

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології та біофармації

ЗАТВЕРДЖУЮ

в.о. завідувача кафедри

_____ Валентина ПОЛІЩУК

«10» червня 2023 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Технологія виробництва ретинолу. Дільниця біосинтезу»

Виконав (-ла):

студент (-ка) IV курсу, групи БТ-92

Вітович Яна Андріївна _____

Керівник:

Проф. каф. пром. біотехнології та біофармації, д.ф.-м.н., проф.

Литвинов Григорій Сергійович _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для
проведення технологічного процесу:

Доцент кафедри біотехніки та інженерії, к.т.н., доц

Шибецький Владислав Юрійович _____

Рецензент:

К.т.н., асистент каф. біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

Дем'яненко Ірина Володимирівна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Студентка _____

Київ – 2023 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП 9204. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	109	
3	A1	ДП 9204. 01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП 9204. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП 9204. 03.000 ТК	Ферментер	1	

				ДП 9204 00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата			
Розробн.	Вітович Я.А.			Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Керівн.	Литвинов Г.С.				1	109
Консульт.	Шибєцький В.Ю.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПББФ Гр. БТ-92	

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології та біофармації

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

в.о. завідувача кафедри

_____ Валентина ПОЛІЩУК

«19» квітня 2023 р.

ЗАВДАННЯ
на дипломний проєкт студенту
Вітович Яні Андріївні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва ретинолу. Дільниця біосинтезу», керівник проєкту Литвинов Григорій Сергійович, проф. каф. пром. біотехнології та біофармації, д.ф.-м.н., проф., затверджені наказом по університету від «22» травня 2023 р. № 1888-с
2. Термін подання студентом проєкту 10.06.2023 р.
3. Вихідні дані до проєкту: кінцевий продукт – концентрат ретинолу в масляній формі в ампулах по 2 мл; ферментер для промислового культивування - об'єм 6,3 м³; параметри культивування: аерація 0,6-0,7 м³, температура 28 °С, перемішування швидкістю 2,67 с⁻¹.
4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва ретинолу; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проекту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Шибєцький В.Ю. доц. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	19.04.23-12.05.23 р.	
2.	Біохімічні основи виробництва	13.05.23-17.05.23 р.	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	18.05.23-21.05.23 р.	
4.	Технологічна частина	21.05.23-27.05.23 р.	
5.	Складання апаратурної схеми	28.05.23-29.05.23 р.	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	29.05.23-04.06.23 р.	
7.	Оформлення пояснювальної записки	04.06.23 р.	
8.	Подання дипломного проекту на рецензування	31.05.23-05.06.23 р.	
9.	Подання дипломного проекту та рецензії до експертної комісії	до 10.06.23 р.	

Студентка

Яна ВІТОВИЧ

Керівник

Григорій ЛИТВИНОВ

**Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва ретинолу. Дільниця
біосинтезу»**

Київ – 2023 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт містить 109 ст., 13 рисунків, 3 таблиці, 3 креслення та 49 посилань.

Метою роботи є розробка технології виробництва концентрованого ретинолу у масляній формі. В якості продуцента запропоновано використовувати штам аскоміцетних дріжджів *Y. lipolytica* CJ2104, які мають найвищі показники синтезу ретинолу серед відомих. Обраний штам отримано в результаті генетичної інженерії.

На основі аналізу літератури щодо досліджень продуцента *Y. lipolytica* було підібрано поживне середовища для процесу біосинтезу, а також оптимальні умови, в яких відбувається максимальний синтез продукту. Було проаналізовано фізіолого-біохімічні характеристики продуцента та визначено, що для синтезу продукту важливими аспектами є аерація та перемішування культуральної рідини.

Було розроблено технологічну та апаратурну схему отримання продукту, а також наведено креслення загального виду ферментеру об'ємом 6,3 м³.

Запропоновані рішення дозволили спроектувати виробництво концентрату ретинолу у масляній формі, запакованого в картонні коробки по 10 ампул об'ємом 2 мл.

