить до теплообмінника-охолоджувача (Т-4), де охолоджується до температури 25-30°С. Згодом зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де проходить усунення пульсацій руху повітря. На даному етапі показник вологості зменшується до 60%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Охолоджене повітря (від *ДР 1.4*) надходить до теплообмінника-нагрівача (Т-6), де нагрівається до температури 45-50°С. На даному етапі показник вологості зменшується до 50%.

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Нагріте повітря (від *ДР 1.5*) надходить до головного фільтра очистки (Ф-7), який ставлять біля ферментаційних відділень. На даному етапі ступінь

очищення складає 95%.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від *ДР 1.6*) через трубопроводи подається безпосередньо в індивідуальні фільтри кожного з інокуляторів до *ТП 4.5, ТП 4.6, ТП 5.1*. Ступінь кінцевої очистки повітря складає 99,999%.

ДР 2. Приготування розчину свинцового оцту

ДР 2.1. Приготування розчину свинцового оцту для освітлення меляси.

600 г оцтовокислого свинцю $РЬ(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ розтирають у порцеляновій ступці з 200 г оксиду свинцю РЬО в 100 $см^3$ дистильованої води. Порцелянову ступку з сумішшю кладуть на киплячу водяну баню і нагрівають, перемішуючи до тих пір, поки початково жовта маса не набуде білий чи рожево-білий колір. Потім, перемішуючи, додають частинами 1900 $см^3$ гарячої дистильованої води і переводять суміш у колбу. Операцію проводять кілька разів, залежно від місткості посудини. Після заповнення колбу залишають у теплому місці від 3 до 5 днів, зрідка перемішуючи вміст дерев'яною паличкою. Після освітлення розчин фільтрують. Відфільтрований розчин зберігають у міцно закоркованих бутилях.

Свинцевий оцет повинен мати сильнолужну реакцію на лакмус і слабколужну на фенол-фталеїн.

ДР 3. Освітлення меляси

ДР 3.1 Освітлення меляси розчином свинцевого оцту

Під час освітлення розчином свинцевого оцту його додають по 6-9 $см^3$ на кожні 13 г меляси. У сильнолужних мелясах необхідно попередньо нейтралізувати розчин меляси оцтовою кислотою, розбавленою дистильованою водою у співвідношенні 1:3 у присутності індикатора фенолфталеїну. Колбу з розчином розміщують у термостаті на 15 хв для досягнення температури (20,0 ± 0,1) °С. Піну, що утворилась на поверхні розчину, видаляють краплею етилового ефіру. Розчин доливають дистильованою водою до мітки і перемішують. Перед фільтруванням розчин залишають на 5 хв для осаджування осаду. Розчин фільтрують, покриваючи фільтрувальну лійку годинниковим склом, щоб

уникнути випаровування. Перші 10 $см^3$ фільтрату зливають. Попередньо видаляють надлишок свинцю. Для цього на кожні 100 $см^3$ фільтрату додають 0,9 г сухого подрібненого порошку однозаміщеного фосфорнокислого амонію ($NH_4H_2PO_4$) для повного розчинення рідину збовтують, а потім 0,2 г гідросульфіту натрію ($Na_2S_2O_4$). Перед фільтруванням розчин залишають на 20 хв, фільтрування проводять згідно з попередніми вказівками.

ДР 4. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 4.1. Приготування 6%-го розчину соляної кислоти

Для того щоб приготувати 7,55 л 6%-го HCL, розчину необхідно 1294 мл 35%-ї HCL і 6256 мл дистильованої води.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація 6%-го розчину гідроксиду натрію

Для того щоб приготувати 9560 мл 6%-го розчину NaOH, треба 574 г кристалічного NaOH і 9 л дистильованої води. Через об'ємно-ваговий дозатор 574 г кристалічного NaOH подають в реактор-змішувач обємом 12 л додають 9 л дистильованої води та вмикають мішалку .

ДР 4.3 Приготування та стерилізація 6%-го розчину гідроксиду натрію

Після розчинення розчину стерилізують гострою парою при температурі 131 С, тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв.

ДР 5. Приготування і стерилізація розчину меляси для підживлення

ДР 5.1 Приготування і стерилізація розчину меляси

Дозування розчину підживлення меляси описано у розділі 2.2. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40 С. Отриманий розчин перекачують насосом реактор об'ємом 1 $м^3$ і стерилізують при 112 ºС (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

ДР 6. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 6.1. Приготування та стерилізація поживних середовищ для культивування у колбах.

