МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»	**«До захисту допущено»**
Директор інституту(декан факультету)	Завідувач кафедри
_____ _Наталія ГРЕГІРЧАК_	_____ __Віктор СТАБНІКОВ_
(підпис) (ім'я та прізвище)	(підпис) (ім'я та прізвище)
«___» ___лютого__ 2023 р.	«___» ____лютого___ 2023 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності____162 «Біотехнології та біоінженерія»_____
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми ____«Біотехнології: фармацевтична, _____.
_____промислова, харчова, природоохоронна»_____
на тему:___Біосинтез каротиноїдів дріжджами *Rhodotorula glutinis*

Виконав: здобувач_5_ курсу, групи__1____

_____ДАНЧЕНКО Дар'я Русланівна_____ _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник ____РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович_____ _____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

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

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

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

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

Здобувач_____
(підпис)

Київ – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри _біотехнології і мікробіології_____

_____Віктор СТАБНІКОВ
“ _01_ **”** ___листопада___20 22 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Данченко Дар’я Русланівна .
(прізвище, ім’я, по батькові)

1. Тема роботи __Біосинтез каротиноїдів дріжджами *Rhodotorula glutinis*.
_____
_____
керівник роботи _____Резніченко Юрій Миколайович_____,
доцент, кандидат технічних наук_____,
(прізвище, ім’я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 781-кс
2. Строк подання здобувачем роботи__21 лютого 2023 р._____
3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Rhodotorula glutinis*, цільовий продукт: каротиноїди; геометричний об’єм ферментера: 10м^3, коефіцієнт заповнення: 0,64, біосинтез
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) *Характеристика каротиноїдів; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агенту Rhodotorula glutinis; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; контроль виробництва.*
5. Перелік графічного матеріалу
Технологічна схема біосинтезу каротиноїдів - 1 аркуш формату А1_____
Апаратурна схема біосинтезу каротиноїдів - 1 аркуш формату А1_____

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання____01 листопада 2022 року_____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	01.11.2022-20.11.2022	
2	РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА RHODOTORULA GLUTINIS	25.11.2022-01.12.2022	
3	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	15.12.2022-30.12.2022	
4	РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	01.01.2022-14.01.2022	
5	РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	15.01.2022-23.01.2022	
6	РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	25.01.2023-02.02.2023	
7	РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	03.02.2023-10.02.2023	
8	РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	16.01.2023-19.01.2023	
9	Апаратурна та технологічна схеми	20.01.2023-30.01.2023	

Здобувач _____ ____Дар’я ДАНЧЕНКО_____
(підпис) (ім’я та прізвище)

Керівник роботи _____ ____Юрій РЕЗНІЧЕНКО____
(підпис) (ім’я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дана кваліфікаційна робота присвячена біосинтезу каротиноїдів дріжджами *Rhodotorula glutinis*.

Представники видів *Rhodotorula* часто використовуються для промислового виробництва каротиноїдів. Через велику швидкість росту та одноклітинну природу дріжджі підходять для великомасштабного бродіння і це спонукає розглядати ці мікроорганізми як потенційні джерела пігментів.

Кваліфікаційну роботу виконано відповідно до отриманого варіанту завдання. Обсяг її становить 85 сторінок. Вона містить 15 таблиць, 9 рисунків і 2 додатки, використано дані з 31 джерела.

У кваліфікаційній роботі дано обґрунтування та викладено технологічний процес біосинтезу каротиноїдів, який включає блок допоміжних робіт (підготовка і стерилізація розчинів для підтримання рівня pH під час культивування а також підготовка і стерилізація поживних середовищ), стадії підготовки посівного матеріалу та вирощування культури у виробничому ферментері що має об'єм 10м^3.

Обгрунтовано вибір біологічного агента *Rhodotorula glutinis*. Наведено склад поживного середовища для культивування *Rhodotorula glutinis*. Запропоновано схему підготовки біологічного агента та підібрано режими стерилізації з урахуванням складу поживного середовища.

Розраховано кількість стадій підготовки посівного матеріалу, що необхідна для виробництва.

Ключові слова: *дріжджі, біомаса, каротиноїди, β-каротин, торулін, торулородин, живильні середовища, індуктори, попередники.*

ЗМІСТ

ВСТУП……6

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ……...9

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА *RHODOTORULA GLUTINIS* ..……...16

2.1. Обґрунтування вибору *Rhodotorula glutinis* …….....16

2.2. Морфолого-культуральні *Rhodotorula glutinis*……..…21

2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки *Rhodotorula glutinis* ……...21

2.4. Таксономічний статус…….....22

2.5. Схема біотрансформації ростового субстрату……..22

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ …….....26

3.1. Потреба у цільовому продукті……..…….26

3.2. Розрахунок потужності виробництва…….26

3.3. Розрахунок об’єму ферментера та кількості виробничих циклів…...28

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу…….29

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....31

4.1. Обґрунтування вибору умов культивування та ферментера……31

4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря……34

4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів ……...35

4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....40

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ……44

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ ……....49

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ……..…….64

7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів……64

7.2. Мікробіологічний контроль ……...68

7.3. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю……69

7.4. Визначення концентрації цільового продукту……..70

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ ……74

8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва каротиноїдів……..……74

8.2. Характеристика рідких відходів виробництва каротиноїдів….……..76

8.3. Характеристика твердих відходів виробництва каротиноїдів…..…...78

8.4. Характеристика газоподібних відходів виробництва каротиноїдів

…….....79

8.5 Заходи щодо зменшення об’ємів відходів ……80

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ……...81

ВСТУП

Дуже актуальним завданням сучасної біотехнології є пошук біологічно активних сполук, що синтезуються мікроорганізмами. Це сприяє можливості отримання різних продуктів, багатих на вітаміни, ліпіди, білки, мікроелементи та інші біологічно активні речовини шляхом мікробного синтезу.

Каротиноїди – сполуки, що є найбільш розповсюдженою і багаточисельною групою природних. пігментів. З кожним роком потреба в каротиноїдах зростає, що потребує розширення потенційних джерел їх отримання. В даний час каротиноїди можна отримати шляхом хімічного синтезу, мікробіологічним способом або виділенням із рослинної сировини. [1, с.4]

Новизна: каротиноїди вчені почали вивчати досить давно. Вперше каротин був виділений в 1831 році Вакенродером із ріпи та моркви, ним же і була запропонована назва для виділених кристалів — каротин (від латинського “карота” — морква). У 1961 році із епіфітної мікрофлори жита був виділений Mycobacterium phei, що є активним біосинтетиком бета-каротину. У наш час різко збільшився попит на каротиноїдні препарати. Це пов’язано із зростанням зацікавленості людей до здорового способу життя. У країнах Заходу середній рівень споживання бета-каротину становить близько 3 мг/добу, у США — до 1,5 мг/добу. Отже і препарат «Оптикс» описаний у даній кваліфікаційній може мати попит серед мешканців в тому числі і України. [31]

Каротиноїдні пігменти, що знаходяться в мікробній клітині, мають високу біологічну активність. Близько 10% каротиноїдів (альфа-, бета-, гамма-і дельтакаротин) є попередниками вітаміну А (ретинолу).

Крім провітамінної дії, каротиноїди знайшли застосування для профілактики та лікування багатьох захворювань: каротин має радіопротекторні властивості, посилює лікувальну дію деяких протипухлинних препаратів.

У багатьох країнах каротиноїдні пігменти використовуються як харчова добавка до хліба, масла, до маргарину та багатьох інших харчових продуктів. Використовуються каротиноїди і для виготовлення косметичних засобів, а також як корм для риб. [1, с.4]

Лікопін, наприклад, є найпотужнішим антиоксидантом серед різних поширених каротиноїдів. Це може бути корисним для профілактики серцевих захворювань і проти декількох видів раку. За даними деяких досліджень лікопін, пригнічує синтез холестерину і посилює деградацію ліпопротеїнів низької щільності.

У комерційних цілях каротиноїди використовуються як харчові барвники та харчові добавки. Як джерело каротиноїдів, зокрема β-каротину та ксантофілів, давно використовують рослинні екстракти. Хоча рослини залишаються важливими джерелами каротиноїдів, що зустрічаються в природі, для виробництва таких сполук зараз часто також використовуються різні мікробіологічні процеси. [2, с.4]

Очевидною є доцільність пошуку високопродуктивних штамів, розробки високопродуктивної біотехнології з культивування пігментних дріжджів, оптимізації поживних середовищ та способів отримання каротиноїдів, а також розширення списку екологічно чистих препаратів.

У зв'язку з тим, що дріжджі здатні синтезувати широкий спектр каротиноїдів, а також володіють здатністю в процесі ферментації накопичувати достатню кількість біомаси і зростати на відносно дешевих середовищах, вони

часто застосовуються у виробництві різноманітних речовин, в тому числі і каротиноїдів. [1, с.4-5]

Rhodotorula glutinis є пігментованими дріжджами, родини *Basidiomycota*, особливо важливими для харчової промисловості через їх біотехнологічний потенціал і наслідки для безпеки. Різні штами *Rhodotorula* мають такі важливі властивості, як виробництво великої кількості каротиноїдів, одноклітинних білків з етанолу, оцтової кислоти та ацетальдегіду.

Представники видів *Rhodotorula* часто використовуються для промислового виробництва каротиноїдів. Через велику швидкість росту та одноклітинну природу дріжджі підходять для великомасштабного бродіння і це спонукає розглядати ці мікроорганізми як потенційні джерела пігментів. [2, с.1,3]

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.

Препарат «Оптикс» містить у своєму складі каротиноїди: β-каротин 1,5 мг; лютеїн 2,5 мг; зеаксантин 0,5 мг. Окрім цього до цього складу входять ще вітамін Е 36 мг; вітамін С 225 мг; цинк 5 мг; мідь 1 мг.

Тож даний лікарський засіб поповнює дефіцит вітамінів та мінеральних речовин та чинить антиоксидантну дію. Дія препарату обумовлена ефектами речовин, що входять до його складу.

Лютеїн і зеаксантин – специфічні каротиноїди, що містяться безпосередньо у сітківці ока (так званій «жовтій плямі»). Дія цих речовин обумовлена їхньою високою антиоксидантною активністю та здатністю фільтрувати шкідливу частину світлового спектра.

Лютеїн і зеаксантин чинять антиоксидантну, екранізуючу та поглинаючу дію, запобігають розвитку вікових порушень.

β-каротин відіграє важливу роль у побудові зорового пігменту родопсину, що забезпечує адаптацію ока до зниженої освітленості, а також чинить антиоксидантну дію.

Дія *вітаміну С* – водорозчинного антиоксиданту – у препараті поєднується з *вітаміном Е*, що захищає клітини та тканини від пошкоджувальної дії надлишкової кількості вільних радикалів та перекисного окиснення ліпідів.

Мідь і *цинк* функціонують як компоненти численних металоензимів, каталізуючи їхню дію і попереджаючи утворення вільних радикалів. [28]

Каротиноїди належать до групи природних пігментів, які містяться у фруктах, овочах, рибі, яйцях і олії. Крім того, вони синтезуються деякими мікробами, включаючи дріжджі R. Glutinis.

Вони характеризуються жовтим, оранжевим або червоним забарвленням. Ці сполуки добре розчиняються в жирах, але не розчиняються у воді. [12]

Каротиноїди є ліпофільними пігментами з кон'югованими подвійними зв'язками майже виключно з транс-конфігурацією. [3]

За хімічною будовою каротиноїди належать до класу терпенів.

Молекули каротиноїдів складаються з восьми С5-ізопренових фрагментів і можуть закінчуватися циклогексеновим (іононовим) кільцем на одному або обох кінцях. Також існують каротиноїди з числом атомів вуглецю меншим за 40 (нор- і апокаротиноїди) і більшим (гомо-каротиноїди).

Полієновим ланцюгом спряжених подвійних зв'язків представлена хромофорна група каротиноїдів, що є причиною того що вони можуть поглинати світло у діапазоні 400–500 нм і мають жовте або оранжеве забарвлення. Каротини – це каротиноїдні вуглеводні (лікопін, β-каротин і його ізомери), а ксантофіли – це їх похідні з кисневмісними групами (лютеїн, зеаксантин, астаксантин, кантаксантин).

Каротиноїди у чистому вигляді мають такі характеристики: висока лабільність, вони є дуже чутливі до нагрівання, вмісту кисню у повітрі, дії сонячного світла, дії лугів і кислот. Вони можуть окиснюватись та руйнуватись від впливу цих факторів.

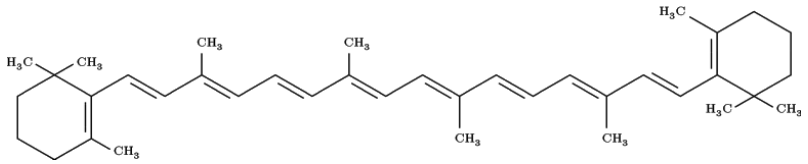
У живих організмах каротиноїди перебувають у різних станах: вільному, у каротинопротеїнових комплексах, а також у вигляді ефірів жирних кислот і глікозидів.

Каротиноїди виявлено в усіх органах і тканинах тварин, проте найбільше їх міститься у жировій тканині, печінці та наднирниках.

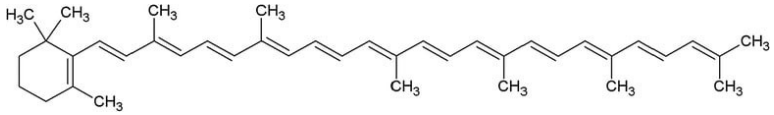
Природа каротинопротеїнового зв'язку лишається нез'ясованою, показано лише, що у цій взаємодії ковалентні зв'язки участі не беруть. [4, с.159-161]

Структура ізопренового ланцюга дозволила розділити дві групи цих сполук, а критерієм поділу є наявність кисню в молекулі. [13]

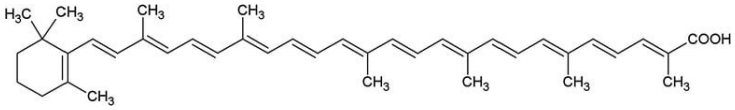
Існує велика кількість стереоізомерів, за рахунок наявності подвійних зв’язків, циклічних кілець і асиметричних атомів вуглецю. Більшість каротиноїдів у природі існує переважно у транс-формі. [4, с.159-161]



β-каротин



Торулін



Торулородин

Бета-каротин з молекулярною формулою C40H56 належить до групи каротиноїдів, що складається з ізопренових ланок. Наявність довгих ланцюгів сполучених подвійних зв’язків надає бета-каротину специфічні кольори. Це найпоширеніша форма каротиноїдів і попередник вітаміну А. Бета-каротин складається з двох ретинільних груп.

Торулін і торулородин представляють групу каротиноїдів і синтезуються дріжджами і грибами. Найважливішими виробниками цих двох сполук є дріжджі родів Rhodotorula та Sporobolomyces. Перші повідомлення, що підтверджують наявність торулену і торулярродина в клітинах мікроорганізмів, відносяться до 1930-1940-х років. Ці сполуки мають сильні антиоксидантні та антимікробні властивості, тому їх можна успішно використовувати як харчові добавки, сировину та косметичні добавки. Крім того, тести, проведені на щурах і мишах, показали, що і торулен, і торулярродін мають протиракові властивості.

Торулін (C40H54, 3′,4′-дигідро-β,ψ-каротин) і торулородин (C40H52O2, 3′,4′-дидегідро-β,ψ-каротин-16′-ова кислота), мають одне з’єднане β-іононове

кільце до полієнового ланцюга. Завдяки наявності тринадцяти подвійних зв'язків торулін і торулородин мають сильні антиоксидантні властивості. [13]

Гідрофобні властивості каротиноїдів зумовлюють їхню здатність вбудовуватися у мембрани. Молекули β-каротину та зеаксантину розміщуються всередині мембрани перпендикулярно до її площини, а у лютеїну частина молекули розміщена вертикально до мембрани, а друга частина молекули зігнута під прямим кутом і орієнтована паралельно до площини мембрани.

На даний момент ідентифіковано близько 600 різних видів каротиноїдів, і тільки з них 10% мають проА-вітамінну активність. А-вітамінну дію виявляють β-каротин і його ізомери, а також криптоксантин. Практично не утворюють вітаміну А оксикаротиноїди. Досить довго існувала думка, що основна функція каротиноїдів в організмі тварин це перетворення у вітамін А, що приймає участь у регуляції проліферації та диференціювання клітин, а також фоторецепції. Термін „вітамін А" містить в собі родину ретиноїдів,яка у свою чергу складається з ретинолу і його природних метаболітів: ретиналь, ретиноєва кислота і велика кількість різних синтетичних аналогів.

До теперішнього часу встановлено, що вітамін А має не лише роль забезпечення нормальних процесів зору, а й впливає на різні аспекти життєдіяльності живих організмів: на ріст і репродукцію, диференціацію та проліферацію клітин, бере участь у функціонуванні імунної системи та процесах кровотворення. Також каротиноїди є фоторецепторними молекулами у фотосинтезувальних організмів, а апокаротиноїди відіграють важливу роль в органах зору тварин. Один з механізмів дії ретиноїдів – це активація деяких генів. [4, с.160-161]

Препарати для очей, що містять торулародин, запобігають помутнінню кришталика ока. [16, с.28].