ДРІДЖДІ, YARROWIA LIPOLYTICA, РЕТИНОЛ, ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, ГЛИБИННЕ КУЛЬТИВУВАННЯ, БІОСИНТЕЗ, ЕКСТРАГУВАННЯ, ФЕРМЕНТЕР

					ДП 9204. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив.	Вітович Я.А.						5	110
Консульт.	Шибєцький В.Ю.							
Керівник	Литвинов Г.С.					КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Затвер.								

ABSTRACT

The diploma project contains 109 articles, 13 figures, 3 tables, 3 drawings and 49 references.

The purpose of the work is to develop a technology for the production of concentrated retinol in oil form. As a producer, it is proposed to use the ascomycete yeast strain *Y. lipolytica* CJ2104, which has the highest rates of retinol synthesis among those known. The selected strain was obtained as a result of genetic engineering.

Based on the analysis of the literature on studies of the *Y. lipolytica* producer, the nutrient medium for the biosynthesis process was selected, as well as the optimal conditions in which the maximum synthesis of the product occurs. The physiological and biochemical characteristics of the producer were analyzed and it was determined that aeration and mixing of the culture liquid are important aspects for product synthesis.

A technological and equipment scheme for obtaining the product was developed, as well as drawings of the general type of fermenter with a volume of 6.3 m³ were given.

The proposed solutions made it possible to design the production of retinol concentrate in oil form, packed in cardboard boxes of 10 ampoules with a volume of 2 ml.

YEAST, *ARROWIA LIPOLYTICA*, RETINOL, CULTURE MEDIUM, DEEP CULTURE, BIOSYNTHESIS, EXTRACTION, FERMENTER

					<i>ДП 9204. 00.000 ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив.	Вітович Я.А.							
Консульт.	Шибєцький В.Ю.							
Керівник	Литвинов Г.С.							
Затвер.					<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ</i>			
					Стадія	Аркуш	Аркушів	
						6	110	

ЗМІСТ

ВСТУП	10
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	13
1.1. Основні промислові продуценти	13
1.2. Систематичне положення	14
1.3. Морфолого-цитологічні ознаки	14
1.4. Культуральні ознаки	16
1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки	18
1.6 Поширення в природі	24
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	27
2.1 Характеристика кінцевого продукту	27
2.2 Схема хімічних перетворень	28
2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології	34
2.4 Методи очистки цільового продукту	34
2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	37
РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ .	41
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту	41
3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту	43
3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі.....	44
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	47
4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	47

					ДП 9204. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ЗМІСТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив.	Вітович Я.А.						7	110
Консульт.	Шибєцький В.Ю.							
Керівник	Литвинов Г.С.					КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Затвер.								

4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	48
4.3. Опис технологічного процесу.....	52
4.4 Матеріальний баланс.....	71
4.5 Контроль виробництва.....	74
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	83
5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату	83
5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....	86
5.2.1. Визначення теплофізичних властивостей середовища	86
5.2.2. Конструктивний розрахунок	87
5.2.3. Розрахунок перемішування.....	88
5.2.4. Тепловий розрахунок	92
5.3 Вибір загальнозаводського обладнання	99
5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища	101
ВИСНОВКИ.....	104
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	105

ВСТУП

Ретиноїди використовуються як косметичні та ефективні лікарські засоби при шкірних захворюваннях. Вони відіграють важливу роль для зору, розвитку кісток, репродукції та здоров'я шкіри як антиоксиданти, а також відомо, що вони знижують ризик деяких видів раку. Останніми роками ретиноїди привернули підвищену увагу як косметичні активні інгредієнти та ефективні фармацевтичні препарати для шкірних захворювань [1].

Актуальність: Хімічно синтезовані ретиноїди є основним комерційним джерелом. Ретинол був отриманий шляхом підкислення або гідролізу ретиналю, який синтезується хімічним шляхом шляхом відновлення похідної пентадієну. Однак ці хімічні процеси мають деякі недоліки, такі як складні етапи очищення та утворення небажаних побічних продуктів [1]. Тому в даному проєкті запропонований спосіб біосинтезу ретинолу з його подальшим ефективним використанням. Такий спосіб є більш економічними та екологічними, адже в порівнянні з хімічним методом не має деякі небажані характеристики, такі як, наприклад, високе споживання енергії, складні етапи очищення та небажані побічні продукти [2].