ДР 6.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах зважується 5,8 г глюкози, 1,74 г солодового

екстракту, 1,74 г дріжджового екстракту і 2,9 г пептону. Наважки поміщаються у колбу об'ємом 1 л та розчиняються у 580 мл води питної, попередньо відміряної мірним циліндром. Вміст колби перемішуємо, колба закривається ватно-марлевим короком та проводиться стерилізація композиції А у автоклаві за режиму 112 °С, 0,05 МПа впродовж 20-30 хв.

ДР 6.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для культивування у посівному апараті об'ємом 10,0 л.

ДР 6.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах зважується 58 г глюкози, 17,4 г солодового екстракту, 17,4 г дріжджового екстракту і 29,0 г пептону. Наважки поміщаються у реактор-змішувач об'ємом 10 л та подають 5,11 л води питної у реактор. Вмикається перемішуючий пристрій і отриманий розчин перекачують відцентровим насосом до інокулятора на 10 л, де стерилізується при 112 °С, 0,05 МПа впродовж 20-30 хв.

ДР 6.3. Приготування та стерилізація поживних середовищ для культивування у посівному апараті об'ємом 100,0 л.

ДР 6.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах зважується 580 г глюкози, 174 г солодового екстракту, 174 г дріжджового екстракту і 290 г пептону. Наважки поміщаються у реактор-змішувач об'ємом 100 л та подають 51,10 л води питної у реактор. Вмикається перемішуючий пристрій і отриманий розчин перекачують відцентровим насосом до інокулятора на 100 л, де стерилізується при 112 °С, 0,05 МПа впродовж 20-30 хв.

ДР 6.4. Приготування та стерилізація поживних середовищ для культивування у посівному апараті об'ємом 1000,0 л.

ДР 6.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах зважується 5,2 кг глюкози, 1,56 кг солодового екстракту, 1,56 кг дріжджового екстракту і 2,6 кг пептону. Наважки поміщаються у реактор-змішувач об'ємом 1000 л та подають 458,17 л води питної у реактор. Вмикається перемішуючий пристрій і отриманий розчин перекачують

відцентровим насосом до інокулятора на 1000 л, де стерилізується при 112 °С, 0,05 МПа впродовж 20-30 хв.

ДР 6.5. Приготування та стерилізація поживних середовищ для культивування у посівному апараті об'ємом 10,0 м^3

ДР 6.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах зважується 46,6 кг глюкози, 13,98 кг солодового екстракту, 13,98 кг дріжджового екстракту і 23,3 кг пептону. Наважки поміщаються у реактор-змішувач об'ємом 10,0 м^3 та подають 4194,0 л води питної у реактор. Вмикається перемішуючий пристрій і отриманий розчин перекачують відцентровим насосом до УБС-5, де стерилізується при 130 °С.

ДР 6.6. Приготування та стерилізація поживних середовищ для культивування у посівному апараті об'ємом 63,0 м^3

ДР 6.6.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через ваговий дозатор у реактор-змішувач об'ємом 50 м^3 зважується меляса, 62,79 кг дріжджового екстракту та 418,6 г кукурудзяного порошку та подають 26,674 м^3 води питної. Вмикається перемішуючий пристрій і отриманий розчин перекачують відцентровим насосом до УБС-15, де стерилізується при 130 °С.

ДР 6.6.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважується 62,79 кг сульфату амонію та 62,79 кг магнію сульфату. Наважки поміщаються у реактор-змішувач об'ємом 10,0 м^3 та розчиняють у 5,0 м^3 води питної. Вмикається перемішуючий пристрій і отриманий розчин стерилізується при 131 °С, 0,15 МПа впродовж 40 хв.

ДР 6.6.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних терезах зважується 62,79 кг K_2HPO_4. Наважку поміщаються у реактор-змішувач об'ємом 10,0 м^3 та розчиняють у 5,0 м^3 води питної. Вмикається перемішуючий пристрій і отриманий розчин стерилізується при 131 °С, 0,15 МПа впродовж 40 хв.

ТП 7. Підготовка посівного матеріалу [11]

ТП 7.1. Підтримання колекційної культури.