Каротиноїди додають у різні препарати для очей, серед них: оптікс таблетки, Нутроф® Форте, Теалоз® Дуо, Азитер®, офтальмовет, Комплівіт Офтальмо, тощо.

Також каротиноїди можуть бути компонентами препаратів, що містять комплекси вітамінів (Лютеїновий комплекс каротиноїдів Solgar Lutein Carotenoid Complex; капсули з рослинними каротиноїдами, вітамінами та міддю для шкіри Mivolis - Das gesunde Plus Carotin)

Каротиноїди виявляють оздоровчу дію на організм людини. Завдяки своїм антиоксидантним властивостям вони захищають шкіру від УФ-випромінювання. Вони мають антиоксидантну дію проти вільних радикалів, а також проти активних форм кисню. Вони зміцнюють імунітет і прискорюють загоєння ран. [12]

Тому їх часто додають в олії для засмаги (в т.ч. дитячі), креми для тіла обличчя та рук, молочко для тіла, різні скраби, шампуні для волосся, воду для вмивання, регенераційні масла.

Епідеміологічні дослідження показали, що зменшення споживання або засвоєння каротиноїдів збільшує ризик виникнення серцево-судинних захворювань, катаракти, раку та інших захворювань. Відомо, що каротиноїди знижують дегенеративні вікові зміни у тканинах, беруть участь у регуляції транскрипції генів, підвищують резистентність організму до канцерогенів та мутагенів, є інгібіторами проліферації злоякісних клітин, активаторами синтезу цитокінів та інтерлейкінів, а також вони здатні проявляти імуномодулюючу дію. [4, с.160-161].

Каротиноїди використовуються в різних галузях промисловості в якості компонентів косметичних засобів і добавок до кормів для худоби і риб. Вони також широко використовуються в харчовій промисловості як харчові пігменти.

Ліпофільний характер каротиноїдів робить їх більш стійкими до обробки кормів і тому можуть служити для прискорення апетиту у тварин, наприклад, птиці. [16, с.28]

У годівлі тварин і птиці широко застосовують каротиноїди (бета-каротин, апокаротин, астаксантин, кантаксантин, капсантин, капсорубін, лютеін)

Завдяки забарвлювальним властивостям, їх вводять у корми для пігментації яєчних жовтків, шкіри бройлерів, м’яса риби та креветок.

Каротиноїди захищають тканини від руйнування завдяки процесу окислення, який викликають вільні радикали. Це можна спостерігати в самок, коли вони переносять величезну кількість каротиноїдів у яєчні жовтки.

Пігменти, необхідні для фарбування, переносяться в продукти тваринного походження природним шляхом через споживання каротиноїдів, що містяться в кормі. [5, с.64-69]

Використання добавок на основі синтетичних та природних каротиноїдів у промисловому розведенні тварин економічно вигідне. Для посилення фарбування м'яса та яєць на тонну комбікорму потрібно близько 2 кг каротиноїдів, що надходять із кормами (кукурудзою, люцерною та ін.). У свою чергу, кормові добавки на основі натуральних пігментів вносяться орієнтовно від 100–400 г/тонну комбікорму, а їхні синтетичні аналоги — лише кілька десятків грамів на тонну, хоча за своєю будовою вони є тотожними природним сполукам. Таким чином, значно економляться кошти та ресурси.

Гранульовані та мікрокапсульовані форми спеціалізованих кормових добавок дозволяють захистити каротиноїди від впливу компонентів комбікормів та високих температур, а також полегшують їхнє змішування при виробництві премісів.

Як приклад можна навести добавку Карофіл, де каротиноїд розподілений у матриці желатину та вуглеводів, стабілізований антиоксидантами, зверху покритий оболонкою з кукурудзяного крохмалю.

Така технологія, як мікрокапсулювання, сприяє вивільненню активного компонента лише на рівні тонкого кишечника, перешкоджаючи руйнації їх ферментами, що скорочує витрата каротиноїдів. [23]

Одним з важливих факторів, що впливає на пігментацію у птахів, є здоров'я тварини. Хвороба сильно знижує засвоєння каротиноїдів. Зазвичай нездоровий або хворий птах був би блідим, оскільки він менш ефективно поглинає та відкладає каротиноїди у своєму тілі. Крім того, нездорові тварини будуть метаболізувати вже накопичені каротиноїди, щоб активувати свій імунний захист. [5, с.64-69]

Каротиноїди можуть забарвлювати яєчний жовток, шкіру та оперення декоративних риб і птахів у жовтий та червоний кольори, та їх відтінки. Вони також можуть утворювати комплекси з білками та ліпопротеїнами, утворюючи навіть більш широкий діапазон кольорів, включаючи зелені та сині відтінки. Характерна пігментація м'яса лосося та форелі від рожевого до помаранчевого кольору також є результатом відкладення каротиноїдів.

Відомо що торулін покращує колір та інші органолептичні властивості яєць та м'яса. [16, с.28]

Бета-каротин використовують головним чином у харчовій промисловості, а також при виготовленні ліків і косметичних засобів.

Бета-каротин і лікопін застосовують як пігментні речовини і барвники при виготовленні таких харчових продуктів, як ковбаси і шинки вироби, вершкове масло. Як барвник використовують також ОІ-апо-8- каротіналь, що надає помаранчеве забарвлення багатьом кондитерським виробам, сирам і овочевим пастам. В харчові жири, особливо в вершкове масло і маргарин,

додають ОІ-Каротин, завдяки чому організм отримує додаткову кількість необхідного для нього вітаміну А, а масло - більш привабливий колір. Водорозчинні каротиноїди застосовуються для фарбування напоїв та інших харчових продуктів. В Італії існує давня традиція додавати каротиноїди в макаронні вироби. Часто каротиноїди-барвники використовують у поєднанні з аскорбіновою кислотою, що забезпечує більшу стабільність пігментів.

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента *Rhodotorula glutinis*

2.1 Обгрунтування вибору біологічного агента

Роди Rhodotorula належать до великої групи аспорогенних пігментованих дріжджів, що належать до типу Basidiomycota. Вони широко поширені в природі та були виділені майже у всіх відомих середовищах, квітах, філоплані, зразках прісної та морської води, льодовиках, ґрунті тощо. Деякі види також були описані як збудники опортуністичних мікозів. [7, с. 275]

Rhodotorula glutinis – це дріжджі, що є перспективними мікроорганізмами, що мають високу синтетичну активність корисних метаболітів, незначну вибагливість до складу поживного середовища та умов культивування. Вони є прототрофними мікроскопічними грибами що швидко ростуть. Цей вид дріжджів здатен продукувати досить широкий спектр біологічно активних речовин (БАР): ліпіди , екзополісахариди, ергостерол, багато цінних ферментів, а також каротиноїди, а саме β-каротин, торулін, торулародин і незначну кількість зеаксантину. [6, с.183]

Мікробіологічний синтез є більш ефективним методом у порівнянні з екстракцією з овочів або хімічним синтезом. Найважливіші переваги процесу включають можливість знизити витрати за рахунок використання вдосконалених штамів і недорогих (часто відходів) джерел вуглецю та азоту в культуральних середовищах. [12].

Початковий штамм виробництва це дикий штамм Rhodotorula glutinis NCIM 3353. Щоб отримати найбільш активний штамм для виробництва β-каротину використовуємо ультрафіолет (табл.2.1):

Таблиця 2.1

Штам	Склад поживного середовища	Умови	Кількість виробленого β-каротину, mg/l	Загальна кількість вироблених каротиноїдів, mg/l	Джерело
Rhodotorula glutinis NCIM 3353	Глюкоза 25,0г/л Дріжджовий екстракт 10,0г/л K2HPO4 2,0г/л KH2PO4 2,0г/л	Без впливу UV t =37 °C, τ=24 год, n=150 об/хв, pH=6,0 відсутність сторонньої мікробіоти	0,32	2,2	[16]
Rhodotorula glutinis mutant R3		150 секунд UV (220-280 nm) t =37 °C, τ=24 год, n=150 об/хв, pH=6,0 відсутність сторонньої мікробіоти	3,84	24	
Rhodotorula glutinis mutant Y		230 секунд UV (220-280 nm) t =37 °C, τ=24 год, n=150 об/хв, pH=6,0 відсутність сторонньої мікробіоти	15,75	25	
Rhodotorula glutinis mutant 32		290 секунд UV (220-280 nm) t =37 °C, τ=24 год, n=150 об/хв, pH=6,0 відсутність сторонньої мікробіоти	22,8	33	

Порівняльна характеристика продуцентів каротиноїдів (табл. 2.2)

Продуцент	Rhodotoruls glutinis	Phaffia rhodozyma	Scenedesmus obliquus	Laetiporus sulphureus	Methylorubrum extorquens
Вид	Дріжджі	Дріжджі	Мікроводорості	Нижчі гриби	Бактерії
Тип дихання/живлення	Облігатні аероби	Факультативні аероби	Облігатні аероби, фотоавтотрофи	Облігатні аероби, гетеротрофи	Факультативні метилотрофи

Так як склад поживного середовища не змінюється, а змінюється лише час впливу ультрафіолету на штам дріжджів, то вартість середовища буде однакова і не відіграватиме ролі у порівнянні продуцентів. Звідси можна зробити висновок що серед усіх мутантів штам *Rhodotorula glutinis mutant 32* найкращий для виробництва каротиноїдів.

Температура росту культури	Термостійкі (t_{max}= 62,5°C протягом 10 хвилин)	22-30°C	Термотолерантні – можна культивувати при 40ºC	15-30°C	4-30°C
Оптимальний pH	1,5-6	4-5	6-8	2,5-7,5	7,5-8
Час необхідний для вирощування культури (за оптимальних умов, для максимально ефективного видобутку речовин)	2 доби	2 доби	4-6 діб	10-12 діб	3 доби
Каротиноїди, що виробляються	β-каротин, торулін, торулородин та астаксантин (незначна кількість)	Астаксантин	β-каротин, астаксантин, зеаксантин, неоксантин, лороксантин, віолаксантин, лютеін	Астаксантин	Лютеін, віолоксантин, зеаксантин, неоксантин
Недоліки використання	- відносно дороговартісне виробництво	- для культивування необхідна стала температура, що не перевищує 30°C - продукують лише астаксантин -природний штам ампліфікує лише 0,02-0,04% каротиноїду [25]. Це категорично мала для постановки промислового виробництва.	- дороговартісний процес виробництва; - велике споживання добрив;	- виробляють невелику кількість каротиноїдів	- виробляють переважно ксантофіли, а саме гідроксипохідні каротиноїдів

Переваги використання	- витримують високі температури (їх вирощування не залежить від клімату та пори року) - короткий виробничий цикл - висока специфічна швидкість росту - клітини можна культивувати в звичайних біореакторах, а біомасу можна використовувати безпосередньо як корм або як добавку до фармацевтичних продуктів - можливе використання багатьох відходів як компонентів культуральних середовищ - можуть адаптуватися до різних умов навколишнього середовища та рости в широкому спектрі джерел вуглецю та азоту	- здатні жити без присутності кисню - мають високу швидкість росту	- термотолерантні - мікроводорості здатні використовувати органічний вуглець як джерело енергії в гетеротрофних і міксотрофних умовах, що дозволяє їх вирощувати в середовищі, яке складається переважно зі стічних вод, які можна використовувати для постачання поживними речовинами та зниження глобальних витрат на процес	- можуть рости на дешевих середовищах	- поширені у природі; - є перевагою стабільність під час зберігання - мають високий рівень антагоністичної активності щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів - висока швидкість росту на простих мінеральних середови-щах - невелика тривалість культивування для досягнення максимального рівня біомаси

Рішенням було обрати дріжджі R. Glutinis бо вони мають великий потенціал для промислового застосування. Вирощування цих дріжджів не залежить від клімату та пори року, а виробничий цикл короткий. Крім того, дріжджі R. glutinis здатні метаболізувати різні речовини як джерела вуглецю та азоту, тому можливе використання багатьох відходів як компонентів

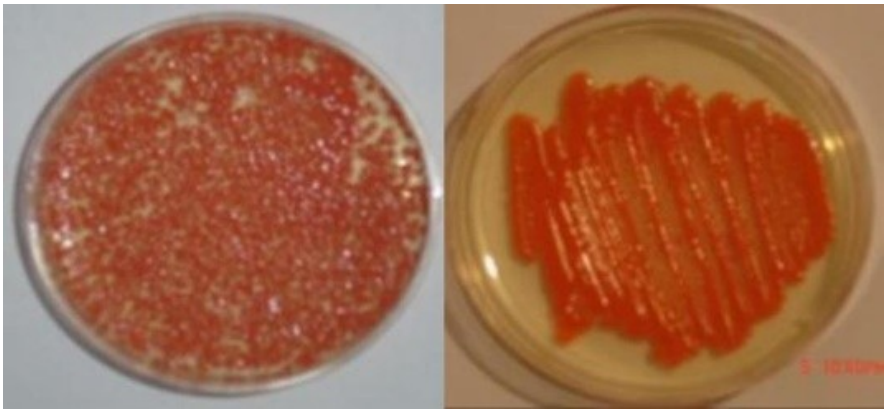
культуральних середовищ. Як наслідок, можливе біорозкладне промислове сміття з одночасним виробництвом дріжджової біомаси, що містить цінні поживні речовини. Проте все ще необхідно провести дослідження щодо зниження вартості отримання ліпідів, каротиноїдів та ферментів з біомаси дріжджів R. glutinis для індустріалізації цих процесів. [12]

Виробництво каротиноїдів за допомогою дріжджів Rhodotorula має переваги перед іншими мікроорганізмами, такими як водорості та інші гриби. Специфічна швидкість росту є високою, і велику кількість клітинної біомаси відносно легко отримати в масштабі лабораторії та дослідної установки. Клітини можна культивувати в звичайних біореакторах, а біомасу можна використовувати безпосередньо як корм або як добавку до фармацевтичних продуктів. Крім того, дріжджі можуть адаптуватися до різних умов навколишнього середовища та рости в широкому спектрі джерел вуглецю та азоту. [7, с. 276]

2.2 Морфолого-культуральні ознаки

Rhodotorula є членом родини Cryptococcaceae, підродини Rhodotorulodeae. Rhodotorula glutinis є сапрофітами та широко поширені в природі.

Rhodotorula glutinis утворює круглі або овальні клітини, гладкі, червоні колонії (рис. 2) пов'язані з каротиноїдним пігментом, і при мікроскопічному дослідженні мають багатостороннє брунькування, відсутність псевдогіф і аскоспор. При дозріванні клітини досягають діаметра 3-5 мкм і мають круглу, овальну або подовжену форму, агрегуючи у вигляді мукоїдних колоній.