Обсяг світового ринку ретинолу в 2022 році оцінювався в 1,33 мільярда доларів США, і очікується, що з 2023 по 2030 рік він зростатиме на 3,8% у середньому за рік. Це пов'язано зі зростанням використання продукту в різних галузях застосування включаючи засоби особистої гігієни та косметику, корми для тварин, їжу та напої.

Дефіцит вітаміну А може призвести до сліпоти, дисфункції імунної системи та інших проблем зі здоров'ям. Щоб боротися з цим їжу збагачують вітаміном А, який часто постачається у формі ретинолу.

					ДП 9204. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив.	Вітович Я.А.						9	109
Консульт.	Шибєцький В.Ю.							
Керівник	Литвинов Г.С.					КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Затвер.								

Крім засобів особистої гігієни та збагачення харчових продуктів, продукт також використовується у фармацевтичній промисловості. Препарати на основі ретинолу використовуються для лікування різноманітних захворювань, включаючи акне, псоріаз і деякі види раку.

Сегмент засобів особистої гігієни та косметики домінував на ринку з найвищою часткою доходу в 50,9% у 2022 році. Це можна пояснити зростанням попиту на продукти проти старіння. Споживачі все більше усвідомлюють переваги ретинолу у зменшенні появи тонких ліній і зморшок, що призвело до збільшення попиту на засоби догляду за шкірою на основі ретинолу.

Глобальна промисловість ретинолу є висококонкурентною, у виробництві та розповсюдженні продукту беруть участь кілька ключових компаній. Деякі з провідних компаній на ринку, а саме: BASF SE, Beauty Solutions LTD, Eluminex Biosciences, DSM Nutritional Products, і Zhejiang NHU Co., Ltd., пропонують ряд продуктів для особистого догляду, харчових продуктів і напоїв, а також кормів для тварин. Крім того, компанії розробляють нові рецептури, щоб зробити продукти на основі ретинолу більш ефективними та зручними для користувача. Наприклад, у сегменті особистої гігієни компанії розробляють нові формули, які поєднують ретинол з іншими активними інгредієнтами для підвищення його ефективності. У сегменті кормів для тварин компанії розробляють нові добавки, які є більш біодоступними та легшими для введення тваринам.

В Україні наявні такі виробники ретинолу: ПАТ ВІТАМІНИ, ПрАТ «Технолог». Косметичний ретинол в Україні виробляють невеликі фірми, такі як Jole Cosmetics. Спостерігається масовий імпорт ретинолу і нездатність в достатній кількості виробити його всередині країни за даними 2022 року згідно з Державною службою статистики України. В чому й полягає актуальність цього проєкту [3].

Метою проєкту є розробка технології виробництва концентрату ретинолу у масляній формі. Для досягнення мети, поставлені наступні завдання:

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						10
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- 1) Обрати найефективніший продуцент для біосинтезу ретинолу.
- 2) Підібрати найоптимальніші умови для виробництва.
- 3) Розробити апаратурну та технологічну схеми виробництва.
- 4) Представити розрахунок для ферментера, як ключового апарату у даному проєкті.
- 5) Забезпечити постадійний контроль процесу, навести перелік контрольних точок.
- 6) Розглянути вимоги до охорони праці та експлуатації обладнання.

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						11
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Основні промислові продуценти

Попри те, що ретинол активно використовується в різних індустріях, особливо в косметичній, на даний момент відомо лише про кілька спроб біологічного виробництва ретиноїдів і відповідно про обмежену кількість штамів, які підходять для цих цілей.

Одним з таких є сконструйовані штами *S. cerevisiae* Y03-11, Y03-221, Y03-25, які були генетично модифіковані шляхом впровадження генів, що кодують ферменти, необхідні для синтезу ретинолу. Вони виробляють ретинол шляхом біосинтезу з відповідних прекурсорів, таких як бета-каротин. Введення генетичної інженерії дозволяє оптимізувати шляхи синтезу ретинолу в клітинах *S. cerevisiae*, що забезпечує високу ефективність виробництва. Серед переваг можна зазначити хорошу вивченість виду, який широко використовують як модельну систему. Серед трьох запропонованих штамів, найкращу характеристику, а саме найбільший об'єм синтезованого ретинолу мав штам *S. cerevisiae* Y03-11 [4].