Колекційну культуру *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6 підтримували в агаризованому середовищі із складом (у г/л) глюкози 10, солодового екстракту 3, дріжджового екстракту 3, пептона 5, агару 20 та 1 л води за температури 2-4 °С. Культуру переносили на свіже середовище кожні 4 тижні

ТП 7.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6 розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі і вирощують при температурі 22±1 °С упродовж 24 год.

ТП 7.3. Вирощування посівного матеріалу у пробірках

Культуру бактерій *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6 із ізольованої колонії переносили у 30 мл стерильного середовища для вирощування в пробірки з гвинтовими кришками на 50 мл та інкубували при 22±1 ºС протягом 48 годин.

ТП 7.4. Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 1000 мл із стерильною композицією А (від *ДР 6.1.1*), перемішують і розливають по 145 мл у 4 стерильних качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *X. dendrorhous* (від *ТП 7.3*) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою відбирають отриману суспензію і вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовують суспензію, одержану з 1 пробірки.

Культивують на качалках (160 об/хв) при температурі 22±1 ºС упродовж 35 год і здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 7.5. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 10 л.

В інокулятор із стерильною композицією А (від *ДР 6.2.1.*) вноситься посівний матеріал від *ТП 7.4* через засівну колбу із дотриманням правил асептики. Доводять pH до 5.5 від *ДР 4.1.*

Культивування проводиться за температури 22±1 °С, 600 об/хв, pH 5,5 протягом 84 год.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 7.6. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 100 л.

В інокулятор із стерильною композицією А (від *ДР 6.3.1.*) вноситься посівний матеріал від *ТП 7.4* через засівну колбу із дотриманням правил асептики. Доводять pH до 5.5 від *ДР 4.1.*

Культивування проводиться за температури 22±1 °С, 600 об/хв, pH 5,5 протягом 84 год.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 7.7. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 1000 л.

В інокулятор із стерильною композицією А (від *ДР 6.4.1.*) вноситься посівний матеріал від *ТП 7.5* через засівну колбу із дотриманням правил асептики. Доводять pH до 5.5 від *ДР 4.1.*

Культивування проводиться за температури 22±1 °С, 600 об/хв, pH 5,5 протягом 84 год.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 7.8. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 10,0 м^3.

В інокулятор подається з УБС-5 стерильна композиція А (від *ДР 6.5.1.*) вноситься посівний матеріал від *ТП 7.4* через засівну колбу із дотриманням правил асептики. Доводять pH до 5.5 від *ДР 4.1.*

Культивування проводиться за температури 22±1 °С, 600 об/хв, pH 5,5 протягом 84 год.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 8. Виробничий біосинтез

ТП 8.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 63,0 м^3

В ферментер із стерильною композицією А (*від ДР 6.6.1*), Б (*від ДР 6.6.2*) і В (*від ДР 6.6.3)*, подають із реактора-змішувача (*від ДР 5.1*) розчин підживлення меляси, при чому роблять це порційно (6 порцій), кожні 25 год по 131 л розчину. Посівний матеріал поступає перетискуванням від ТП 7.7. Доводять pH до 5.5 від *ДР 6.1.*

Культивування проводиться за температи 22±1 °С, 600 об/хв, pH 5,5 протягом 168 год.

Протягом культивування ведеться моніторинг споживання карбону та азоту за допомогою методів контролю, вказаних у розділі 5. Кожні 8 год відбирається проба культуральної рідини та досліджується на чистоту мікробіологічної культури. Очікуваний вміст астаксантину складає 374 г/л.

РОЗДІЛ 8.

ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Карта постадійного контролю біосинтезу астаксантину

Номер контрольної точки та назва стадії	**Об'єкт контролю та показник, що визначається**	**Засоби та методи контролю**	**Періодичність перевірки та відбору проб**	**Нормативні значення показника**
ДР 1.1. Забір атмосферного повітря	Забір атмосферного повіт	вертикальної труби з повітрезабірником		H = 10м.
ДР 1.2. Очищення від грубих домішок	Очищене повітря, ступінь очищення повітря	Манометр, перевірка Ступеню очищення згідно паспортуфільтра	Після очистки у фільтрі грубого очищення	E = 95%,
ДР 1.3. Компреміювання повітря	Стиснене повітря, тиск, температура	Манометр, перевірка Ступеню очищення згідно паспортуфільтра	Наприкінці компресування	35–40°C.На виході після стиснення: 120–200°C,тиск становить 0,5 МПа.