2.3 Фізіолого-біохімічні ознаки

Облігатні аероби. Бродіння відсутнє. Культура асимілює галактозу, сахарозу, мальтозу, целлобіозу, трегалозу, рафінозу, D-ксилозу, L-арабінозу, рібітол, D-манітол, бурштинову кислоту, лимонну кислоту. Не асимілює лактозу, розчинний крохмаль, L-рамнозу, еритритол, інозитол. Не потребує вітамінів. На середовищі 50% глюкози не росте. Крохмаль не накопичує. Сечовину розщеплює. Оптимальна температура росту 30-40ºС. Оптимум pH 5,0-6,0. Штам непатогенний. Термостійка, що є рідкістю для дріжджів, витримує 62,5°C (144,5 ° F) протягом 10 хвилин. [9]

Розмноження зазвичай здійснюється багатополярним брунькуванням, хоча іноді утворюються псевдогіфи. Статеве розмноження здійснюється

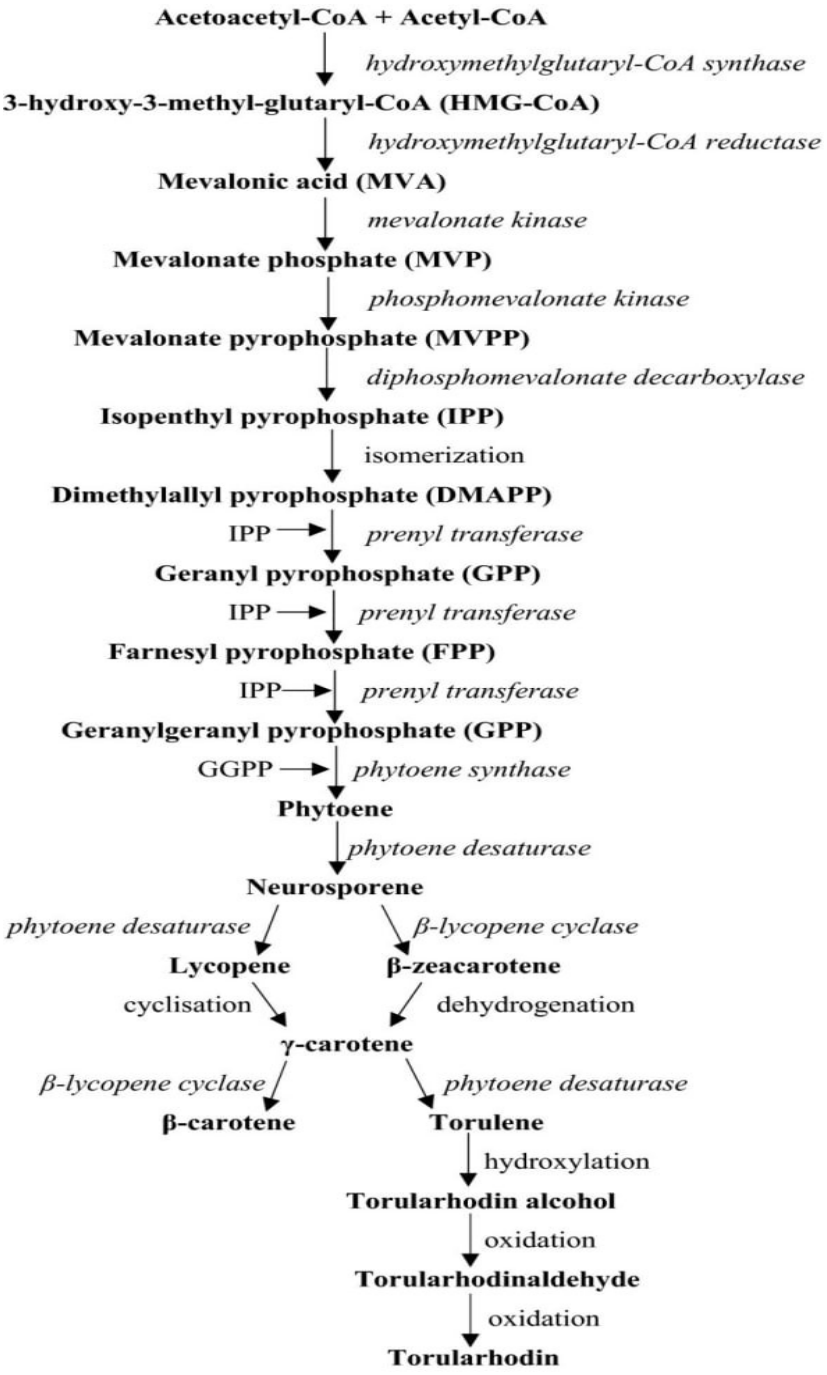
базидіоспорами, що виникають з теліоспори, що розвинулася зі з'єднання міцеліального затиску. [2, с. 64–72]

2.4 Таксономічний статус

Домен:	*Ядерні (Eukaryota)*
Царство:	*Гриби (Fungi)*
Відділ:	*Базидіомікотові (Basidiomycota)*
Клас:	*Microbotryomycetes*
Порядок:	*Sporidiobolales*
Родина:	*Sporidiobolaceae*
Рід:	*Rhodotorula*

2.5 Схема біотрансформації ростового субстрату

Шляхи біосинтезу від ацетил-КоА до бета-каротину, торулену та торулородину у видів Rhodotorula (рис. 3) [10, с. 165]; (fig. 1,4; 1,5; 1,6) [16, с. 9-11]


Acetoacetyl-CoA + Acetyl-CoA
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase
3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA)
hydroxymethylglutaryl-CoA reductase
Mevalonic acid (MVA)
mevalonate kinase
Mevalonate phosphate (MVP)
phosphomevalonate kinase
Mevalonate pyrophosphate (MVPP)
diphosphomevalonate decarboxylase
Isopenthyl pyrophosphate (IPP)
isomerization
Dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP)
IPP
prenyl transferase
Geranyl pyrophosphate (GPP)
IPP
prenyl transferase
Farnesyl pyrophosphate (FPP)
IPP
prenyl transferase
Geranylgeranyl pyrophosphate (GPP)
GGPP
phytoene synthase
Phytoene
phytoene desaturase
Neurosporene
phytoene desaturase
β-lycopene cyclase
Lycopene
β-zeacarotene
cyclisation
dehydrogenation
γ-carotene
β-lycopene cyclase
phytoene desaturase
β-carotene
Torulene
hydroxylation
Torularhodin alcohol
oxidation
Torularhodinaldehyde
oxidation
Torularhodin

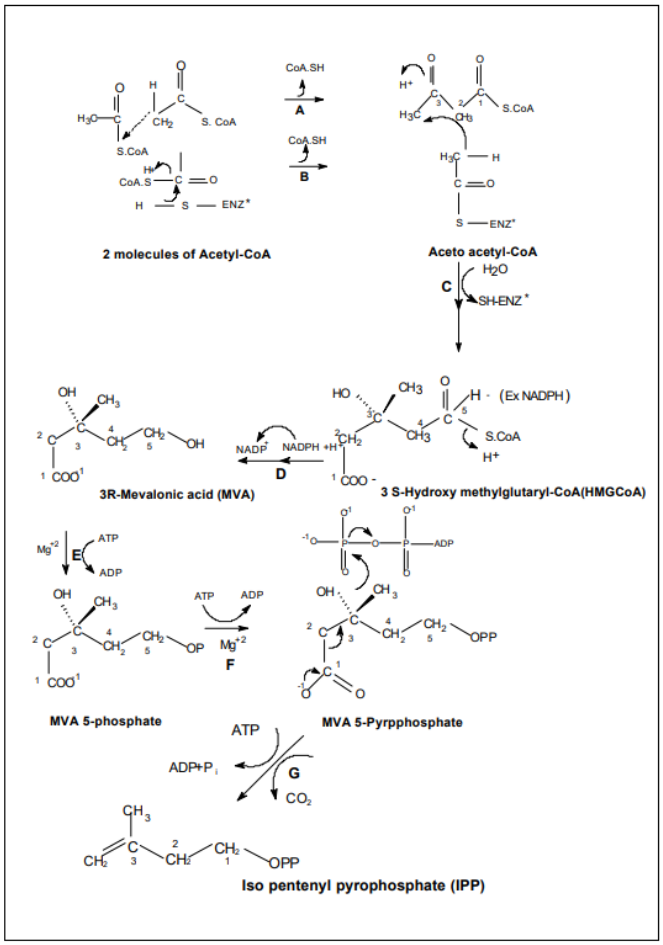


Figure 1.4 General biosynthetic pathway for the formation of isopentyl pyrophosphate (IPP).

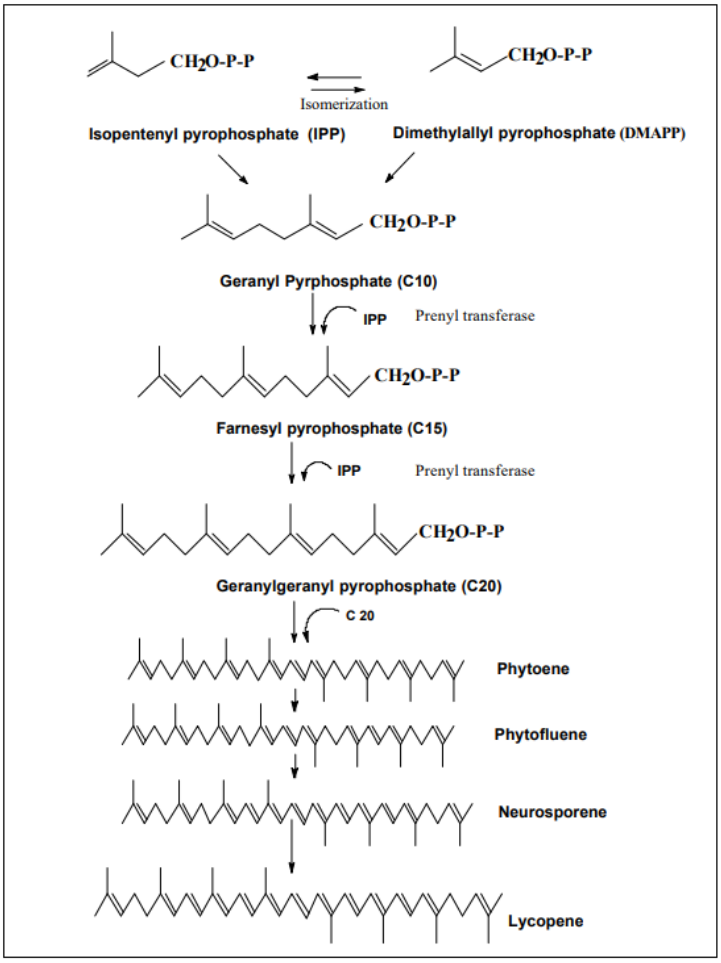


Figure 1.5 Proposed pathway for lycopene synthesis.

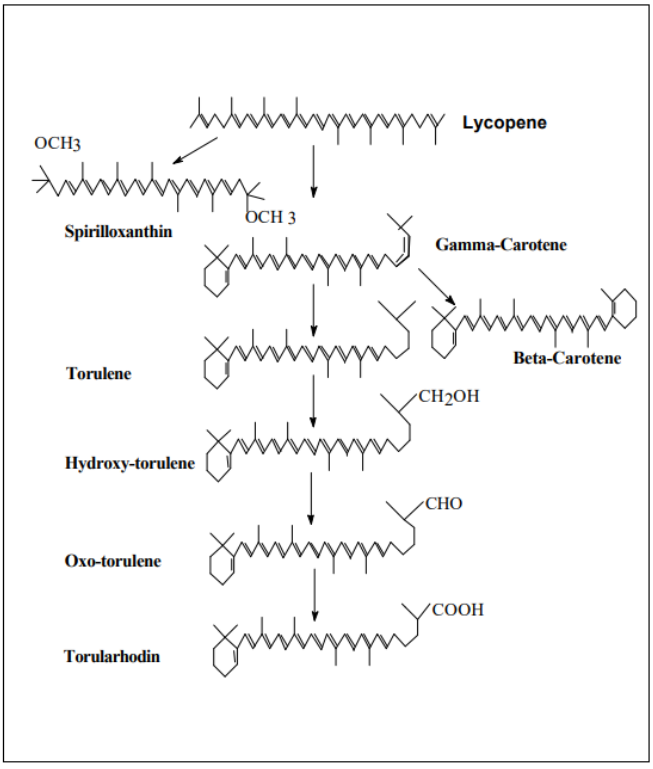


Figure 1.6 Proposed pathways for the transformation of carotenoids (Simpson *et al.* 1964)

Біосинтез β-каротину, торулену та торулародину в клітинах мікроорганізмів включає низку ферментативних реакцій.

Спершу, ацетил-КоА перетворюється на 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА в реакції, що каталізується гідроксиметилглутарил-КоА-синтазою. Потім 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА перетворюється на мевалонову кислоту гідроксиметилглутарил-КоА-редуктазою. Мевалонова кислота перетворюється на ізопентенілпірофосфат (ІПП) у кількох реакціях, що каталізуються специфічними кіназами та дифосфомевалонатдекарбоксилазою. Ізопентенілпірофосфат згодом перетворюється на диметилалілпірофосфат (DMAPP) шляхом ізомеризації. Наступний крок, реакція приєднання трьох молекул IPP, призводить до утворення геранілгеранілпірофосфату (GGPP). Конденсація двох молекул цієї сполуки призводить до утворення фітоєну, який каталізується фітоенсинтазою. Подальші реакції каталізує фітоєндесатураза. Цей фермент бере участь в утворенні нейроспоренів і каталізує до трьох стадій десатурації. Нейроспорен може перетворюватися на лікопін або β-зеакаротин. Циклізація лікопіну або дегідрування β-зеакаротину призводить до утворення γ-каротину. Молекула γ-каротину є попередником для біосинтезу β-каротину та торулену, тоді як торулярродин отримують шляхом подальшого перетворення торулену, включаючи гідроксилювання та окислення. [13]

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1 Потреба у цільовому продукті.

У даному розділі розглянемо потребу у полівітамінному препараті «Оптикс»:

Показання до застосування препарату:

Поповнення необхідних вітамінів і мінералів при захворюваннях очей (вікова дегенерація сітківки, катаракта, ретинопатії, хвороби зорового нерва).

Профілактика вікових порушень зору і захворювань очей у групах ризику (у віці старше 55 років; у хворих на цукровий діабет; при наявності спадкової схильності до катаракти або дегенерації сітківки; у курців; в осіб зі світлими очима).

Профілактика захворювань очей при значних зорових навантаженнях (робота з комп'ютером, під впливом УФ-променів, випромінювання телеекранів); при порушеннях нічної адаптації зору; під час одужання після офтальмологічних операцій.

Протипоказання: гіперчутливість до компонентів препарату, виражена ниркова недостатність, хронічний гломерулонефрит, саркоїдоз, гіпервітаміноз А та Е, тромбофлебіт, порушення обміну заліза або міді, тиреотоксикоз, одночасний прийом ретиноїдів. [28]

3.2 Розрахунок потужності виробництва.

Препарат виготовляється в Україні на Київському вітамінному заводі і продається в усіх містах України. Київський вітамінний завод — українське підприємство фармацевтичної промисловості, розташоване в місті Київ, зайняте в галузі виробництва ліків, вітамінів та біодобавок.

У світі близько 253 млн осіб страждають від порушень зору, 36 млн з них уражені сліпотою — такі дані ВООЗ.

За рік в Україні в середньому реєструють близько 1,5 млн випадків захворювань очей, серед них — понад 300 000 серед дітей. Дітям до 12 років препарат застосовувати не рекомендовано. Так як статистичні дані не вказують на вікові категорії дітей що страждають на захворювання очей то будемо враховувати лише людей старше 18 років. [29]

1500000 – 300000 = 1200000 млн випадків захворювань очей реєструється серед дорослої частини населення.

З них 40% (приблизно 360000) можуть мати протипоказання до застосування.

Тобто 840000 людей є потенційними покупцями препарату «Оптикс» в Україні. Ще 50% (420000) з них можуть вважати препарат не ефективним, через те що він відноситься до групи БАД, а ще 45% забажають скористатися аналогами. Такими препаратами можуть стати українські препарати що містять схожі компоненти чи препарати закордонного виробництва, наприклад: драже Мерц, таблетки Квадевіт, Вітрум Б'юті Плюс, сироп Дпельгерц Енерготонік Н, капсули Вазавітал.

Отже потенційно наш препарат вживатиме в кращому випадку лише 5% людей. 840000 – 756000 = 42000 осіб.

Препарат застосовують внутрішньо під час або після прийому їжі. Дорослим та дітям від 12 років призначають по 1 таблетці 1 раз на добу протягом 2-3 місяців. Максимальна добова доза – 1 таблетка. Тривалість курсу лікування визначає лікар індивідуально. У разі необхідності, при відсутності стійкого ефекту, призначають повторні курси після консультації з лікарем.

Приймати вітаміни краще на початку весни і в кінці осені а отже середній курс лікування триватиме 2 місяці 2 рази на рік.

1 таблетка містить β-каротину 1,5 мг; лютеїну 2,5 мг; зеаксантину 0,5 мг; вітаміну Е 36 мг; вітаміну С 225 мг; цинку 5 мг; міді 1 мг; [28]

Отже потреба каротиноїдів для однієї людини має становити 4,5 мг на день, 135 мг на місяць, 270 мг на 2 місяці, 540 мг на рік.

Для вирахуваної кількості людей (якщо усі прийматимуть препарат) необхідно виробити 22 680 000 мг = 22,6 кг каротиноїдів.

Оскільки концентрація каротиноїдів у цільовому продукті = 33 мг/л, а потреба в Україні 22 680 000 мг/рік, то розрахуємо об'єм культуральної рідини за рік:

$V_{КР}^{\text{річ}}$= 22 680 000/33 = 687272 л = 687 м^3 культуральної рідини

Нам також необхідно врахувати втрати, що можуть виникнути у процесі виробництва, вони досягають 10%, що означає, що з урахуванням втрат річний об'єм культуральної рідини дорівнюватиме:

$V_{КР}^{\text{річ}}$ =687+687×0,1= 756 м^3

3.3 Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

1. Нехай кількість робочих днів на рік – 300.

Nеф. = 300×24 = 7200 год – ефективний фонд робочого часу**.**

1. Розрахунок циклу роботи ферментера:

Тцф = Тф+Тдр = 48+13 = 61 (год), де

Тф – тривалість біосинтезу (виробничої ферментації);

Тдр – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи скаладаються з: миття та огляду (4 год), перевірки на герметичність (2 год), стерилізації (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (2 год), засіву (1 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

4. Кількість циклів за рік складатиме:

$$\textbf{nц}=\frac{Nee}{Tцц}=\frac{7200}{61}=\textbf{118}$$

4. Об’єм культуральної рідини, який необхідно отримати за цикл:

$$\mathbf{V_{КР}^{ц} = V_{КР}^{рік} / nц = 756/118 = 6{,}4\ м^3}$$

Обираємо ферментер що має об’єм 10 $м^3$ і коефіцієнт заповнення $К_{зап.}$ = 0,64. Об'єм культуральної рідини становить Vк.р = 6,4 $м^3$, що трошки більше розрахованого.

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Для вирощування продуцентів каротиноїдів використовуються ферментери що мають загальний об’єм 10 $м^3$. Коефіцієнт заповнення $К_{зап.}$ = 0,64. Отже, робочий об’єм ферментера:

$$V_{роб} = V_{заг} \times К_{зап} = 10 \times 0{,}64 = 6{,}4\ м^3$$

Тепер можемо визначити кількість стадій підготовки посівного матеріалу, для того щоб приготувати 6,4$м^3$ культуральної рідини. Кількість посівного матеріалу дорівнює близько 10 % від загального об’єму поживного середовища.