Відомо також про *E. Coli*, як вид здатний до вироблення ретиноїдної суміші, яка включає ретинол, ретиналь і ретинілацетат. Ретиналь метаболізується до ретинолу та ретинілацетату послідовним чином ретинолдегідрогеназою та ретинол ацилтрансферазою відповідно. Ген *ybbO* у *E. Coli* 83972 було ідентифіковано як ретинолдегідрогеназу в базі даних білків NCBI [1].

Проте найефективнішим потенційним продуцентом є штам *Y. lipolytica* CJ2104. Він був обраний за рахунок найбільшого загального синтезу ретинолу

					ДП 9204. 00.000 ПЗ				
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розробив.	Вітович Я.А.				РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Стадія	Аркуш	Аркушів	
Консульт.	Шибєцький В.Ю						12	109	
						КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ			
Керівник	Литвинов Г.С.								
Затвер.									

серед запропонованих штамів. Навідміну від вищезгаданих продуцентів, *Y. lipolytica* пропонує найбільш вигідне співвідношення ретинолу до інших ретиноїдів в складі синтезованої суміші [5].

1.2. Систематичне положення

Домен: *Eukaryota*

Царство: *Fungi*

Підцарство: *Dikarya*

Тип: *Ascomycota*

Клас: *Saccharomycetes (Hemiascomycetes)*

Порядок: *Saccharomycetales*

Родина: *Dipodascaceae*

Рід: *Yarrowia*

Вид: *Yarrowia lipolytica* [6]

Синоніми: *Saccharomycopsis pseudolipolytica*, *Endomycopsis lipolytica*, *Mycotorula lipolytica*, *Torula lipolytica*, *Candida pseudolipolytica*, *Candida lipolytica*, *Torulopsis petrophilum*, *Monilia cornealis*, *Saccharomycopsis lipolytica*, *Proteomyces cornealis*, *Candida olea*, *Azymoprocandida lipolytica*, *Candida paralipolytica*, *Candida oleophila*, *Candida petrophilum*, *Proteomyces cornealis* [7].

Видова назва «*lipolytica*» була дана завдяки здатності цих дріжджів гідролізувати жирові субстрати. [8]

1.3. Морфолого-цитологічні ознаки

Y. lipolytica є природним диморфним грибом, який може змінювати яйцеподібну форму одноклітинних дріжджів на багатоклітинні нитки

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						13
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

сертованих гіф або псевдогіф [9]. *Y. lipolytica* може утворювати залишковий міцелій, добре розвинений міцелій або взагалі не утворювати ниток. Нениткоподібні форми зазвичай овальні і еліпсоїдні. Створення диморфних форм залежить насамперед від несприятливих умов навколишнього середовища, таких як зміна кисню, рН, вуглецю та азоту в субстратах [8]. Справжній міцелій складається з перегородчастих гіф шириною 3-5 мкм і довжиною до декількох мм. Апікальні клітини часто перевищують 100 мкм, тоді як сегменти мають довжину від 50 до 70 мкм [10]. У кожному сегменті є одне ядро. У септах є дрібна, незвичайна для інших нитчастих дріжджів центральна пора аскоміцетного типу, через яку від сегмента до сегмента простягається ендоплазматична сітка [11]. Перегородки мають дрібну центральну пору аскоміцетного типу, незвичайну для інших ниткоподібних дріжджів, з ендоплазматичним ретикулумом, що тягнеться через неї від одного сегмента до іншого [10].

Утворення аскоспор: цей вид є гетероталічним. Аски (рис. 1.1.) є некон'югованими і можуть утворюватися з природних диплоїдів або з диплоїдів, отриманих в результаті кон'югації комплементарних типів спарювання [7]. Аски зазвичай знаходяться на клітинах гіф, рідше на одному бластоконідіумі. Аски можуть бути стебельчастими або сидячими [11]. Зазвичай вони утворюють 1-4 аскоспори. Форма аскоспор досить різноманітна і частково визначається парними типами спарювання. Вони можуть бути сфероїдальними, капелюшковими, напівсфероїдальними або дещо заокругленими, також можуть мати неправильну форму і бути шорсткими [7].