Номер контрольної точки та назва стадії	**Об'єкт контролю та показник, що визначається**	**Засоби та методи контролю**	**Періодичність перевірки та відбору проб**	**Нормативні значення показника**
ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи	Охолоджене повітря, температура, вологість	Термометр технічний, психрометр	Після охолодження повітря і видалення вологи	10–50 ^{0}C Вологість повітря має становити 60-70%
ДР 1.5. Стабілізація термодинамічних показників	Підігріте повітря, температура,	Термометр технічний	Після нагріву повітря	температури 45-50 С
ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення повітря	Манометр, перевірка Ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі головного очищення	Е= 99%.
ДР 1.7. Очистка повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення повітря, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра, здійснення мікробіологічного контролю	Після закінчення очистки	Е=99,99 %.
Кт, 2.1. Приготування розчину	Розчин свинцового оцту Контролюємі	Лакмусовий папірець	Після	Свинцевий оцет повинен мати

свинцового оцту для освітлення меляси.	параметри pH		приготування	сильнолужну реакцію на лакмус і слаб-колужну на фенол-фталеїн.
Кт, 3.1 Освітлення меляси розчином свинцевого оцту	Розчин меляси Контролюємі параметри: Прозорість розчину	візуально	Після освітлення	Розчин має бути прозорим
Кх, Км 4.1.1 *Приготування 6%-го розчину соляної кислоти*	**Розчин соляної кислоти**	фізико-хімічний метод	визначення концентрації після приготування розчину	С = 6%
Кх, Км 4.2.1. 4.2.2 Приготування та стерилізація 6%-го розчину гідроксиду натрію	**Розчин натрію гідроксиду** Тиск, час, концентрація, асептичність	Манометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації	Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, С = 6%, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.1 Приготування і стерилізація розчину меляси	Розчин меляси Контролюємі параметри стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації Мікробіологічний контроль	Т = 112 °С; Р = 0,05 МПа; t = 20-30 хв, Відсутність мікробіоти

			здійснюється після стерилізації, мають бути повністю відсутні сторонні м/о	
Кт, Км 6.1.1, 6.2.1, 6.3.1, 6.4.4, 6.5.1 *Приготування та стерилізація композиції А*	Композиція А Контролюємо параметри стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації композиції А; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації, мають бути повністю відсутні сторонні м/о.	Т = 112 °С; Р = 0,05 МПа; t = 20-30 хв, Відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.6.1. *Приготування та стерилізація композиції А*	Композиція А Контролюємі параметри стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації композиції А; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації,	Т = 112 °С; Р = 0,05 МПа; t = 20-30 хв, Відсутність мікробіоти

			мають бути повністю відсутні сторонні м/о.	
Кт, Км 6.6.2, 6.6.3 *Приготування та стерилізація композиції Б*	Композиція Б і В Контролюємі параметри стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації композиції Б; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації, мають бути повністю відсутні сторонні м/о.	T = 131 °C; P = 0,15 МПа; t = 40 хв, Відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.1. *Підтримання колекційної культури*	Колекційна культуру бактерій *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6 Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр, холодильник, мікробіологічний контроль	Температура контролюється під час вирощування культури *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6 у термостаті та при зберіганні у холодильнику. Пересів та мікробіологічний контроль здійснюється	t = 4 тижні., T = 2-4 °C; Відсутність сторонньої мікробіоти

			кожні 4 тижні згідно цільової статті.	
Кт, Км 7.2. *Одержання робочої культури на агаризованих середовищах*	Культура бактерій *Xanthophyllomyces dendrorhous* Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр, термостат, мікробіологічний контроль	Температура контролюється під час вирощування культури *Xanthophyllomyces dendrorhous* у термостаті. Мікробіологічний контроль здійснюється після культивування.	T = 22±1 °C; t = 48 год, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 7.3. *Вирощування посівного матеріалу у пробірках*	Культура бактерій *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6 Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр, термостат, мікробіологічний контроль	Температура контролюється під час вирощування культури *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6 у термостаті. Мікробіологічний контроль здійснюється після культивування.	T = 22±1 °C; t = 48 год, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 8.5. *Вирощування культури у посівному апараті*	Температура, час, pH, об/хв, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, pH-метр, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, pH, швидкість обертів контролюється під час	T = 22±1 °C; pH = 5,5; Швидкість обертів = 600 об/хв;