1) Для того, щоб приготувати 6,4 $м^3$ культуральної рідини, необхідно мати: 6,4 × 0,1 = 0,64 $м^3$ посівного матеріалу. Таку кількість матеріалу можна приготувати у ферментері з об’ємом 1 $м^3$.

2) Для того, щоб приготувати 0,64 $м^3$ культуральної рідини, необхідно мати: 0,64 × 0,1 = 0,064 $м^3$ (64л) посівного матеріалу. Таку кількість можна приготувати у ферментері з об’ємом 100 л.

3) Для того, щоб приготувати 64 л культуральної рідини, необхідно засіяти поживне середовище 64 × 0,1 = 6,4 л посівного матеріалу (приготування здійснюватимемо у ферментері з об’ємом 10 л).

4) Для того, щоб приготувати 6,4 л культуральної рідини, необхідно мати: 6,4 × 0,1 = 0,64л посівного матеріалу. Таку кількість матеріалу можна отримати при вирощуванні у колбах на качалках.

Згідно з проведеними розрахунками для біосинтезу необхідно встановити один ферментер об’ємом 10 $м^3$, один інокулятор об’ємом 1 $м^3$, один інокулятор об’ємом 100 л і один інокулятор об’ємом 10 л.

Отже, процес підготовки поживного середовища буде проходити у чотири етапи, де п’ятий етап – це сам процес біосинтезу.

РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми

4.1 Обґрунтування вибору умов культивування та ферментера

На культивування R. glutinis впливають численні параметри середовища та ферментації. Щоб покращити продуктивність і, відповідно, знизити вартість цих біотехнологічних процесів, було проведено кілька досліджень для оптимізації умов культивування, включаючи фізичні та харчові фактори, такі як: природа та концентрація джерел вуглецю та азоту, мінералів, вітамінів, pH, аерація, температура, світло, стрес, опромінення, мікрофільтрація та перемішування, які мають більший вплив на ріст клітин та врожайність.

Відомо, що стрес у біологічних тканинах викликає біохімічну реакцію, що включає підвищення активності ферментів і підвищення рівня каротиноїдів, коли вони вирощуються в несприятливих умовах. Такі метали як калій, мають певні функції в мікроорганізмах, наприклад, структурна стабілізація рибосом, які пов'язані з великою часткою внутрішньоклітинного K^+ (і Mg^{2+}) у бактеріях і є також пов'язані з активацією багатьох мікробних ферментів. Різні джерела вуглецю та азоту для вирощування Rhodotorula, включаючи виноградне сусло, глюкозний сироп, бурякову патоку, соєвий шрот, екстракт кукурудзяного борошна, екстракт торфу, патоку цукрової тростини та ультрафільтровану сироватку, досліджували з метою розробки культурального середовища для отримання максимальної кількості бажаного продукту та, крім того є економними.

Rhodotorula glutinis є аеробом, для своєї життєдіяльності потребує молекулярний кисень, накопичення біомаси відбувається на рідкому поживному середовищі.

Оптимальною температурою для культивування бактерій є 37 °С та pH = 6,0, за таких умов є можливим ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами. Тому ми маємо забезпечити під час біосинтезу асептичні умови, які при поверхневому культивуванні досягти неможливо. Такі умови забезпечуються якщо буде проведено стерилізацією не тільки поживного середовища, а ще й обладнання [3].

Тому, можна наголосити, що культивування *Rhodotorula glutinis* для біосинтезу каротиноїдів здійснюють глибинним способом, так як він полягає у вирощуванні мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі. Він є технічно досконалішим та має ряд вагомих переваг перед поверхневим культивуванням, а саме:

- дозволяє значно зменшити виробничі площі;
- дозволяє автоматизувати і механізувати процес повністю;
- дозволяє перейти культивування у безперервному режимі;
- дозволяє поліпшити санітарно-гігієнічні умови праці.

Глибинне культивування мікроорганізмів можна здійснювати двома способами: періодичним і безперервним. Безперервна ферментація проводиться в умовах сталого режиму, тоді коли популяція мікробів та її продукти мають найбільшу однорідність. Це одна з вагомих переваг безперервного культивування над періодичним.

Якщо застосовувати глибинний спосіб культивування то раціональніше використовувати живильні речовини середовищ, що надають можливість значно зменшити відходи виробництва у вигляді осадів твердого живильного середовища, що нерозчиняються і відповідно отримувати препарати з більшою питомою активністю та меншим вмістом домішок.

У процесі культивування застосовуєтьсяз складна трифазна система рідина – тверда суспензія – газ. У такій системі процеси масообміну ускладнені

і саме тому апаратурне оформлення всієї стадії вирощування теж ускладнюється. [8, с.25-26]

При застосуванні безперервних процесів ферментації створюються умови для ефективного регулювання і керування процесами біосинтезу. Але, культивування *Rhodotorula glutinis* здійснюється у періодичному процесі, тому що увесь об'єм поживного середовища засівається чистою культурою і вирощування ведеться в оптимальних умовах відповідний час щоб накопичити потрібну кількість цільового продукту [4].

У зв'язку з цим культура проходить чотири фази росту і розмноження, протягом яких змінюються швидкість розмноження клітин, їх розміри, морфологічні та фізіологічні властивості.

Тож приходимо до висновку що культивування *Rhodotorula glutinis* здійснюється глибинним способом у періодичному процесі.

Глибинне культивування мікроорганізмів здійснюють у ферментерах. Ферментери – це герметичні вертикальні циліндричні апарати із сферичним днищем і кришкою. Основна вимога до ферментера – проведення процесу в асептичних умовах, так як температура і pH середовища для вирощування дріжджів є сприятливою також для багатьох сторонніх мікроорганізмів. Для того щоб підтримувати стерильні умови при біосинтезі *Rhodotorula glutinis* ферментер повинен бути абсолютно герметичним, а усі лінії трубопроводів повинні бути доступні до обробки гарячою парою. Ферментер має бути обладнаний штуцерами для подачі середовища, стерильного повітря, стерильної води, посівного матеріалу, перемішування і підтримання необхідної нам температури культивування .

Важливо переконатися, що у ферментері дотримуються усі параметри зростання мікроорганізму, створюються сприятливі умови для біосинтезу цільового продукту та забезпечується асептичний режим культивування. Щоб

відповідати даним вимогам ферментер має витримувати високу температуру стерилізації і працювати під невеликим надмірним тиском протягом усього культивування.

Можемо зробити висновок, що культивування *Rhodotorula glutinis* має проводитись у механічному ферментері [5].

4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Для інтенсивного накопичення біомаси *Rhodotorula glutinis* потребує аеробних умов. Це означає, що потрібно забезпечити постійну аерацію середовища для вирощування першої генерації в колбах.

Оскільки продуцент, який ми використовуємо для виробництва каротиноїдів дріжджами *Rhodotorula glutinis* являються аеробним мікроорганізмом то у ферментері для забезпечення ефективних масообмінних процесів має бути аерація середовища і перемішування зі швидкістю 150 обертів за хвилину.

Оскільки витрати аераційного повітря великі, то підготовку його здійснюють в окремій будівлі – компресорній.

Підготовка аераційного повітря складається з наступних стадій:

- забір атмосферного повітря відбувається з використанням повітрозбірника на висоті приблизно 15–20 м від поверхні землі.
- очищення повітря від пилу та механічних часток, на пласких тканинних фільтрах грубої очистки δ>50мкм.
- за допомогою турбокомпресора повітря стискається до 0,35 МПа, при цьому нагріваючи його до температури 120-200°С. Відповідно із розрахунку тиску на подолання опору у системі підготовки повітря забезпечується тиск повітря.

- охолодження повітря за принципом «точки роси» та видалення вологи (проводять в водяних теплообмінниках типу «кожухотрубні» або «труба в трубі»)
- у ресивері проводять стабілізацію вологості повітря W = 60 -70%.

- нагрівання повітря здійснюють у теплообміннику до температури, вищої за температуру культивування на 5 – 10 °С, тобто до 57°С, вологість повітря становить W = 50 %.

- в подальшому очищення повітря проводять у фільтрі що має діаметр пор 1 мкм, у якості фільтрувального матеріалу використовуються синтетичні волокна. Ступінь очистки такого повітря дорівнює Е = 95 %. Заміна фільтрувального матеріалу проводиться 2 рази на рік, проте якщо відбудеться зволоження, передчасне забруднення чи інфікування фільтруючого матеріалу проводиться позачергова заміна.

- очищення повітря проводиться в індивідуальному фільтрі – це остання операція стадії що описується. Очищення повітря відбувається в індивідуальних фільтрах Ultra, що встановлені безпосередньо на самому ферментері, клас U16, ступінь чистоти 99,99%.

4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Зважаючи на характеристику кінцевої продукції виробництва та опираючись на обраний спосіб культивування, ми повинні спочатку обгрунтувати вибір стадій підготовки виробничих приміщень та їх періодичність. Оптимальна площа виробничого приміщення, у якому встановлено ферментер (10м^3), інокулятори (1м^3,), збірники, збірники, автоклав та інше обладнання становить 216 м^3 (8× 6 × 4,5). Висота стін – 4,5 м. Загальна площа стін становить (8×4,5) + (6×4,5)) × 2 = 126 м^2 . Площа підлоги – 48 м^2 . Необхідно визначити площі поверхонь, що миються та/або дезинфікуються (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Розрахунок загальної площі миття та/або дезинфекції оброблювального об'єкту за весь період виробництва каротиноїдів

Об'єкт миття та/або дезинфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, $м^3$ ($м^2$)	Кількість процесів миття та/або дезинфекцій за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезинфекції об'єкту за весь період виробництва, $м^2$ ($м^3$)
Обладнання, інвентар, комунікації	227 $м^3$	81	18 387 $м^3$
Підлога	48 $м^2$	300	14400 $м^2$
Стіни,двері, вікна	126 $м^2$	11	1 386 $м^2$

Для того, щоб визначитись з вибором дезинфікуючого та миючого засобу, необхідно врахувати витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення та безпосередню вартість цих засобів. На 1 $м^2$ витрачається приблизно 100 мл робочого розчину дезинфікуючого чи миючого засобу (відповідно до методичних рекомендацій щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 № 502).

Вартість концентратів дезинфікуючих та мийних засобів, а також їх витрати під час виробництва наведено у табл. 1.2.

Таблиця 1.2

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезинфікувальних засобів для виробництва каротиноїдів

Назва миючого/дезин-фікую-чого засобу	Об'єкт миття/або дезин-фекції	Концентрація робо-чого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття/або дезинфекції	Кількість робочого розчину за період вироб-ництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезинфі-кувального засобу, грн	Загальна вартість миття та/або дезинфекції за весь

			об’єкту за весь період виробництва, $м^3$ (л)			період виробництва, грн
Тринатрійфосфат(діюча речовина – фосфат натрію)	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	18 387	9 194	12	110 328
Кальцинована сода(діюча речовина – натрій)	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	18 387	9 194	9	82 746
Біомой(діюча речовина – азітроміцин)	Обладнання, інвентар, комунікації, тара	0,3	18 387	5 516	34	187 544
Дезактін (діюча речовина – дихлорантин)	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2	15 786	3 157	150	473 550
Хлорантоїн(діюча речовина - дихлорантин)	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2	15 786	3 157	109	344 113

Тринатрійфосфат - використовують у енергетиці; харчовій промисловості; целюлозно-паперовій промисловості; під час виробництва синтетичних миючих та чистячих засобів; у бурових розчинах у складі комплексної полімерної добавки до низькосортним глин та порошків; як ПАР під час виробництва цементів та при бурінні свердловин; а також для технічних цілей (знежирення поверхонь, промивання технологічного обладнання тощо). [21].

Кальцинована сода – представлена у вигляді гранул або порошку білого кольору. Добре розчиннна у воді. Хімічна формула: Na_2CO_3. Має широкий спектр застосування, в тому числі при виготовленні мила та миючих засобів. З неї виробляється каустична сода. Є дуже важливим компонентом для знежирення металів. Використовується у процесі виробництва алюмінію (обробка бокситів), при обробці шкіри, целюлози і т. д.

Біомой **–** це засіб, що застосовується для очищення виробів медичного призначення із скла, гуми, металу, та полімерних матеріалів (у тому числі жорстких та гнучких ендоскопів, медичних інструментів до гнучких ендоскопів, хірургічних та стоматологічних інструментів). Також його використовують для миття поверхонь приміщень, предметів догляду за хворими, предметів інтер`єру, підлоги тощо. Він підходить для миття об’єктів комунально-побутового призначення, навчально-виховних закладів, підприємств мікробіологічної, парфумерно-косметичної, переробної, харчової і фармацевтичної промисловості, закладів торгівлі та ресторанного господарства, перукарень, аптек, місць тимчасового проживання, транспорту.

Дезактін призначається для поточної та заключної дезінфекції у закладах охорони здоров'я, особливо у місцях де є вогнища кишкових та крапельних інфекцій бактеріального та/або вірусного походження, дерматомікозів, туберкульозу, для профілактичної дезінфекції у закладах охорони здоров'я, у дитячих закладах, на різних комунальних об'єктах, на підприємствах громадської торгівлі, у транспорті, а також дезінфекції і передстерилізаційного очищення виробів медичного призначення із скла, гуми, корозійностійкого металу та полімерних матеріалів [13,14,21].

Хлорантоїн - є дезінфекційним засобом із миючим ефектом. Він стабільно зберігається протягом 3-х років. Добре розчинний у воді – не менше 20 г/дм^3. Водні розчини **Хлорантоіну** безбарвні, прозорі, зі слабким запахом хлору. Є допустимою помірна опалесценція описаних розчинів.

Розчини мають миючі, дезінфікуючі та передстерилізаційні властивості, не наносять шкоди об'єктам, які виготовлені зі скла, гуми, металу, полімерних матеріалів, кахлю, порцеляни, дерева, поверхням медичних приладів і устаткування із гальванічними, лакофарбовими та полімерними покриттями, вони здатні добре емульгувати жири, видаляти білково-жирову плівку з поверхонь, легко змиваютьсята не залишають нальоту. Здатні також гомогенізувати мокротиння та інші виділення [13,14,21].

Якщо проаналізувати, наведені дані у табл. 1.2, то можна прийти до висновків:

- для миття інвентарю, обладнання, тари, комунікацій буде доцільно використовувати засіб Біомой;
- для миття та дезинфекції підлоги, вікон, стін, та дверей – Дезактін та Хлорантоїн, так як це засоби що одночасно використовуються як миючі та дезінфікуючі, що допомагає заощадити кошти.

Для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів засоби варто застосовувати з інтервалом в 3 місяці.

Стіни, вікна і двері необхідно мити 1 раз на місяць, 11 разів на рік, підлогу мити та дезинфікувати кожного дня (300 разів на рік).

Миття ферментера, та інокуляторів та збірників для приготування композицій здійснюється циркуляційним способом. Об’єм миючого засобу становитиме майже половину кожного з відповідних об’ємів обладнання. Загалом для одного циклу буде витрачено орієнтовно 2000 л робочого р-ну мийного засобу.

Періодичність включення бактерицидних ламп, що мають знаходитись на стелі у приміщенні – 1 година після кожного генерального прибирання та 30 хвилин під час обідньої перерви кожного робочого дня.

4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробництва каротиноїдів був обраний штам Rhodotorula glutinis з високою їх продукцією. З дикого штаму був виділенний мутантний штам R. glutinis 32.

Культивування посівного матеріалу тривало у присутності кисню (аеробних умовах).

Середовище для виробничого біосинтезу

Його склад був таким (г/л): Глюкоза (25,0), Дріжджовий екстракт (10,0) K_2HPO_4 (2,0), KH_2PO_4 (2,0), pH 6,0.

Культивування дріжджів для виробництва каротиноїдів

Приготування посівного матеріалу – дріжджовий посів готували з використанням рідкого базального середовища.

Для інокуляції 5 мл стерильного середовища в 50 мл пробірку Falcon використовували повну петлю активної (24 години) культури дріжджів. Інокульовані пробірки інкубували при 25°С протягом 18 годин на орбітальному шейкері (200 об/хв). Потім отриману культуру використовували як інокулят.

Культивування

Об'єм 1 качалочної колби Vнколб = 0,750 л. Коефіцієнт заповнення 0,2. Загальна кількість колб для того, щоб отримати необхідну кількість посівного матеріалу складатиме:

Nколб = Vпм/Vколб·$К_{зап}$ = 640/750 · 0,2 = 4,3. Отже для отримання необхідної кількості посівного матеріалу необхідно використати 5 качалочних колб.

Щоб отримати необхідну кількість посівного матеріалу потрібно у *9* качалочних колбах об'ємом 750 мл приготувати 0,64 л поживного середовища (ПС). Стерилізуємо в автоклаві.

Середовище для виробничого біосинтезу

Його склад був таким (г/л): Глюкоза (25,0), Дріжджовий екстракт (10,0) K_2HPO_4 (2,0), KH_2PO_4 (2,0), pH 6,0.

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці

Композиція А: Глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112°С, 30 хв).

Композиція Б: дигідрофосфат калію (KH_2PO_4), гідроортофосфат калію K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131°С, 50 хв).