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						14
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



Рис. 1.1. *Y. lipolytica* аски з аскоспорами [7].

1.4. Культуральні ознаки

In vivo Y. lipolytica росте як суміш дріжджів, що брунькуються, і коротких міцеліальних утворень, однак у контрольованих умовах він може рости як квазіоднорідна популяція (приблизно 85–90%) дріжджоподібних клітин або розгалужених гіф. У середовищах, що містять гліцерин, *Y. lipolytica* росте як дріжджі овальної форми, тоді як він приймає ниткоподібну форму в глюкозному середовищі. Крім того, гліцерин блокує диморфний перехід навіть у присутності глюкози, тоді як виснаження гліцерину індукує ниткоподібний ріст.

Коли клітини піддаються впливу різного роду стресу, наприклад температури, рН, механічного стресу, осмотичного тиску, джерела вуглецю та азоту, переважає філаментация. Спермін та індол-3-оцтова кислота (IAA) індукують перехід дріжджів-гіф у *Y. lipolytica*, що впливає на архітектуру колонії. Ріст гіф можна також індукувати додаванням казеїну, оливкової олії, цитрату до культурального середовища [9].

Утворення гіф сильно індукується глюкозою, цитратом, оливковою олією, олеїною кислотою та іншими жирними кислотами, олеїновим спиртом або триолеїном як джерелами вуглецю, а також джерелами азоту, такими як амоній, казеїн, соєвий або м'ясний екстракт. На противагу цьому, утворення гіф

пригнічується за дефіциту сульфату магнію та хлориду заліза або за наявності цистеїну чи відновленого глутатіону.

N-ацетилглюкозамін (GlcNAc) або сироватка, що використовуються як єдині джерела вуглецю, можуть індукувати утворення гіфів після 4-6 годин інкубації. Крім того, фізико-хімічні умови, такі як рН та аерація, впливають на УН-перехід. Майже нульовий рівень рН та анаеробний стрес індукують утворення гіф. Утворення гіф може бути пригнічене осмотичним та окислювальним стресами [11].

Y. lipolytica здатний утворювати біоплівку в присутності різних джерел вуглецю, включаючи алкани. Здатність утворювати біоплівки може бути важливою в природному середовищі, а також коли він росте в різних відходах [8].

Штами *Y. lipolytica* демонструють різні форми колоній, починаючи від гладких і блискучих до сильно звивистих і матових. Морфологія колонії визначається як умовами росту (аерація, джерела вуглецю та азоту, рН тощо), так і генетичним фоном штаму. Край колоній *Yarrowia lipolytica* може бути рівним, хвилястим, зубчастим або мати іншу нерегулярну форму.

Накопичення ліпідів: *Yarrowia lipolytica* має унікальну здатність накопичувати ліпіди, і це можна спостерігати у вигляді внутрішньоклітинних крапель ліпідів у клітинах. За певних умов росту накопичення ліпідів можна візуально виявити у вигляді маслянистих або жирних колоній [10].

Yarrowia lipolytica є аскоміцетними дріжджами, які володіють здатністю розкладати ліпіди та білки. Їх особливістю є також можливість росту на n-парафінах як єдиному джерелі вуглецю. [8].

Аскоспори утворюються на середовищі з дріжджового екстракту та солодового екстракту (ДСЕ) через 3-7 днів при 25 °С. Продукція аскоспор і

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						16
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

фертильність зростають, коли для комплементарного типування використовують середовище з обмеженим ростом (RG) [11].