об'ємом 10 л			вирощування культури *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Мікробіологічний контроль здійснюється після культивування.	t = 84 год, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 8.6. *Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 100 л*	Температура, час, pH, об/хв, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, pH-метр, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, pH, швидкість обертів контролюється під час вирощування культури *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Мікробіологічний контроль здійснюється після культивування.	T = 22±1 °C; pH = 5,5; Швидкість обертів = 600 об/хв; t = 84 год, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 8.6. *Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 1000 л*	Температура, час, pH, об/хв, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, pH-метр, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, pH, швидкість обертів контролюється під час вирощування культури *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Мікробіологічний контроль здійснюється	T = 22±1 °C; pH = 5,5; Швидкість обертів = 600 об/хв; t = 84 год, Відсутність сторонньої мікробіоти

			після культивування.	
Кт, Км 8.6. *Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 10 м³*	Температура, час, pH, об/хв, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, pH-метр, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, pH, швидкість обертів контролюється під час вирощування культури *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Мікробіологічний контроль здійснюється після культивування.	T = 22±1 °C; pH = 5,5; Швидкість обертів = 600 об/хв; t = 84 год, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 9.1 *Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 63,0 м3*	Температура, час, pH, об/хв, концентрація цільового продукту, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, pH-метр, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, pH, швидкість обертів контролюється під час вирощування культури *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Мікробіологічний контроль визначається під час культивування з періодичністю у декілька годин.	T = 22±1 °C; pH = 5,5; Швидкість обертів = 600 об/хв; t = 84 год, Відсутність сторонньої мікробіоти C_a = 374,0 г/л;

8.1. Мікробіологічний контроль

В мікробіологічному контролі стерильних поживних середовищ розуміється підтримання умов, котрі потрібні для нормальної життєдіяльності мікроорганізмів при виробничому процесі, що своєю чергою дає своєчасне виявлення контамінації та встановлення джерела її появи. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ здійснюють прямим мікроскопіюванням [6].

Мікробіологічний контроль чистоти культури здійснюється методом розсіву на чашки Петрі з агаризованими середовищами та мікроскопуванням.

Для проведення експрес-контролю використовують метод мікроскопіювання. Препарат готується методом "роздавлена крапля". На чисте та знежирене предметне скло наносять маленьку краплю культуральної рідини, накривають накривним скельцем так, щоб під ним не було повітряних пухирців, і розглядають за допомогою світлового мікроскопа. Аналіз проводиться з використанням об'єктиву 40×, а також з імерсійною системою для кращого розпізнавання деталей.

При відсутності контамінуючої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6.

Морфологія клітин:

- Клітини мають розміри 4,0 × 8,0–15,0 мкм.
- У рідкому середовищі представлені овальними та округлими клітинами.
- Спостерігається брунькування полярне та латеральне.
- Клітини можуть утворювати короткі ланцюжки або перебувати поодиноко.

Рис 5.1 Xanthophyllomyces dendrorhous у мікроскопі

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.2.1. Визначення концентрації біомаси

У стерильну пробірку або колбу із 9 мл стерильної дистильованої води додають 1 мл культуральної рідини. Суміш ретельно перемішують для рівномірного розподілу клітин у суспензії. Оптичну густину суспензії вимірюють за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 580 нм. Отримане значення оптичної густини використовують для визначення концентрації біомаси за калібрувальним графіком, який встановлює залежність між оптичною густиною (OD580) і кількістю сухої біомаси (г/л). Робочий діапазон OD580 для точного вимірювання: 0,1–1,0. При перевищенні цього діапазону суспензію розводять додатково.

8.2.2. Визначення концентрація астаксантину

Визначення концентрації астаксантину є ключовим етапом контролю продуктивності біосинтезу *Xanthophyllomyces dendrorhous* ВКМ Y-2912D. Концентрацію цільового продукту оцінюють після екстракції пігменту з біомаси за допомогою спектрофотометрії або високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Екстракція пігменту з біомаси Відбирають певний об’єм культуральної рідини (наприклад, 10 мл), центрифугують при 5000 об/хв протягом 10 хв для отримання осаду клітин. Осад промивають дистильованою водою і висушують. Суху біомасу зважують і подрібнюють (механічно або ультразвуком). Для екстракції пігменту додають органічний розчинник (наприклад, ацетон, метанол або етанол) у співвідношенні 1:10. Суміш інкубують у темряві при кімнатній температурі протягом 24 год або нагрівають до 30–40°C для покращення екстракції. Вимірювання концентрації Отриманий екстракт фільтрують для видалення твердих частинок.Вимірюють оптичну густину екстракту за допомогою спектрофотометра на довжині хвилі 474 нм (характерний максимум поглинання астаксантину).