Приготування і стерилізація композиції А

Композицію А готуємо в окремій колбі, а стерилізувати будемо в автоклаві. Композицію премішуємо. Колбу закриваємо ватно-марлевою пробкою і стерилізуємо в автоклаві при температурі 112 °С протягом30 хв.

Приготування та стерилізація композиції Б

Композицію Б готуватимемо в окремій колбі, а стерилізуватимемо в автоклаві. Наважку поміщаємо у колбу, перемішуємо і додаємо дистильовану воду. Колбу закриваємо ватно-марлевою пробкою і стерилізуємо в автоклаві при температурі 131 °С протягом 50 хв.

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

Для того, щоб одержати посівний матеріал необхідно 6,4 л середовища.

Композиція А: Глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112°С, 30 хв).

Композиція Б: дигідрофосфат калію (KH_2PO_4), гідроортофосфат калію K_2HPO_4 (2,0) (режим стерилізації: 131°С, 50 хв).

Приготування і стерилізація композиції А

Композицію А готуватимемо і стерилізуватимемо в окремому реакторі-збірнику за температури 112 °С протягом 30 хв.

Приготування та стерилізація композиції Б

Готувати композицію Б будемо в окремому збірнику, а стерилізувати будемо в інокуляторі при температурі 131 °С упродовж 50 хв.

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

Для того, щоб одержати посівний матеріал необхідно 64 л ПС.

Композиція А: Глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112°С, 30 хв).

Композиція Б: дигідрофосфат калію (KH_2PO_4), гідроортофосфат калію K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131°С, 50 хв).

Приготування і стерилізація композиції А

Композицію А готуватимемо і стерилізуватимемо в окремому реакторі-збірнику на 60 л при температурі 112 °С протягом 30 хв.

Приготування та стерилізація композиції Б

Готувати композицію Б будемо в окремому збірнику на 15 л, а стерилізувати будемо в інокуляторі при температурі 131 °С упродовж 50 хв.

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м^3

Для того, щоб одержти посівний матеріал необхідно 640 л середовища

Композиція А: Глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112°С, 30 хв).

Композиція Б: дигідрофосфат калію (KH_2PO_4), гідроортофосфат калію K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131°С, 50 хв).

Приготування і стерилізація композиції А

Композицію А готуватимемо і стерилізуватимемо в окремому реакторі-збірнику на 600 л при температурі 112 °С протягом 30 хв.

Приготування та стерилізація композиції Б

Готувати композицію Б будемо в окремому збірнику на 20 л, а стерилізувати будемо в інокуляторі при температурі 131 °С упродовж 50 хв.

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м^3

Для того, щоб одержати посівний матеріал на цій стадії потрібно 6,4 м^3 робочого об'єму ферментера. Оскільки об'єм середовища дуже великий, пропонується використовувати установку безперервної стерилізації на 10 м^3

Композиція А: Глюкоза, дріжджовий екстракт, дигідрофосфат калію (KH_2PO_4), гідроортофосфат калію (K_2HPO_4) (режим стерилізації: 131°С, 5 хв).

РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання

Позиція	Назва	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою від великих забруднювальних частинок типу пилу, сміття і т.д.
Ф-2	Фільтр грубого очищення	1	Панельний фільтр класу очистки G4. Складається з сталевої оцинкованої рамки, всередині якої укладено об'ємний шар відкритопористого пінополіуретану. Розмір (д×ш×в, мм): 592×592×292. Україна, «Вент-фільтр»[1]
К-3	Компресор	1	Компрессор винтовой Renner RS 30. Продуктивність 4,38 м^3/хв. Робочий тиск 7,5 бар. Потужність 30 кВт. . Розмір (д×ш×в, мм): 1280×1300×800. Германія, «Renner»[2]
Т-4 Т-6	Теплообмінник-охолоджувач Теплообмінник-нагрівач	2	Водяний калорифер для охолодження та нагрівання повітря. Матеріал труб нержавіюча сталь. Теплоносій – вода. Робоча температура до 400 ºС. Продуктивність до 1000 м^3/год. Робочий тиск до 10 бар. Україна, «ОПЕКС»[3]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер повітряний на 5 м^3. Матеріал – вуглецева сталь. Розмір (d×в, мм): 1400×3940. Робочий тиск до 10 атм. Товщина стінки 8 мм. Україна, «Монтажник-К»[4]
Ф-7	Фільтр тонкого очищення	1	Фільтр стисненого повітря тонкого очищення AF. Робочий тиск до 16 бар. Робоча температура від -1,5 до +65 ºС. До комплектації входить конденсатоуловлювач. Германія, «Contracor»[5]
З-8	Збірник на 10 л	1	Реактор SS-10L. Оснащений подвійною сорочкою та мішалкою якірного типу. Матеріал – нержавіюча сталь SS316. Швидкість обертів перемішуючого пристрою 0-600 об/хв. Робочий тиск 0,1-0,49 МПа. Розмір (д×ш×в, мм): 700×600×2030. Китай, «YUHUA»[6]

Ф-9	Індивідуальний фільтр	1	HEPA фільтр класу очистки H14. Робоча температура до 280 ºС. Розмір (д×ш×в, мм): 305×305×78. Продуктивність – 200 м^3/год. Матеріал: мікротонкк скловолокно. Україна, «Вент-фільтр»[7]
ПА-10	Посівний апарат на 10 л	1	Посівний апарат RCP-M10L. Оснащений подвійною рубашкою, мішалкою, датчиками контролю повітря, датчиком контролю pH та температури. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 304. Розмір (д×ш×в, мм): 750×1000×1900. Германія, «Sartorius»[8]
З-11	Збірник на 60 л	1	Реактор УПКП-60. Оснащений подвійною сорочкою та мішалкою якірного типу. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 316. Робочий тиск від -0,6 до +0,4 бар. Швидкість обертів мішалки – 30-30 об/хв. Розмір (д×ш×в, мм): 1655×892×1885. Україна, «Промвіт»[9]
З-12	Збірник на 15 л	1	Реактор РС-15. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 316. Робочий тиск від -0,7 до +3 бар. Оснащений подвійною сорочкою та мішалкою якірного типу. Україна, «КАБЕЛЬФАРМТЕХНИКА»[10]
Ф-13	Індивідуальний фільтр	1	HEPA фільтр класу очистки H14. Робоча температура до 280 ºС. Розмір (д×ш×в, мм): 305×610×78. Продуктивність – 450 м^3/год. Матеріал: мікротонкк скловолокно. Україна, «Вент-фільтр»[7]
І-14	Інокулятор на 100 л	1	Інокулятор F3-100. Оснащений подвійною рубашкою, мішалкою, датчиками контролю повітря, датчиком контролю pH та температури. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 316. Швидкість мішалки – 100-800 об/хв. Розмір (д×ш×в, мм): 810×1500×2197. Іспанія, «Bionet Engineering» [11]
Д-15	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор ВД-1н. Продуктивність від 1 до 30 кг. Має високу точність 0,2% або ± 20 г. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 304. Україна, «DOZATOR»[12]
З-16	Збірник на 600 л	1	Збірник РСП-600. Оснащений подвійною сорочкою та мішалкою якірного типу. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 316. Швидкість мішалки –

			93 об/хв. Розмір (д×ш×в, мм): 1280×1280×1280. Україна, «Промвіт»[13]
З-17	Збірник на 20 л	1	Збірник SSR-20L. Оснащений подвійною сорочкою та мішалкою якірного типу. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 316. Швидкість мішалки – 30-140 об/хв. Розмір (д×ш×в, мм): 450×450×1150. Китай, «Shanghai Linbel Instrument Co., Ltd»[14]
Ф-18	Індивідуальний фільтр	1	HEPA фільтр класу очистки H14. Робоча температура до 280 ºС. Розмір (д×ш×в, мм): 305×305×105. Продуктивність – 600 м^3/год. Матеріал: мікротонкк скловолокно. Україна, «Вент-фільтр»[7]
І-19	Інокулятор на 1 м^3	1	Інокулятор на 1000 л. Оснащений подвійною рубашкою, мішалкою, датчиками контролю повітря, датчиком контролю pH та температури. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 316. Швидкість мішалки – 50-400 об/хв. Максимальна робоча температура 200 ºС. Розмір (d×в, мм): 890×1600. Індія, «Maruti Engineering Works»[15]
Д-20 Д-27	Ваговий дозатор	2	Ваговий дозатор Piovan MDW400. Продуктивність до 400 кг/год. Призначений для дозації 3-х і більше компонентів. Італія, «Piovan SpA»[16]
УБС-21	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації LXM-10. Робочий тиск 0,5 МПа. Максимальна температура стерилізації 135 ºС. Розмір (д×ш×в, мм): 2500×2000×2500. Китай, «Jiangsu SAIDELI Pharmaceutical Machine Co., Ltd»[17]
Ф-22	Індивідуальний фільтр	1	HEPA фільтр класу очистки H14. Робоча температура до 280 ºС. Розмір (д×ш×в, мм): 610×610×300. Продуктивність – 3300 м^3/год. Матеріал: мікротонкк скловолокно. Україна, «Вент-фільтр»[7]
ФР-23	Ферментер	1	Ферментер на 10 м^3. Оснащений подвійною рубашкою, мішалкою, датчиками контролю повітря, датчиком контролю pH та температури. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 316. Швидкість мішалки – 70-1200 об/хв.

			Розмір (d×в, мм): 1800×5250. Китай, «Bailun»[18]
Н-24 Н-26	Відцентровий насос	2	Насос відцентровий М-400В. Матеріал – нержавіюча сталь та чугун. Робоча температура від -15 до +50 ºС. Продуктивність 10 м^3/год. Італія, «Saer»[19]
З-25	Збірник на 1000 л	1	Збірник SSR-20L. Оснащений подвійною сорочкою та мішалкою якірного типу. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 316. Швидкість мішалки – 30-140 об/хв. Україна, «STS Group»[20]

Примітка:

1 - https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-gruboy-ochistki-vozduha-panelniy/,

2 - https://compressors.in.ua/p1694003621-kompressor-vintovoj-renner.html,

3 - https://opeks.ua/ru/zhidkostnye-kalorifery-nagrevateli-i-oxladiteli-/?utm_source=google&utm_medium=ru&device=c&utm_campaign=performance&gclid=Cj0KCQiAofieBhDXARIsAHTTldpMJLWRQkj7ZjlxEeLaxgjshXMBThTFdNpUOcrtI0SaqLErPrLFqYkaAiAqEALw_wcB,

4 - https://montajnik.com.ua/resiver-50-m3-davlenie-10-atm-iz-uglerodistoy-stali ,

5 - https://kms-market.com.ua/p726193538-filtry-szhatogo-vozduha.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_term=&utm_content=g&google_ad=593783333947&utm_campaign=%D0%A2%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F%20%D0%9F%D0%BE%D0%B4%D0%B3%D0%BE%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%BA%D0%B0%20%D0%B2%D0%BE%D0%B7%D0%B4%D1%83%D1%85%D0%B0&gclid=Cj0KCQiAofieBhDXARIsAHTTldq5yhGk0e9SHFIA6ftrsVtynth2cTaLiSV5pSlYUQ4JqRYGNd-Pau4aAs5aEALw_wcB,

6 - https://www.alibaba.com/product-detail/Manufacture-Price-5-10-20-L_1600653062215.html?spm=a2700.7724857.0.0.3b882101ZGdNX7&s=p,

7 - https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-tonkoy-ochistki-vozduha-hepa-promyshlenniy/,

8 - https://www.sartorius.com/download/9612/broch-biostat-cplus-sbi1505-e-data.pdf,

9 - https://promvit.com.ua/ustanovka-upkp-60-reaktor-plavitel-gomogenizator-ruchnoe-upravlenie-klapanami/,

10 - http://www.kft2.com.ua/reaktor15.html,

11 - https://optimus.be/uploads/sync/brochure/F3-ENG.pdf,

12 - https://prom.ua/ua/p1187721211-vesovoj-dozator-dlya.html?&primelead=My42,

13 - https://promvit.com.ua/reaktor-rsp-600-rabochim-obemom-600-litrov-s-mexanizmami-vrashheniya-s-odnovremennym-podema-meshalki/,

14 - https://linbel.en.made-in-china.com/product/jnqrEXRLIQct/China-20L-Stainless-Steel-Reactor-Agitated-Reactor-Industrial-Batch.html,

15 - https://www.indiamart.com/proddetail/1000-l-jecketed-fermenter-bioreactor-15553699248.html,

16 - https://prom.ua/ua/p9772758-gravimetricheskie-vesovye-dozatory.html?&primelead=MS41NQ,

17 - http://sdlcentrifuge.com/9-continuous-sterilization-system/192767/ ,

18 - https://www.alibaba.com/product-detail/Jacket-fermenter-10000-liter-fermenter-cell_60822688721.html,

19 - https://sdlmarket.com.ua/ua/p1448459971-nasos-tsentrobezhnyj-400b.html

РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу цільового продукту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка миючих та дезинфікуючих засобів

До реакторів використовуючи об'ємно-ваговий дозатор, що встановлений на трубопроводі, надходить необхідна кількість розчину дезактину та премішується із водою, дозування якої здійснюється через датчик об’єму. Через 10 хв після перемішування маємо розчини для дезинфекції та миття обладнання та комунікацій.

ДР 1.1.1 Приготування розчину Дезактину

Дезактин це препарат який використовується з метою дезінфекції та ополіскування. Для приготування розчину Дезактину потрібно розчинити концентрований препарат водою до концентрації що потрібна. Для щоденного прибирання потрібно приготувати 0,2 %-й розчин. Для цього беруть 140 г Дезактину, 70 л води, перемішують їх у збірнику об’ємом 100 л. Для генерального прибирання потрібно приготувати 1 %-й розчин. Для цього беруть 700 г Дезактину, 350 л води, перемішують їх в збірнику об’ємом 500 л. Зберігати готовий розчин можна не більше 7 діб.

ДР1.1.2 Приготування розчину каустичної соди

Каустична сода використовується з метою ручного миття приміщень, технологічного обладнання, інвентарю слід приготувати 2 % розчин та нагріти його до температури 40°-50°С, а для циркуляційного промивання комунікацій та обладнання слід приготувати 3 % розчин та нагріти його до температури 50°-60°С. Готувати необхідно у полімерних або нержавіючих ємкостях (не допускається використання ємкостей з алюмінію, бо каустична сода викликає корозію даного металу).

Готуємо у збірнику об’ємом 60 л , використовуємо 60 г діючої речовини на 40 л води.

ДР1.1.3 Приготування мильного розчину.

Мильний розчин готується для перевірки герметичності обладнання. Концетрат мильного розчину розводиться з водопровідною водою. Необхідна концентрація розчину 10%.

Робочий розчин «Біомою» готують у тарі будь–якого матеріалу шляхом розчинення у питній воді. Для обробки приміщень виготовляємо 0,3% розчин. (Таб. 1) [49]

Таблиця 1. Розрахунки для приготування робочих розчинів Біомою

Концентрація, % (за препаратом)	**1 дм3 розчину (1 л)**		**10 дм3 розчину (10 л)**	
	Кількість Біомою, г	Об’єм води, см3	Кількість Біомою, г	Об’єм води, см3
0,15	1,5	998,5	15,0	9985,0
0,3	3,0	997,0	30,0	9970,0
0,5	5,0	995,0	50,0	9950,0

ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень

У виробничих приміщеннях має бути забезпечений технологічний зв’язок і розташовуватися за ходом технологічного процесу. При цьому не можна допускати перехрещення чистого і використаного посуду, потоків сировини і готових виробів, а також мають бути створені відповідні умови щоб дотримувались виробнича та особиста гігієна задіяного у виробництві персоналу.

Для забезпечення чистоти у виробничих приміщеннях встановлюються педальні або металеві бачки з кришками, а також корзини для збору санітарного браку та сміття з полімерних матеріалів. Бачки та корзини мають очищатися, промиватися та дезінфікуватися спеціальними засобами кожного дня.

Не дозволяється зберігати у виробничих приміщеннях миючі, дезінфікуючі засоби, відходи, інвентар який не має безпосереднього

відношення до виробничого процесу. Зберігання інвентарю для протирання поверхонь, миючих та дезінфікуючих засобів здійснюється в окремих приміщеннях. Інвентар (відра, щітки тощо) повинен бути з маркуванням і закріплений за виробничими, допоміжними і підсобними цехами.

ДР 1.2.1 Щоденне прибирання.

Щоденне вологе прибирання приміщень проводиться після кожної зміни: із приміщень видаляють готову продукцію, напівпродукти, відходи виробництва, невикористані матеріали. Вологе прибирання приміщень, в тому числі миття підлоги, проводять миючим засобом. Особливо дуже ретельно протирають дезрозчином нижні частини та ручки дверей. Обробка проводиться в гумових рукавичках, чоботах, фартусі. Зовнішні двері промивають по міріза необхідністю, але не рідше ніж 1 раз на тиждень. Вологе прибирання приміщень проводиться за 1,5 – 2 години до початку робочого процесу.

Коли вологе прибирання закінчують вмикають настінні або настельні бактерицидні лампи для знезараження повітря які всьановлюються з розрахунку 2,5 Вт на 1м^3 приміщення (за відсутності людей) та за 30 хвилин до початку роботи їх виключають. Кількість ламп розраховується, виходячи із загальної площі і об'єму приміщення. Про заміну і режим роботи ламп ведеться запис в журналі.Коли прибирання закінчують необхідно проконтролювати КУО, воно (має бути < 400 на см^2) .