На солодовому екстракті агару *Yarrowia lipolytica* утворює білі колонії, які залежно від штаму можуть бути зморшкуватими, м'якими, жорсткими, гладкими, тьмяними чи блискучими. Розмножується безстатево шляхом багатостороннього брунькування. Початкові клітини мають еліпсоїдальну, витягнуту чи сфероїдальну форму і зустрічаються у вигляді невеликих скупчень або пар. У присутності N-ацетилглюкозаміну тепловий стрес і ріст індують перехід від дріжджів до міцелію. Хоча культивування на вуглеводнях навпаки – зазвичай сприяє більшому утворенню дріжджових клітин. Вид має гетероталогічну природу, відомі типи спарювання А та В. Статеве розмноження здійснюється з утворенням аскоспор при культивуванні диплоїдних клітин на агарі V8 або YM. Спороношення стимулюється присутністю цитрату [8]. На відміну від *S. cerevisiae* та деяких інших дріжджів, для індукції спороношення не потрібне обмеження азоту. Оптимальне значення рН для повного спороношення становить близько 6. Найвища частота спороношення була отримана при температурі 20-30 °C в рідині або на твердих середовищах YM і V8[11].

1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

Дріжджі не можуть засвоювати нітрати та зброджувати цукри. Однак *Y. lipolytica* використовують глюкозу, N-ацетил-D-глюкозамін та цукрові спирти, такі як D-глюцитол, гліцерин, D-маніт та еритрит як джерело вуглецю. Ці дріжджі мають різний ріст на галактозі, L-сорбозі, D-рибозі, рибітолі та D-глюконаті. Крім того, вони мають слабкий або негативний ріст на саліцині та целобіозі.

Y. lipolytica використовує мало цукрів як джерела вуглецю, але однією з цікавих властивостей цих дріжджів є ріст на незвичайних джерелах вуглецю, таких як гідрофобні субстрати як n-алкани, 1-алкени, жирні кислоти, жири, олії та парафін. Ці дріжджі асимілюють поліметильовані та хлоровані алкани.

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						17
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Y. lipolytica дуже ефективно розкладає гідрофобні субстрати специфічними метаболічними шляхами в різних субклітинних компартментах. Гідрофобні субстрати поглинаються і транспортуються до місця первинного окиснення за допомогою певних морфологічних і фізіологічних модифікацій у клітинах [11]. Незалежно від джерела вуглецю, *Y. lipolytica* характеризується хорошим накопиченням селену та хрому в клітині [8].

Штами *Y. lipolytica* дикого типу виділяють суміш лимонної та ізолимонної кислот при вирощуванні на н-парафінах як джерелі вуглецю: повідомлялося про загальний вихід 130% порівняно з субстратом і співвідношенням 60:40 (лимонна до ізолимонної). Коли клітини були забезпечені монофторацетатом, ця сполука перетворювалася на монофтороцитрат, який конкурентно пригнічував аконітазу: це, у свою чергу, покращувало співвідношення лимонної кислоти до ізолимонної до 85:15 [10].

На середовищі з глюкозою або гліцерином співвідношення цитрату до ізоцитрату становило 92:8 проти 67:33 на н-парафіні. Однак внутрішньоклітинне співвідношення двох кислот було приблизно однаковим (90:10) на всіх середовищах. Крім того, обидві кислоти однаково добре секретуються в середовище для вирощування, але лише лимонна кислота повторно споживається на парафінах, тоді як жодна не використовується повторно на глюкозі [10].

Поглинання н-алканів є індукованим процесом і відбувається завдяки активному транспорту. *Y. lipolytica* містить або кілька систем поглинання алканів, специфічних до довжини або специфічні монооксигенази цитохрому P-450 [11]. Штами *Y. lipolytica*, вирощені на н-алканах у присутності обмеженої кількості тіаміну (вітамін, який не синтезується цими дріжджами, але необхідний для активності α -кетоглутаратдегідрогенази), виділяють велику кількість α -кетоглутарату. Поліметильовані та хлоровані алкани також засвоюються цим грибом [10].

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						18
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Y. lipolytica здатні використовувати органічні кислоти, такі як ацетат, лактат, малат, сукцинат і цитрат, як єдине джерело вуглецю та енергії. Дріжджі дуже ефективно ростуть на ацетаті натрію до 0,4 % концентрації, але концентрація вище 1,0 % пригнічує ріст. Пропіонат, бутират і сорбат мають інгібуючий вплив на ріст дріжджів. *Y. lipolytica* продукує желатиназу, ліпази, протеази, уреазу та кофермент Q-9. Реакція з діазонієвим синім В у цих дріжджів негативна [11].