8.2.3. Визначення концентрації амінного азоту

Визначення концентрації амінного азоту в культуральній рідині є важливим етапом моніторингу фізіологічного стану культури *Xanthophyllomyces dendrorhous* та ефективності використання джерел азоту. Амінний азот є ключовим показником азотного метаболізму та доступності амінокислот для клітин. Так як дріжджовий екстракт та пептон містять амінокислоти та пептиди то визначення концентрації останніх речовин можна провести визначенням концентрації амінного азоту. Метод засновано на блокуванні формальдегідом при pH=7,0 вільних аміногруп і титруванні лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп. Початок і кінець титрування визначають потенціометрично. В стакан об’ємом 50 мл наливають 2 мл дослідного розчину поживного середовища (або супернатанту культуральної рідини) і доводять об’єм водою дистильованою до 20 мл. Коригують pH потенціометрично до значення 7,0 за допомогою розчину NaOH 0,1М або HCl 0,1М. До нейтрального розчину додають 2,0 мл нейтрального формаліну (pH доводять до 7,0 10 %-им розчином NaOH), перемішують і титрують потенціометрично до pH 9,1 за допомогою розчину NaOH 0,1М. Вміст амінного азоту у зразку (в мг%) визначають за формулою: X= V· K·1.4·100 / 2 де, V – кількість розчину NaOH 0,1М в мл, що пішла на титрування проби; К – поправка дотитру розчину NaOH

0,1М, що використовувався; 1.4 – кількість амінного азоту в мг, еквівалентна 1 мл розчину NaOH 0,1М; 2 – об’єм зразка, мл.

8.2.4. Визначення концентрації глюкози

Контроль концентрації глюкози проводять за допомогою високоефективної рідинної хроматографії на системі HP 1100 (Hewlett Packard, США) за допомогою рефрактометричного детектора та колонки (300 ×6,5 мм) наповненої сополімером сульфованого полістиролу і дивінілбензолу в іонній формі кальцію з розміром частинок 30 мкм. Умови аналізу: температура колонки 80°С; швидкість потоку елюентів (деіонізованої води) - 0,5 $см^3$/хв. Проба до аналізу являє собою супернатант культуральної рідини, попередньо пробу піддають мембранній фільтрації з використанням фільтру з діаметром пор 0,22 мкм

РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва

9.1. Мікробіологічний контроль

Біотехнологічне виробництво, зокрема із використанням мікроорганізмів, таких як Xanthophyllomyces dendrorhous, передбачає інтенсивне використання поживних середовищ, води, енергоресурсів та утворення певної кількості рідких, твердих та газоподібних відходів. Одним із ключових напрямів охорони довкілля є виявлення потенційних екологічних ризиків на всіх етапах технологічного процесу та впровадження ефективних методів їх мінімізації.

9.2 Способи знезараження води

УФ-обробка — це метод знезараження води, який базується на використанні ультрафіолетового світла з довжиною хвилі близько 254 нм. Саме ця довжина хвилі максимально ефективна для руйнування ДНК і РНК мікроорганізмів, що призводить до їх інактивації.

Як працює УФ знезараження

Вода проходить через камеру, де розміщена УФ-лампа.

УФ-промені проникають у клітини бактерій, вірусів, дріжджів, спор та інших патогенів.

Внаслідок поглинання світла руйнується генетичний матеріал, що унеможливлює їх репродукцію та подальший ріст.

Важливо, що УФ не додає у воду хімічних речовин, тож вона не змінює свій склад і смак.

Переваги УФ знезараження:

Ефективність: знищує понад 99,9% бактерій, вірусів, дріжджів та інших мікроорганізмів.

Безпека: відсутність хімічних реагентів виключає утворення токсичних побічних продуктів.

Швидкість: знезараження відбувається миттєво — за кілька секунд.

Простота експлуатації: компактні установки легко інтегруються в технологічний процес.

Економічність: низькі витрати на експлуатацію, відсутність потреби у закупівлі хімікатів.