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання.

Генеральне прибирання приміщень проводиться1 раз на місяць (у день профілактики обладнання) або на вимогу бактеріолога якщо він виявив мікробну контамінацію. Для обробки використовується розчин 0,2% Дезактину (*Від ДР 1.2.3*). Перед обробкою все обладнання та електроприлади знеструмлюють. Методом зрошення із гідропульта оброблюють стіни, стелю, вікна, двері, перегородки та обладнання. Коли зрошення закінчують

приміщення необхідно закрити на 30-40 хвилин, після чого видалити залишки дезрозчину протерши усе чистою безворсовою серветкою. Після генерального прибирання необхідно увімкнути бактерицидні лампи для знезараження повітря. Також окремо має проводитись прибирання і наведення порядку в шафах, стелажах.

Коли прибирання закінчують контролюють кількість КУО (має бути < 290 на см$^{2)}$.

Матеріали: вода, р-н Дезактину приготований заздалегідь.

ДР 1.3 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1 Миття обладнання

Змішувачі для приготування середовища для культивування, виробничий ферментер та інокулятори з посівним апаратом миються водою, а потім розчином з масовою долею каустичної соди 2 % (*Від ДР 1.2.1*), t = 70–80 °С, щоб запобігти виникненню резистентності мікроорганізмів, коли закінчують кожен технологічний цикл. Після цього використовується 0,3% р-н біомою.

Якщо очікується, що обладнання протягом тривалого часу не використовуватимуть, враховуючи періодичність виробництва, після виведення продукту і знезараження всіх його залишків обладнання всього технологічного ланцюжка підлягає ретельному промиванню.

ДР 1.3.2 Технічний огляд

Здійснюється візуальний контроль та перевірка цілісності усіх з'єднань трубопроводів, колекторів з апаратом. Міцність усіх з'єднань, за необхідності різьбові з'єднання трубопроводів та апаратів підтягуються.

ДР 1.3.3 Ополіскування обладнання. Ввідбувається з використанням технічної води за температури 20°С до повного вимивання усіх миючих засобів з поверхонь.

ДР1.3.4 Перевірка на герметичність

Подається стиснене очищене повітря, за рахунок чого створюється надлишковий тиск. Значення тиску контролюється по відповідному датчику, і якщо тиск сильно знижується це може означати, що обладнання має якісь дефекти. Апарат з трубопроводами перед завантаженням середовища під дією повітряного тиску 0,05–0,07 МПа перевіряється на герметичність. За допомогою мильного розчину (від ДР 1.2.3) знаходяться нещільності у фланцевих з'єднаннях та зварювальних швах. Знайдені пропуски усуваються і проводиться повторна перевірка.

ДР 1.3.5 Стерилізація обладнання

Стерилізація ферментера, інокуляторів та посівного апарату проводиться за температури 131°С і тиску 0,15 – 0,18 МПа, 60 хвилин. на лінії зливу з ферментеру, інокулятора та посівного апарату (у "слабкій точці") проводиться контроль температури. Конденсат, що утворився після стерилізації мають знешкодити.

ДР 2 Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1 Забір аераційного повітря

Атмосферне повітря забирається через забірну шахту.

Повітря, яке використовують для аерації контролюють на відсутність механічних домішок, воно має бути стерильним та має бути певної температури 45-60 ^{o}С.

Основні операції по очищенню і стерилізації:

- очищення повітря від пилу та механічних домішок та його стиснення;

- очищення стисненого повітря від мікрофлори в головних фільтрах;
- очищення стисненого повітря від мікрофлори в індивідуальних фільтрах.

ДР 2.2 Очищення повітря від пилу і механічних домішок

Очищення атмосферного повітря (від ДР 2.1) проводять використовуючи фільтр грубого очищення (Ф-2) що має діаметр пор 50 мкм.

Ефективність очищення має бути Е=80% (до ДР 2.3).

ДР 2.3 Стиснення повітря

Стиснення попередньо очищеного повітря здійснюється з використанням компресорів (К-3). Це забезпечує нагрівання повітря до температури 120-250 ºС і стиснення його до 0,35 МПа.

ДР 2.4 Охолодження повітря та видалення вологи

Після компресора (К-3), (від ДР 2.3) стиснене повітря з метою охолодження подається на теплообмінний апарат (Т-4), після цього охолоджене повітря для видалення з нього зайвої вологи подається на ресивер (Р-5). В результаті цього температура повітря у теплообміннику після охолодження дорівнює 20-30 ºС, а вологість повітря ресивера складає W=60-70% на виході з апарата. Охолоджене повітря надалі подається на стадію підігріву (до ДР 2.5).

ДР 2.5 Нагрівання повітря

Далі проводится стадія нагрівання повітря (від ДР 2.4) у теплообміннику (Т-6) до температури 50 ºС та відносної вологості W=50% і подається для процесу очистки (до ДР 2.6).

ДР 2.6 Очищення повітря в головному фільтрі

Очищення підігрітого повітря (від ДР 2.5) проводять на поліетиленовому фільтрі (Ф-7) що має діаметр пор 1 мкм. Ефективність очищення дорівнює Е=95%. Далі очищене повітря подають до ДР 2.7.

ДР 2.7 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Після очистки на головному фільтрі (Ф-7) (від ДР 2.6) повітря надходить до індивідуального фільтра по трубопроводу, (Ф-34, Ф-36,Ф-38 – для кожного ферментера індивідуальний фільтр) який розташований біля самого ферментера. Індивідуальний фільтр має бути оснащений манометрами – вони дозволяють зафіксувати перепад тиску або його відсутність (якщо фільтр пошкоджено). Матеріал індивідуального фільтру – це гідрофобна фторопластова мембрана що має діаметр пор – 0,2 мкм, що забезпечує максимальну якість очистки повітря Е=99,999%. Очищене повітря подається в інокулятори та виробничий ферментер через барботер. До ТП 4.5, ТП 4.7, ТП 5.1.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1 Приготування та стерилізація поживних середовищ для інокуляту в колбах на качалці

Для вирощування інокуляту потрібно приготувати 640 мл поживного середовища. Враховуючи, що 10 % від об'єму поживного середовища – це посівний матеріал (64 мл), то загальний об'єм поживного середовища становитиме 576 мл.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 576 мл середовища, г	Композиції	Об’єм композиції V, л
Глюкоза	25	14,4	А	0,376
Дріжджовий екстракт	10	5,76		
Вода		≈355 мл		
K_2HPO_4	2	1,16	Б	0,2
KH_2PO_4	2	1,16		
Вода		≈198 мл		

ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважуємо приготовлені заздалегідь 5,76 г дріжджового екстракту та 14,4 г глюкози. Далі наважки поміщуємо в колби об’ємом 1 л, додаємо 355 мл водопровідної води, перемішуємо. Закриваємо колби ватно-марлевою пробкою і стерилізуємо в автоклаві при температурі 112 °С впродовж 30 хв.

ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважуємо 1,16 г K_2HPO_4 та 1,16 г KH_2PO_4. Наважку поміщуємо в колбу об’ємом 500 мл, додаємо 198 мл водопровідної води, перемішуємо. Закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізуємо в автоклаві при температурі 131 °С впродовж 50 хв.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об’ємом 10 л

Для одержання рідкого посівного матеріалу у посівному апараті, об’єм якого складає 10 л, слід приготувати 6,4 л поживного середовища. Потрібно звернути увагу, що 10% (0,64 л) припадає на посівний матеріал, а також 10% складе конденсат, який утвориться при стерилізації поживного середовища в збірнику. Тому потрібний об’єм середовища складає 5,8 л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об’ємом 10 л наведений у табл. 3.2.

Таблиця 3.2

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

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,8 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	25	144	А	4,8
Дріжджовий екстракт	10	58		
Вода		≈4,1 л		
Конденсат		0,48 л		
K_2HPO_4	2	11,6	Б	1
KH_2PO_4	2	11,6		
Вода		≈977 мл		

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважуємо приготовлені заздалегідь 58 г дріжджового екстракту, 144 г глюкози, наважки переносять у реактор-збірник на 10 л (З-8) та додають за допомогою лічильника 4,1 л води водопровідної. Вмикається перемішуючий пристрій до повного розчинення компонентів. Кришка збірника закривається та починається процес стерилізації при 112 ºС протягом 30 хв.

ДР 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважуємо приготовлені заздалегідь 11,6 г K_2HPO_4 та 11,6 г KH_2PO_4, наважки переносять у збірник додають 2 л води, розчиняють та переносять самоплином у інокулятор. Вмикають перемішуючий пристрій і стерилізують безпосередньо в інокуляторі при температурі 131 ºС протягом 50 хв.

ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 100 л

На даному етапі необхідно отримати 64 л поживного середовища. Потрібно звернути увагу, що 10% (6,4 л) припадає на посівний матеріал, а також 10% складе конденсат, який утвориться при стерилізації поживного середовища в збірниках. Тому необхідний об'єм середовища складає 58 л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об’ємом 100 л наведений у табл. 3.3.

Таблиця 3.3

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

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 64 л середовища, г**	**Композиції**	**Об’єм композиції V, л**
Глюкоза	25	1440	А	48
Дріжджовий екстракт	10	580		
Вода		≈41,2		
Конденсат		4,8 л		
K_2HPO_4	2	116	Б	10
KH_2PO_4	2	116		
Вода		≈8,8 л		
Конденсат		1 л		

ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважуємо приготовлені заздалегідь 580 г дріжджового екстракту, 1440 г глюкози, наважки переносять у реактор-збірник об’ємом 60 л (З-11) та додають 38 л води водопровідної за допомогою лічильника. Вмикається мішалка та перемішує композицію до повного розчинення. Після чого, кришка збірнику закривається та встановлюється режим стерилізації при 112 ºС протягом 30 хв.

ДР 3.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважуємо приготовлені заздалегідь 116 г K_2HPO_4 та 116 г KH_2PO_4, наважки переносять у збірник на 15 л (З-12), за допомогою лічильника додають 8,8 л води водопровідної, вмикають мішалку для розчинення композиції. Після чого, встановлюється режим стерилізації при температурі 131 ºС протягом 50 хв.

ДР 3.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об’ємом 1 м^3

На даному етапі необхідно отримати 640 л поживного середовища. Слід пам’ятати, що 10% (64 л) припадає на посівний матеріал, а також 10% складе конденсат, який утвориться при стерилізації поживного середовища в збірниках. Тому необхідний об’єм середовища складає 576 л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об’ємом 1 $м^3$ наведений у табл. 3.4.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1 м^3

Таблиця 3.4

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 576 л середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	25	14,4	А	560
Дріжджовий екстракт	10	5,76		
Вода		≈483,8 л		
Конденсат		56 л		
K_2HPO_4	2	1,15	Б	16
KH_2PO_4	2	1,15		
Вода		12,1 л		
Конденсат		1,6 л		

ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі (Д-15) зважуємо приготовлені заздалегідь 5,76 кг дріжджового екстракту, 14,4 кг глюкози, наважки переносять у реактор-збірник об'ємом 600 л (З-16) та додають 483,8 л води водопровідної за допомогою лічильника. і стерилізують у збірнику при 112 ºС протягом 30 хв.

ДР 3.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважуємо приготовлені заздалегідь 1,16 кг K_2HPO_4 та 1,16 кг KH_2PO_4, наважки переносять у збірник на 20 л (З-17), за допомогою лічильника додають 12,1 л води водопровідної, вмикають мішалку та розчиняють композицію. Після чого, встановлюється режим стерилізації при температурі 131 ºС протягом 50 хв.

3.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 10 м^3

На даному етапі необхідно отримати 6,4 м^3 поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу (0,64 м^3) об'єм поживного середовища складає 5,76 м^3.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м^3 наведений у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для приготування середовища у ферментері об'ємом 10 м^3

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 5,76 м^3 середовища, кг**	**Композиції**	**Об'єм композиції V, м^3**
Глюкоза	25	144	A	5,76
Дріжджовий екстракт	10	57,6		
K_2HPO_4	2	11,6		
KH_2PO_4	2	11,6		
Вода		4959,4 л		
Конденсат		576 л		

ДР 3.5.1 Приготування композиції А

На ваговому дозаторі (Д-20) зважуємо приготовлені заздалегідь 57,6 кг дріжджового екстракту, 144 кг глюкози, 11,6 кг K_2HPO_4 та 11,6 кг KH_2PO_4. Зважені компоненти пересипаються до збірнику, який входить в конструкцію УБС-10 (УБС-21) за допомогою лічильника додають 4959,4 л води водопровідної. Вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів.

ДР 3.5.2 Стерилізація композиції А

Одержаний розчин компонентів (*від ДР 3.5.1*) відцентровим насосом, який входить до системи УБС-10 (УБС-21) подають в саму установку безперервної стерилізації (УБС-21) в якій проводиться стерилізація поживного середовища гострою парою впродовж 5 хв при 131 °С.

ТП 4.1 Підтримання колекційної культури

Колекційна культура *Rhodotorula glutinis* зберігається у пробірках із сусло-агаром (СА) при температурі 2-4°С. Пересіви здійснюють кожні 2-3

місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 4.2 Одержання робочої культури

Колекційну культуру, що зберігається у пробірках з сусло-агаром, пересівається до ізольованих колоній на чашки Петрі із сусло-агаром стерильною петлею і вирощується при температурі 37°С протягом 72 годин.

ТП 4.3 Вирощування інокуляту на агаризованих середовищах

Ізольовані колонії від *ТП 4.2* пересівають в асептичних умовах стерильною петлею до пробірок наповнених сусло-агаром (СА) до ізольованих колоній, які розташовуються на відстані не менше 1 см одна від одної. Пробірки інкубують протягом 24 год при температурі 37°С.

ТП 4.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалках

У колбу із 376 мл розчину композиції А (від *ДР 3.1.1*) в асептичних умовах вносять 200 мл композиції Б (від *ДР 3.1.2*). Це потрібно для вирощування рідкого посівного матеріалу. Вміст колби перемішують і розливають у 5 стерильних качалочних колб по 115 мл у кожну. Об’єм колб має становити 750 мл.

Далі вносять 5 мл фізіологічного розчину у пробірку з робочою культурою *Rhodotorula glutinis* ATCC 236, суспендують клітини (змивають культуру), відбирають одержану дріжджову суспензію стерильною піпеткою і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Дріжджову суспензію для такої кількості колб отримують з 20 пробірок. Умови для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках: температура 37 °С впродовж 24 години, частота обертання 150 об/хв. Наступний етап – культуральну рідину переливають у засівну колбу. Об’єм засівної колби має бути 2000л

ТП 4.5 Вирощування інокуляту в посівному апараті об’ємом 10 л

У попередньо простерилізований посівний апарат що має об’єм 50 л, самоплином подається 4,8 л композиції А для вирощування інокуляту (від *ДР*

3.2.1), а також, через засівну колбу вносять 1 л композиції Б з колби (від *ДР 3.2.2*).

Дотримуючись правил асептики, із засівної колби (від *ТП 4.4*) посівний матеріал вносять через засівний пристрій у інокулятор що має об'єм 10 л. Процес культивування ведуть за наступних умов: температура 37°С, час вирощування 48 години, pH процесу фіксується датчиками та має становити 6,0. Швидкість мішалки – 150 об/хв.

ТП 4.6 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

У інокулятор самоплином подається 48 л композиції А (від *ДР 3.3.1*) та 10 л композиції Б (від *ДР 3.3.2*). Після чого за допомогою труби перетискування в інокулятор додається посівний матеріал з попередньої стадії (*ТП 4.5*). Температура поживного середовища має дорівнювати 37°С.

Культивування проводиться упродовж 24 годин при температурі 37°С (температура підтримується за рахунок подачі гарячої/холодної води в сорочку інокулятора), а pH процесу фіксується датчиками та має становити 6,0. Швидкість мішалки – 150 об/хв.

ТП 4.7 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1000 л

В інокулятор самоплином подається 560 л композиції А (від *ДР 3.4.1*) та 16 л композиції Б (від *ДР 3.4.2*). Після чого за допомогою труби перетискування в інокулятор додають посівний матеріал з минулої стадії (*ТП 4.6*). Температура поживного середовища має становити 37°С.

Культивування проводиться упродовж 24 годин при температурі 37°С (температуру підтримують подачею гарячої/холодної води в сорочку інокулятору), pH процесу фіксується датчиками та має становити 6,0. Швидкість мішалки – 150 об/хв.

ТП 5 Виробничий біосинтез

ТП 5.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 м^3

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом 10 м^3. У ферментер за допомогою відцентрового насосу з УБС (УБС-21)

подається 5,76 $м^3$ простерелізованого поживного середовища. Після чого за допомогою труби перетискування в інокулятор додають посівний матеріал з минулої стадії (*ТП 4.7*). Температура поживного середовища має становити 37°С.

Штам вирощують впродовж 48 годин при температурі 37°С, pH середовища 6. За допомогою датчиків значення pH виконується контроль значення pH проводиться. Швидкість мішалки – 150 об/хв.

РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва

7.1 Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

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 1.1.1 Приготування розчину дезактину	Концентрація дезактину	Хімічний	Після повного перемішування	С=0,2%
ДР 1.1.2 Приготування каустичної соди	Концентрація соди, температура	Хімічний	Після повного перемішування	С=2-3% t=40-60°С
ДР 1.1.3 Приготування мильного розчину та біомою	Концентрація мильного розчину, біомою	Хімічний	Після повного перемішування	$С_{м.р.}$ = 10% $С_{б}$=0,3%
ДР 1.2.1 Щоденне прибирання	Прибирання, пил, бруд	Візуальний	Після прибирання	Відсутність пилу та бруду
ДР 1.2.2 Генеральне прибирання	Прибирання, пил, бруд, мікробіологічний показник	Візуальний, мікробіологічний метод	Після прибирання	Відсутність пилу та бруду, КУО/$см^2$ ≤290
ДР 1.3.1 Миття обладнання	Температура, час	Термометр, годинник	Під час миття	t =70–80°С, τ=60 хв
ДР 1.3.2 Технічний огляд	Стан обладнання	Візуальний	Під час перевірки	Цілісність з'єднань трубопроводів, колекторів з апаратом
ДР 1.3.3 Ополіскування обладнання	Температура	Термометр	Під час ополіскування	t =20°С
ДР 1.3.4 Перевірка на герметичність	Час, тиск	Годинник, манометр	Під час перевірки	τ=30-60 хв, Р= 0,05–0,07 МПа
ДР 1.4.4 Стерилізація обладнання	Температура, час, тиск	Термометр, годинник, манометр		t= 131 ºС τ=60хв, Р= 0,15-0,18 МПа

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря Кт	повітрозабірник висота повітрезабірника	–	під час встановлення обладнання	Н = 30 м
ДР 2.2 Очищення повітря від пилу і механічних часток $К_т$	повітря на виході з фільтра грубої очистки ступінь очистки	згідно паспорту фільтра	Після проходження фільтра грубого очищення	Е = 80 % тиск - вілповідно паспорту
ДР2.3 Стиснення (компреміювання) повітря $К_т$	стиснене повітря тиск, температура	манометр термометр	після стиснення повітря	Р = 0,35 МПа tº = 120 – 250 ºС
ДР 2.4 Охолодження повітря та видалення вологи $К_т$	охолоджене повітря температура, вологість	термометр, психрометр	після охолодження повітря	tº = 26–30 ºС W = 60–70 %
ДР 2.5 Нагрівання повітря $К_т$	нагріте повітря температура, вологість	термометр, психрометр	після нагрівання повітря	tº = 50 ºС W = 50 %
ДР 2.6 Очищення повітря в головному фільтрі $К_т$	повітря на виході з головного фільтра ступінь очищення	згідно паспорту фільтра	після проходження через головний фільтр	Е = 95 %
ДР 2.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі $К_т$	повітря на виході з індивідуального фільтра ступінь очищення	згідно паспорту фільтра	після проходження фільтра індивідуальної очистки	Е = 99,99 %
ДР 3.1.1 Приготування та стерилізація поживого середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці	композиція А температура, час	Датчик температури, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск , час та pH визначаємо безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	Р = 0,05 МПа t = 30 хв tº = 112 ºС стерильність

Приготування та стерилізація композиції А Кт, Км				
ДР 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б $К_т$, $К_м$	композиція Б температура, час, стерильність	Датчик температури, манометр годинник, мікробіологічний контроль	Тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	Р = 0,05 МПа t = 50 хв t° = 131 °С стерильність
ДР 3.2.1, 3.3.1,3.4.1,3.5.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу Приготування та стерилізація композиції А $К_т$, $К_м$	композиція А час і температура стерилізації, тиск, стерильність pH	Датчик pH манометр , датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск , час та pH визначаємо безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	Р = 0,05 МПа t = 30 хв t° = 112 °С стерильність
ДР 3.2.2, 3.3.2, 3.4.2,3.5.2 Приготування та стерилізація композиції Б $К_т$, $К_м$	композиція Б температура, тиск, час, стерильність	Датчик температури, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск, час , температура– під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	Р = 0,05 МПа t = 50 хв t° = 131 °С стерильність
ТП 4.1 Підтримання колекційної культури $К_т$, $К_м$	колекційна культура *Rhodotorula glutinis mutant 32* Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій температура	датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура – безпосередньо при зберіганні, мікробіологічний контроль та пересів – кожні 2-3 місяці	t° = 2-8 °С мікробіологічна чистота

ТП 4.2 Одержання робочої культури на аграризованих середовищах $К_т$, $К_м$	робоча культура *Rhodotorula glutinis mutant 32* в колбах температура, час, мікробіологічна чистота	датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль – після вирощування	t^o = 37 ºС t = 24 год відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 4.3 Вирощування культури на скошеному поживному середовищі $К_т$, $К_м$	робоча культура *Rhodotorula glutinis mutant 32* на чашках петрі температура, час, мікробіологічна чистота	датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура - під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль – після вирощування	t^o = 37 ºС t = 24 год відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 4.4 Вирощування інокуляту в колбах $К_т$, $К_м$	посівний матеріал температура, час, мікробіологічна чистота частота обертів качалки	Термометр тахометр годинник мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікробіологічний контроль – кожні 22 годин	t^o = 37 ºС n =150 об/хв t = 24 год відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 4.5, 4.6 ,4.7 Вирощування культури в інокуляторах об'ємом 10л , 100л , 1м^3 $К_т$, $К_х$, $К_м$	посівний матеріал температура, час, швидкість перемішування, витрата аераційного повітря, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	датчик температури та pH, годинник, тахометр, ротаметр, фотометричний зчитувач оптичної густини, мікробіологічний контроль	Температура, pH, частота обертів мішалки та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації живих клітин та мікробіологічний контроль – кожні 20-22 год і після культивування	t =37 °С, τ=24 год, n=150 об/хв, pH=6,0 відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 5.1 Виробниче культивування у	культуральна рідина температура,	фотометричний зчитувач оптичної густини ,датчик	Температура, pH, частота обертів мішалки	t=37 °С, τ=48 год, n=150 об/хв, pH=6,0

ферментері об’ємом 10 $м^3$ $К_т$, $К_х$, $К_м$	час, швидкість перемішування, pH, концентрація біомаси, концентрація живих клітин, мікробіологічна чистота	температури, pH, годинник, тахометр, ротаметр, мікробіологічний контроль	та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації біомаси та мікробіологічний контроль – кожні 5 год і після культивування	відсутність сторонньої мікробіоти

7.2 Мікробіологічний контроль

Методика контролю стерильності поживного середовища.

Стадія допоміжних робіт підготовка поживних середовищ включає ряд операцій:

-зберігання компонентів поживних середовищ та допоміжних речовин; контроль показників якості;

-дозування та приготування композиції компонентів поживного середовища;

-при необхідності стерилізація.

Вибір способу підготовки поживного середовища визначається типом біотехнологічного виробництва.

І в цьому випадку приймаються до уваги:

-тип культивування (поверхневе або глибинне);

-тоннажність виробництва.

-рівень асептичності стадії біосинтезу

-термолабільність середовища взагалі або його компонентів (субстратів);

-спосіб стерилізації (періодичний або безперервний)

Режим стерилізації призначається залежно від мікробіологічної забрудненості. Термічний спосіб найбільше відповідає техніко-економічним вимогам виробництва. Отже з метою знезараження поживного середовища

використаємо метод термічної стерилізації. Цей метод оснований на тому, що при високих температурах гинуть як вегетативні клітини, так і спори мікроорганізмів.

Ріст дріжджів

Десять мл посівного матеріалу в логарифмічній фазі (9,8 г/л сухої клітинної маси), вирощеного в базальному середовищі додавали до 100 мл середовища, як описано в окремих підрозділах нижче, у колбах Ерленмейєра на 500 мл та інкубували при 28 °C ±1 на ротаційному шейкері при 240 об/хв протягом 72 год. Зразки періодично відбирали для визначення росту та вмісту каротиноїдів.

7.3 Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю

Визначення концентрації джерела вуглецю

Концентрація глюкози визначається у супернатанті культуральної рідини. Для одержання супернатанту культуральна рідина (100 мл) центрифугується для видалення біомаси при 3000 об/хв протягом 20 хв.

Визначення проводиться із застосуванням глюкозооксидазного методу.

Принцип методу полягає у окисленні глюкози киснем повітря у присутності ферменту глюкозооксидази, внаслідок чого утворюється перекис водню**.** Перекис водню окиснює ортотолідин у присутності ферменту пероксидази з утворенням забарвленої сполуки, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту глюкози.

Робочий реактив: у ацетатному буфері об’ємом 80 мл розчиняють 1 мг пероксидази та 2 мг глюкозооксидази, після чого додають 1 мл 1%-ного розчину ортотолідину, далі усе перемішують і доводять об'єм з використанням буферного розчину до 100 мл.

Потім додають 3 мл робочого реактиву до 1 мл супернатанту і обережно перемішують. Поступово починає розвиватися забарвлення, яке при звичайній кімнатній температурі стає макстмальним уже через 13-15 хв. Фотометрію

здійснюють при 625 нм довжині хвилі проти контрольного розчину (замість культуральної рідини у ньому міститься фізіологічний розчин).

За калібрувальним графіком проводять розрахунок. На одній осі графіка має бути відкладено концентрація глюкози (ммоль/л), а на іншій – величина екстинкції. [17]

Визначення концентрації амінного азоту

Амінний азот визначається мідним способом.

Амінокислот здатні утворювати розчинні з'єднання з міддю, після чого проводиться йодометричне титрування для визначення її кількості.

До слабо лужного розчину амінокислот необхідно додати надлишок суспензії ортофосфату міді $Cu_3(PO_4)_2$ у боратному буферному розчині. При цьому утворяться розчинні мідні з'єднання. Для відділення їх від нерозчинного ортофосфату міді дану суміш фільтрують. Далі додають до фільтрату оцтову кислоту, вона перетворюється в ацетат за рахунок відщеплення міді від комплексного з'єднання.

До розчину йодид калію, для визначення кількості міді, що приймала участь в реакції:

$$2Cu(CH_3COO)_2 + 4KJ = J_2 + 2CuJ + 4CH_3COOK$$

Продуктом реакції є йод, кількість якого є еквівалентною кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитровують з використанням розчину тіосульфату натрію:

$$J_2 + 2Na_2S_2O_3 = 2NaJ + Na_2S_4O_6$$

1 $см^3$ 0,01 н р-ну тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту, бо один атом міді реагує з двома молекулами амінокислот, утворюючи при цьому з'єднання типу $Cu(RCHNH_2COO)_2$ [18].

7.4 Визначення концентрації цільового продукту

Нашим цільовим продуктом виробництва є каротиноїди, а саме: β-каротин, торулін, торулородин та астаксантин (незначна кількість) які були виділені з мутованого штаму дріжджів Rhodotorula glutinis mutant 32.

Коли мутант 32 вирощували в резервуарі з перемішуванням (ST) протягом 96 годин, досягнута максимальна питома швидкість росту, швидкість утилізації цукру та максимальна біомаса становили m_{max} 1,0 год-1, 0,67±0,1 г/л/год та 12,8 ±0,2 г/год. л, відповідно. Загальна об'ємна продукція каротиноїдів становила 74,52 ±2 мг/л. Встановлено, що клітинне накопичення каротиноїдів становить 5821 ±50 мг/г. Вміст b-каротину становив 53,65 мг/л (4191 ±50 мг/г).

Встановлено, що пропорції b-каротину, торуліну та торулородину становлять 72 ±2%, 20 ±2% та 8 ±2% (маса/маса) відповідно. [16, с.150-151]

Концентрацію каротиноїдів в культуральному розчині вимірювали за допомогою методу ВЕРХ (високоефективної рідинної хроматографії)/

Для розділення використовується спеціальна хроматографічна колонка, яка виглядає як трубка, заповнена сорбентом. Коли проводять аналіз через хроматографічну колонку з постійною швидкістю подають рідину певного складу (елюент). Доза проби, що має бути точно виміряна, додається у цей потік. Завдяки різній спорідненості до сорбенту колонки, компоненти проби рухаються по ній з різною швидкістю і дістаються до детектора в різні проміжки часу.

Отже, хроматографічна колонка відповідає за ефективність розділення компонентів та їх селективність. Під час підбору різниз типів колонок можна керувати ступенем розділення речовин, які аналізуються. Ідентифікація сполук здійснюється за часом їх утримання. Кількісне визначення кожного з компонентів розраховують, виходячи з величини аналітичного сигналу, виміряного за допомогою детектора, який під'єднується до виходу хроматографічної колонки. [19]

ВЕРХ входить до складу групи методів, яка включає попереднє розділення початкової складної суміші на відносно прості. Аналіз отриманих сумішей потім здійснюється використовуючи звийні фізикохімічні методи або спеціальні методи, що були створені для рідинної хроматографії. Принцип рідинної хроматографії засновується на відмінності у рівноважному розподілі сумішей між двома фазами, що не змішуються, одна з яких при цьому нерухома, а інша рухома. Суміші завдяки своєму розміру, полярності або іншим властивостям між двома фазами розподіляються нерівномірно. Можливість використання рібнозернистих сорбентів (зазвичай 3-5 мкм, часто до 1,8 мкм) та високого тиску дозволяє розділяти складні суміші речовин повно і швидко (середній час аналізу становить від 3 до 30 хвилин).

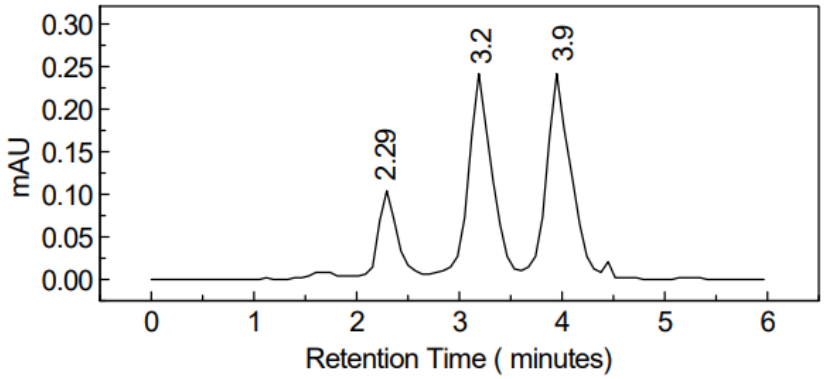
Обладнання:

-*Колонки.* Колонка для ВЕРХ – це стальна трубка що має діаметр 5-25 мм, наповнена нерухомою фазою (напр. модифікованим силікагелем) і закрита з перехідниками обох боків, які дозволяють її підключати до вхідної та вихідної ліній. Розраховують колонки на тиск порядку 150 атм.

-*Передколонки.* Передколонки — короткі аналоги основної колонки, розміщуються перед нею й захищають від забивання зразками. Найбільше потрібні при препаративній хроматографії.

-*Насоси*

-*Детектори*. Хроматограф під'єднаний до мас-спектрометра. Найчастіше застосовують УФ-детектори. Більшість органічних речовин поглинає світло на 210 нм (C=O) та 250 нм (ароматичні кільця). Дуже рідко (наприклад аналіз суміші вуглеводнів) з’являється необхідність застосування детекторів зміни показника заломлення світла. Ще рідше застосовуються детектори для флуоресценції. Порівняно дорогими є детектори-мас-спектрометри. Не так давно було розроблено хроматографічні системи, де детектування відбувається також ЯМР-спектрометром. [20]



ВЕРХ-хроматограма стандартної суміші торулярродину (RT 2,29 хв, 5 мг/л), торулену (RT 3,2 хв, 30 мг/л) і b-каротину (RT 3,9 хв, 30 мг/л). [16, с.44]

РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля

8.1 Аналіз технологічної схеми виробництва каротиноїдів

Представлена в роботі технологія отримання каротиноїдів включає підготовчі процеси (санітарну підготовку виробництва, підготовку і стерилізацію піногасника, приготування і стерилізацію поживного середовища для культивування), основні ферментаційні процеси (отримання посівного матеріалу, виробниче культивування) та постферментаційні процеси (виділення та очищення цільового продукту).

1. Санітарна підготовка виробництва.

Даний етап складається з щоденного прибирання та генерального прибирання приміщень з використанням засобів Дезактин і Хлорантоїн, які використовуються для очищення та дезінфекції стін, підлоги, дверей і вікон виробничих приміщень. Дезінфекційні засоби Дезактин і Хлорантоїн випускаються у вигляді концентратів у пластикових пляшках об'ємом 1 л. Відпрацьований розчин зливають у каналізацію.

Ємнісне обладнання необхідно вимити використовуючи CIP-мийку та миючий засіб Дезактин. Після миття промивна вода надходить до каналізації, а відпрацьований розчин надходить до збірника та може використовуватись повторно. *Даний етап – місце емісії великих об`ємів рідких відходів.*

2. Підготовка і стерилізація піногасника

Силіконовий піногасник «SILFOAM SE» стерилізується в окремому збірнику та подається у ферментер під час виробничого культивування при значному піноутворенні. *У загальному об`ємі рідких відходів відходи піногасника не враховують*.

3. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

Перевірку сировини проводять перед безпосереднім приготуванням середовища. За невідповідності нормам відбраковують. Також стандартними твердими відходами на даному етапі є пакувальні матеріали від сировини. *Даний етап – місце емісії твердих відходів*.

4. Підготовка посівного матеріалу

На даному етапі відбувається нарощування посівного матеріалу в інокуляторах. Посівний матеріал використовується для засіву наступного ферментера тому відходи посівного матеріалу не враховуються.

Дріжджі *Rhodotorula glutinis* є аеробом, їм необхідно забезпечувати аерацію, тому під час культивування буде утворюватись великий об`єм відпрацьованого повітря. *Даний етап є місцем емісії великих об`ємів газоподібних відходів*

5. Виробничий біосинтез

На цьому етапі *Rhodotorula glutinis* культивується для отримання культуральної рідини з каротиноїдами. Рідкі відходи на даному етапі не враховуються, так як після завершення біосинтезу культуральна рідина надходить до збірника перед виділенням ферменту.

Даний етап є місцем емісії великих об`ємів газоподібних відходів

8.2 Характеристика рідких відходів виробництва каротиноїдів

Розрахунок об`ємів відходів.

Для щоденного прибирання готують розчини Дезактину концентрацією 0,2% та дезинфікувального засобу

Хлорантоїну концентрацією 0,2%. За один цикл виробництва (152 год – 6 днів) витрачається 1260 л робочого розчину Дезактину, який після миття зливається у каналізацію. Обладнання миють 0,2%-им розчином Дезактину за допомогою CIP-мийки, об`єм відходів за один цикл 28640 л. Мийний засіб Дезактин має клас безпеки IV, а тому є безпечним для навколишнього середовища. Узагальнена характеристика рідких відходів виробництва наведела у *табл. 8.1*.

Таблиця 8.1

Характеристика рідких відходів під час виробництва каротиноїдів

Назва складової рідких відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об`єм відходів на 1 цикл виробництва (л)	Клас небезпеки
0,2 % розчин Дезактину	1,3-дихлор-5,5-диметилгідантоїн (дихлорантин) - 21,0-23,0 (діюча речовина); 5,5-диметилгідантоїн - 12,4-16,4; диспергатор - 9,0-12,0; аніонні поверхнево-активні речовини - 3,2-5,0; інгібітор корозії до 10,0; наповнювач до 100,0.	28640	IV

**Заходи для зменшення об`ємів відходів.** Для зменшення об`ємів стічних вод, для миття використовується CIP-мийка, що дозволяє витрачати меншу кількість миючого засобу та використовувати миючий повторно після його очищення.

Утилізація рідких відходів. Біологічне очищення стічних вод пропонується проводити в реакторах періодичної дії (SBR-реакторах). Такі реактори займають менше місця, ніж аеротенки та інші конструкції

водоочисних споруд, але мають високу та стабільну якість очищення стічних вод. Принцип дії установки базується на чергуванні процесів аеробної та анаеробної очистки, завдяки чому, в одному апараті відбуваються два типи очищення.

Процес очищення стічних вод складається з таких стадій:

1) Анаеробна (вода подається через нижню частину реактора в анаеробних умовах, відбувається виділення фосфатів та заміна стічних вод з киснем та нітратами на вихідну воду)
2) Аноксидна стадія (мулову суміш в реакторі перемішують та відбувається інтенсифікація процесів денітрифікації)
3) Аеробна стадія (починається інтенсивна аерація, що забезпечує процеси нітрифікації та накопичення фосфатів у клітинах активного мулу)
4) Відстоювання (відбувається осадження та накопичення активного мулу і нижній частині реактора)
5) Видалення очищеної води та надлишкового активного мулу (очищена вода відкачується декантерами з верхньої частини ректора).

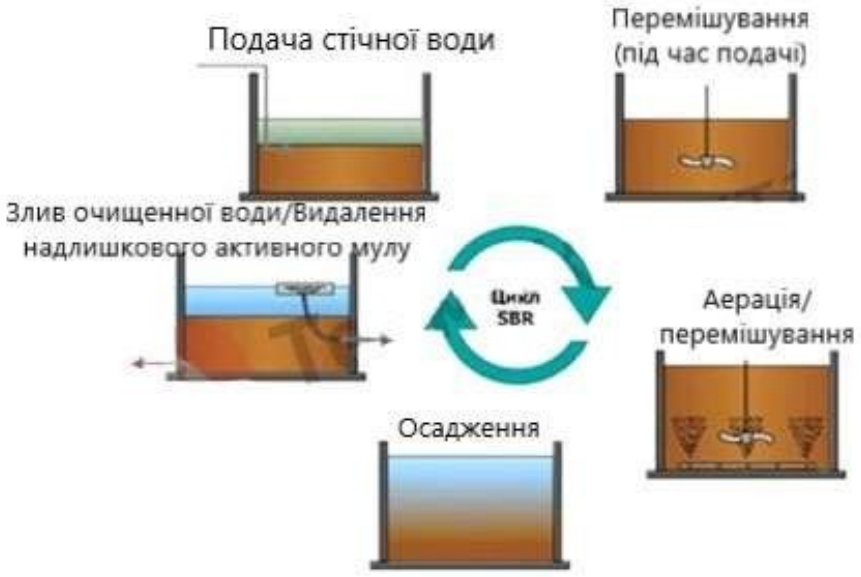


Рисунок 1. Схема роботи SBR-реактора

8.3 Характеристика твердих відходів виробництва каротиноїдів

Розрахунок об`ємів відходів. На етапах санітарної підготовки виробництва та приготування поживного середовища твердими відходами є упаковка, в якій поставляються мийні засоби та компоненти середовища. Упаковка для засобів Дезактин та Хлорантоїн виготовлена з поліетилену високої щільності і піддається вторинній переробці. Компоненти поживного середовища (качани кукурудзи та монофосфат калію) постачаються у мішках з полівінілхлориду. Полівінілхлорид відрізняється від звичайного пластику і потребує окремої вторинної переробки.

Таблиця 8.2

Характеристика твердих відходів під час виробництва каротиноїдів

Назва складової твердих відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об`єм відходів на 1 цикл виробництва (кг)	Клас небезпеки
Упаковка «Дезактину» та Хлорантоїну	Поліетилен високої щільності (HDPE)	0,84	IV
Упаковка дріжджового екстракту	Мішковий папір (марка БМ)	12,4	IV
Упаковка компонентів поживного середовища	Полівінілхлорид (PVC-3)	1,54	IV
Відпрацьова на біомаса	Біомаса культури *Rhodotorula glutinis*	240	IV
	Всього	254,78	

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

Так як біомаса, яка залишилась після фільтрування, містить велику кількість поживних речовин білкової природи у вигляді клітин продуцента, пропонується утилізувати її як біодобавку до кормів. У клітинах дріжджів міститься приблизно 62% білка до сухої маси, які ще також мають поживну цінність для тварин.

Процес приготування білкової добавки буде виглядати так:

1) відфільтрована біомаса змішується з зерновою сировиною;
2) екструдування за температури 110-130°С протягом 1-2 хв;
3) охолодження до температури близько 10°С;
4) подрібнення до необхідного розміру за рецептом відповідного комбікорму.

8.4 Характеристика газоподібних відходів виробництва каротиноїдів

Розрахунок об`ємів відходів. Газоподібні відходи утворюються на етапах підготовки посівного матеріалу та виробничого культивування сушіння на розпилювальній сушарці. У відпрацьованому аераційному повітрі міститься велика кількість вуглекислого газу.

Тривалість підготовки посівного матеріалу в інокуляторах становить 216 год, а виробничий біосинтез займає 144 год. Аерацію здійснюють зі швидкість 1 л/лКР/хв. Для підготовки інокуляту використовують 3 ферментера з робочим об’ємом 300 л, а для виробничого біосинтезу 1 ферментер з робочим об’ємом 3000 л. Отже, приблизний об`єм відпрацьованого повітря за цикл ферментації становить:

$$3 \cdot (300 \cdot 216) + (3000 \cdot 144) = 626400 \text{ л} = 626{,}4 \text{ м}^3$$

Заходи для зменшення об`ємів відходів. Відпрацьоване аераційне повітря після фільтрування можна використовувати урозпилювальній сушарці як теплоагент.

Таблиця 8.3

Характеристика газоподібних відходів під час виробництва каротиноїдів

Назва складової газоподібних відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об`єм відходів на 1цикл виробництва ($м^3$)	Клас небезпеки
Відпрацьоване повітря після ферментації	Вуглекислий газ	47,52	IV

8.5. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Отже під час виробництва каротиноїдів з використанням продуцента *Rhodotorula glutinis* виділяється досить велика кількість відходів, але вони не становлять загрози навколишньому середовищу. Рідкі відходи складаються зі стічних вод, що утворюються на стадії санітарної підготовки виробництва. Очищення цих вод можна проводити в реакторах періодичної дії, що включають стадії анаеробного та аеробного очищення, відстоювання та видалення очищеної води. Найбільшу кількість твердих відходів становить біомаса продуцента, що залишається після фільтрування. Утилізацію біомаси пропонується проводити шляхом додавання її до кормів у якості білкової добавки, після попередньої підготовки. Найбільший об`єм становлять газоподібні відходи, а саме відпрацьоване аераційне повітря. Відпрацьоване аераційне повітря після очищення від спор у фільтрі та відцентровому скрубері пропонується використовувати у розпилювальній сушарці.

Отже, виробництво каротиноїдів є екологічно безпечним з максимально можливою утилізацією відходів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Напрямлений синтез каротиноїдів у дріжджів і перспектива їх використання - Кіріца Олена // Академія наук Молдови, Інститут мікробіології
2. Hernández-Almanza, A., Cesar Montanez, J., Aguilar-González, M. A., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2014). Rhodotorula glutinis as source of pigments and metabolites for food industry. Food Bioscience, 5, 64–72., http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2013.11.007
3. Carotenoids in Antioxidant Networks. Colorants or Radical Scavengers Leif H. Skibsted // Food Chemistry, Department of Food Science, University of Copenhagen, Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C, Denmark https://doi.org/10.1021/jf2051416
4. Каротиноїди: будова, властивості та біологічна дія - М. Сімонова Інститут біології тварин УААН, вул. В. Стуса, 38, Львів 79034, Україна https://doi.org/10.30970/sbi.
5. Langi, P., Kiokias, S., Varzakas, T., & Proestos, C. (2018). Carotenoids: From Plants to Food and Feed Industries. Microbial Carotenoids, 57–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9_3
6. Краєвська, І.М. & Васіна, Л.М. (2017). Динаміка накопичення біомаси й каротиносинтезуюча активність Rhodotorula glutinis (Fresenius) F. C. Harrison (1982) за дії ультрафіолету. Науковий вісник Чернівецького університету.
7. Moline M., Libkind D., van Broock M. Production of torularhodin, torulene, and β-carotene by Rhodotorula yeasts // Microbial Carotenoids From Fungi / Edited by Barredo J.L. / Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), Vol. 898. – Humana Press, Totowa, NJ, 2012. – P. 275–283.
8. Процеси і апарати біотехнологічного виробництва [Електронний ресурс]: метод. реком. до виконання практичних робіт для здобувачів ступеня вищої освіти Бакалавр" напряму 6.051401 "Біотехнологія" денної форми навчання / уклад. : А. С. Пастушенко, М. С. Храмов, О. І. Норинський. — Електрон. текст. дан. – Миколаїв : МНАУ, 2016. – 49 с.
9. Pitt JI, Hocking AD (1999). Грибы и порча пищевых продуктов (2-е изд.). Гейтерсбург, Мэриленд: Публикации Аспен. ISBN 0-8342-1306-0.
10. Frengova, G. I., & Beshkova, D. M. (2008). Carotenoids from Rhodotorula and Phaffia: yeasts of biotechnological importance. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 36(2), 163–180. https://doi.org/10.1007/s10295-008-0492-9

11. Bhosale, P., & Gadre, R. V. (2002). Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced beta-carotene production by mutant 32 of Rhodotorula glutinis. Letters in Applied Microbiology, 34(5), 349–353. https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01095.x
12. Kot, A. M., Błażejak, S., Kurcz, A., Gientka, I., & Kieliszek, M. (2016). Rhodotorula glutinis—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(14), 6103–6117. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7611-8
13. Kot, A. M., Błażejak, S., Gientka, I., Kieliszek, M., & Bryś, J. (2018). Torulene and torularhodin: "new" fungal carotenoids for industry? Microbial Cell Factories, 17(1). https://doi.org/10.1186/s12934-018-0893-z
14. Maldonade IR, Rodriguez-Amaya DB, Scamparini ARP. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. Food Chem. 2008;107:145–50.
15. Hany M. Yehia, Ebtesam M. Al- Olayan, Manal F. Elkhadragy, Abd-El-Rahman M. Khalaf- Allah and Nagwa M. El-Shimi. Improvement of Carotenoid Pigments Produced by Rhodotorula Glutinis. Life Sci J 2013;10(4):386-400 (ISSN: 1097-8135) [Електронний ресурс]: https://www.researchgate.net/publication/288206453_Improvement_of_carotenoid_pigments_produced_by_Rhodotorula_glutinis
16. Prakash, B. B. (2001). Studies on yeast Rhodotorula, its carotenoids and their applications. Thesis, Doctor of Philosophy. University of Pune. India. [Електронний ресурс]: https://dspace.ncl.res.in/xmlui/bitstream/handle/20.500.12252/2307/TH1259.pdf?sequence=1&isAllowed=y
17. Принцип глюкозооксидазного методу визначення глюкози. [Електронний ресурс]: https://meduk.net.ua/archives/23315
18. Визначення вмісту амінного азоту у пивному суслі йодометричним методом по Попу і Стівенсу (мідним способом). [Електронний ресурс]: https://studfile.net/preview/9033163/page:15/
19. Високоефективна рідинна хроматографія [Електронний ресурс]: https://tdmuv.com/kafedra/internal/pharma_2/classes_stud/uk/pharm/prov_pharm/ptn/%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D1%96%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%BD%D0%B0%20%D1%85%D1%96%D0%BC%D1%96%D1%8F/2%20%D0%BA%D1%83%D1%80%D1%81/25%20%D0%92%D0%B8%D1%81%D0%BE%D0%BA%D0%BE%D0%B5%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%B2%D0%BD%D0%B0%20%D1%80%D1%96%D0%B4%D0%B8%D0%BD%D0%BD%D0%B0%20%D1%85%D1

%80%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%B0%D1%84%D1%96%D1%8F.htm
20. Gerber, F., Krummen, M., Potgeter, H., Roth, A., Siffrin, C., & Spoendlin, C. (2004). Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3µm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice. Journal of Chromatography A, 1036(2), 127–133. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.056
21. Di Caprio F., Visca A., Altimari P., Toro L., Masciocchi B., Iaquaniello G., Pagnanelli F., 2016, Two-stage process of microalgae cultivation for starch and carotenoid production, Chemical Engineering Transactions, 49, 415-420 https://doi.org/10.3303/CET1649070
22. Přibyl, P., Cepák, V., Kaštánek, P., & Zachleder, V. (2015). Elevated production of carotenoids by a new isolate of Scenedesmus sp. Algal Research, 11, 22–27. https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.020
23. Каротиноїди у годуванні тварин [Електронний ресурс]: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjly6WqrOL5AhVLposKHdabC_sQFnoECAgQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.tsenovik.ru%2Farticles%2Fkorma-i-kormovye-dobavki%2Fkarotinoidy-v-kormlenii-zhivotnykh%2F&usg=AOvVaw0lq8fwgk1LIQJXjuz75V3f
24. Gerber, F., Krummen, M., Potgeter, H., Roth, A., Siffrin, C., & Spoendlin, C. (2004). Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3µm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice. Journal of Chromatography A, 1036(2), 127–133. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.056
25. Di Caprio F., Visca A., Altimari P., Toro L., Masciocchi B., Iaquaniello G., Pagnanelli F., 2016, Two-stage process of microalgae cultivation for starch and carotenoid production, Chemical Engineering Transactions, 49, 415-420 https://doi.org/10.3303/CET1649070
26. Přibyl, P., Cepák, V., Kaštánek, P., & Zachleder, V. (2015). Elevated production of carotenoids by a new isolate of Scenedesmus sp. Algal Research, 11, 22–27. https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.020

27. Каротиноїди у годуванні тварин [Електронний ресурс]: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjly6WqrOL5AhVLposKHdabC_sQFnoECAgQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.tsenovik.ru%2Farticles%2Fkorma-i-kormovye-dobavki%2Fkarotinoidy-v-kormlenii-zhivotnykh%2F&usg=AOvVaw0lq8fwgk1LIQJXjuz75V3f
28. Інструкція для медичного застосування препарату «Оптикс» https://sanitas.ua/product/3403
29. Львівський обласний інформаційно-аналітичний центр медичної статистики https://lvivphc.org.ua/health-care/articles/keeping_your_sight_well
30. Біомой методичні вказівки (інструкція по застосуванню) https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/biomoj-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu/
31. І.В. Бондар, В.М. Гуляєв Промислова мікробіологія Харчова і агробіотехнологія. Навчальний посібник для студентів спеціальності 7.092901 – “Промислова біотехнологія.”. Кам’янське, видавництво ДДТУ, 2004. − 280 стор . https://www.dstu.dp.ua/Portal/Data/5/7/5-8-b.pdf