Обмеження:

УФ світло ефективне лише у чистій або напівочищеній воді, оскільки забруднення та мутність знижують проникність променів.

Не має залишкового ефекту — після обробки у воді не залишається активних знезаражувальних речовин, тому вода може повторно забруднюватися.

9.3 Способи знезараження повіття

1. Фільтрація через HEPA-фільтри (або стерильні фільтри)

Як працює:

HEPA-фільтри (High Efficiency Particulate Air) видаляють з повітря до 99,97% частинок розміром 0,3 мкм і більше. Їх встановлюють у вентиляційних системах або прямо перед входом повітря в біореактор (наприклад, через стерильний барботер чи аераційну трубку).

Переваги:

- Висока ефективність
- Відсутність хімікатів
- Використовується в лабораторіях і промисловості (GMP, ISO cleanrooms)

2. УФ-опромінення повітря

Як працює:

Повітря пропускається через спеціальні канали з встановленими УФ-лампами

(звичайно з довжиною хвилі 254 нм). Промені знищують бактерії, віруси, спори у повітрі.

Де застосовується:

- У повітроводах вентиляції
- У ламінарних шафах і боксах
- У зонах з підвищеними санітарними вимогами

Особливості:

- Повітря має бути чистим від пилу, інакше ефективність падає
- УФ-лампи потребують регулярної заміни (в середньому — раз на 6–12 міс.)

3. Хімічне знезараження (аерозольне або парове)

Як працює:

Використовують розпилення або насичення повітря парами дезінфікуючих речовин, як-от:

- Перекис водню (H_2O_2)
- Формальдегід (рідко через токсичність)
- Озон (O_3)
- Хлорвмісні сполуки

Застосування:

- Для дезінфекції приміщень перед початком процесу
- У замкнених системах, без присутності людей

Мінуси:

- Токсичність для персоналу
- Потреба в провітрюванні після обробки

4. Теплове знезараження (стерилізація повітря)

Як працює:

Повітря нагрівають до температури понад 180–200 °C у спеціальних камерах або трубопроводах. Такий метод застосовується для стерилізації повітря перед подачею в стерильний біореактор.

Переваги:

- Надійне знезараження навіть від спор
- Без додавання хімії

Недоліки:

- Високі енергозатрати
- Не підходить для усіх процесів

5. Плазмова або електростатична очистка повітря

Як працює:

Повітря проходить через іонізатори або плазмові блоки, які руйнують мікроорганізми та віруси на клітинному рівні.

Застосування:

- У високотехнологічних лабораторіях, фармацевтичних виробництвах, cleanroom-зонах

9.4 Способи знезараження тверих відходів

У процесі біотехнологічного отримання астаксантину за допомогою штаму *Xanthophyllomyces dendrorhous* DW6 утворюється значна кількість твердих відходів, які можуть містити живу або інактивовану біомасу дріжджів, залишки субстратів, фільтрувальні матеріали після екстракції, а також витратні матеріали, що контактували з культуральним середовищем (рукавички, фільтри, лабораторний посуд тощо). Незважаючи на те, що сам штам є непатогенним, ці відходи належать до категорії потенційно небезпечних біологічних матеріалів, і потребують обов’язкового знезараження перед утилізацією або повторним використанням.

Найпоширенішим та найефективнішим методом знезараження твердих біологічних відходів є **автоклавування**, тобто парова стерилізація при температурі 121 °C та надлишковому тиску 1 атм протягом 30–60 хвилин. Такий метод забезпечує повну інактивацію всіх мікроорганізмів, включаючи спори, і активно застосовується для знезараження клітинної біомаси, лабораторного інвентарю та допоміжних матеріалів, що контактували з культурою.

У випадках, коли автоклавування неможливе через великі обсяги або технічні обмеження, застосовується **хімічна дезінфекція**, зокрема занурення відходів у 6–10% розчин гіпохлориту натрію, 1–3% пероксиду водню або інші дозволені дезінфікуючі розчини. Такий метод ефективний для стерилізації одноразового посуду, фільтрів та інших контамінованих матеріалів. Однак після обробки необхідно забезпечити правильну утилізацію використаних дезрозчинів згідно з екологічними нормами.

Для остаточного знищення значних обсягів твердих відходів або залишків після екстракції астаксантину можливе **інсинераційне спалювання** у спеціалізованих печах при температурах понад 850 °C. Цей метод забезпечує повну деструкцію органічного матеріалу, включаючи термостійкі залишки, і є найбільш надійним з точки зору санітарії. Однак потребує енерговитрат і застосування газоочисних систем для запобігання викидам у довкілля.

За дотримання певних умов, **компостування термічно або хімічно знезараженої біомаси дріжджів** також може розглядатися як варіант екологічно безпечної утилізації. Після обробки така біомаса, що містить поживні речовини, може бути використана як органічне добриво в агропромисловості.

У випадках, коли неможливо забезпечити переробку або спалювання, тверді біовідходи можуть бути передані на полігони твердих побутових відходів **лише після попереднього знезараження**, що є обов’язковою умовою відповідно до санітарних вимог.

Таким чином, вибір способу знезараження залежить від типу, обсягу, складу відходів і технічних можливостей підприємства. Для забезпечення екологічної безпеки виробництва доцільно комбінувати кілька методів, що гарантують повну інактивацію біологічного агента та безпечну утилізацію залишків.

Список використаної літератури:

1. В Україні кожного року від серцево-судинних захворювань помирають https://www.ukrinform.ua/rubric-health/3713749-v-ukraini-soroku-ponad-400-tisac-osib-pomiraut-vid-sercevosudinnih-zahvoruvan.html?utm_source=chatgpt.com.

2. Zhou D., Yang L., Guo F., Jiang W., Jiang Y., Zhang W., Xin F., Jiang M. High astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* strain DW6 from cane molasses using two-stage pH strategies. Green Chemistry, Issue 8, 2024.

3. Астаксантин підвищеної сили [Електронний ресурс] – режим доступу: ttps://ua.iherb.com/pr/now-foods-extra-strength-astaxanthin-10-mg-30-softgels/121503?gad_source=1&gclid=Cj0KCQiAqL28BhCrARIsACYJvkcXt3MXjMAuJrKGlyck3u_kaUkAtYZn4Q5EkCLAAJnt_alBunO8Rl4aAgi1EALw_wcB&gclsrc=aw.ds

4. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.

5. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К. :НУХТ, 2009. – 336 с.

6. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних, і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.

7. Libkind et al., 2011. *Xanthophyllomyces dendrorhous, the astaxanthin-producing yeast: morphology and taxonomy*. PubMed

8. An, G.H. et al., 1999. *Production of astaxanthin by Xanthophyllomyces dendrorhous*. DOI:10.1007/s002530051293

9. Johnson E.A. & Lewis M.J. 1979. *Astaxanthin formation by the yeast Phaffia rhodozyma*. Applied and Environmental Microbiology

10. Schmidt et al., 2011. *Biotechnological production of astaxanthin with Phaffia/Xanthophyllomyces*. Biotechnology Letters

11. Gassel et al., 2014. *Improved astaxanthin production in X. dendrorhous by metabolic engineering*. Microbial Cell Factories

12 NCBI Taxonomy Browser — *X. dendrorhous* Tax ID: 5207

13. Diversey Europe B.V.*Technical Data Sheet: Divosan TC 86*. https://www.diversey.com/en/product-catalogue/divosan-tc-86-100909577 (перевірено: 03.06.2025)

14.https://en-de.ecolab.com P3-Alkoclean Product Data Sheet

15. https://www.diversey.com/en/product-catalogue/divosan-acid-100909576

16. https://en-de.ecolab.com/product/topax-66-acid Ecolab Deutschland GmbH .

17. https://www.diversey.com/en/product-catalogue/suma-foam-d23 Suma Foam D2.3 Technical Data Sheet

18.https://en-de.ecolab.com/product/incidin-pro Incidin Pro Technical Data Sheet Ecolab Deutschland GmbH

19.https://www.diversey.com/en/product-catalogue/oxonia-active

20.https://www.drweigert.com/en/products/disinfection/perform-cid/ Perform® CID – Desinfektionsmittel für die Lebensmittelindustrie

21. Domínguez-Bocanegra A.R. et al., 2007. Production of astaxanthin by *X. dendrorhous* in stirred tank fermenters. *Bioresource Technology*, 98(11), 2344–2350. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.008

22. Gassel M. et al., 2014. Metabolic engineering of *X. dendrorhous* for improved astaxanthin biosynthesis. *Microbial Cell Factories*, 13:128. https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-014-0128-2