Y. lipolytica не виробляє етанол, але використовує етанол як джерело вуглецю в концентраціях до 3%. Більш високі концентрації етанолу є токсичними. Кілька NAD^+ - і NADP^+ -залежних алкогольдегідрогеназ спостерігалися в *Y. lipolytica*. Ймовірно, існують дві NAD^+ -залежні алкогольдегідрогенази, які відрізняються субстратною специфічністю. Синтез обох ферментів не пригнічується глюкозою або індукується етанолом. Було виявлено три NADP^+ -залежні алкогольдегідрогенази, які демонстрували різні субстратні специфічності. Виникнення цих ферментів змінюється залежно від фази росту та джерела вуглецю в середовищі.

Більшість штамів *Y. lipolytica* дуже ефективно ростуть на ацетаті як єдиному джерелі вуглецю. Концентрації до 0,4% ацетату натрію добре переносяться, більш високі концентрації сповільнюють швидкість росту, а концентрації вище 1,0% пригнічують ріст.

Y. lipolytica використовує лізин і як джерело азоту, і як джерело вуглецю через N -6-ацетилізин-5-аміновалератний шлях. Диплоїдні штами утворюють спори на твердому або рідкому повному середовищі, коли глюкоза вичерпується. Найвищі частоти споруляції були отримані з багатьма штамми, якщо 1,5% цитрат натрію використовувався як джерело вуглецю при температурах від 20°C до 30°C.

Деякі природні ізоляти *Y. lipolytica* досить добре утворюють спори після

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						19
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

спарювання, але лише інбредні штами утворюють високу частку повних тетрад і мають задовільний рівень проростання спор [10]. Ці дріжджі гетероталічні, з двома типами спарювання Mat A і Mat B, а природні ізоляти в більшості випадків гаплоїдні. Частота спарювання двох природних мат-сумісних штамів дуже низька, але отриманий диплоїдний стан є стабільним в лабораторних умовах вирощування. Такі гібриди демонструють дуже низьку плодючість, проблему, яку вдалося вирішити за допомогою програм інбридингу, що дозволило створити перші генетичні карти [12].

Y. lipolytica може використовувати різні види відходів або побічні продукти, такі як гліцерин, алкани, жири тваринного або рослинного походження, жирні ефіри, соап-стоки, вільні жирні кислоти, побічні продукти бензину та відходи біопалива, для виробництва широкого спектру біодоступних поживних сполук. *Y. lipolytica* може розкладати декілька гексоз, наприклад, глюкозу, фруктозу, галактозу та манозу. Дріжджі не утилізують сахарозу і лактозу. Однак один ізолят із ґрунту (*Y. lipolytica* B6) може розщеплювати лактозу. Дріжджі також мають повний генетичний шлях для використання ксилози та арабінози. Коли глюкоза або гліцерин відсутні, *Y. lipolytica* може використовувати етанол, оцтову, масляну, лимонну, молочну, яблучну, пропіонову та янтарну кислоти як джерела вуглецю та енергії. Молочну кислоту також може використовувати як субстрат, коли в культуральному середовищі відсутній азот (тобто вільні амінокислоти). Дріжджі не засвоюють інозит і нітрати [8].

Будучи олійними дріжджами, *Y. lipolytica* може природним чином накопичувати ліпіди до 30-50% сухої маси клітини, залежно не лише від генетичного фону кожного ізоляту дикого типу, але й від використовуваного джерела вуглецю та умов зростання. Що стосується умов росту, відомо, що накопиченню ліпідів у цих дріжджах протягом тривалого часу сприяє азотне голодування. [12]. Накопичення ліпідів, ймовірно, посилюється багатьма

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						20
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

виступами на поверхні клітини, що сприяє поглинанню гідрофобних субстратів із середовища. Інтерналізовані аліфатичні ланцюги потім розщеплюються, щоб задовольнити потреби в зростанні, або накопичуються в незмінному або модифікованому вигляді. Ці ліпіди утворюють запасну ліпідну фракцію, яка складається здебільшого з триацилгліцеринів (тригліцеридів) і стеринових ефірів [13]. Однак більш примітно, коли використовуються гідрофобні субстрати, виграючи як від ефективного поглинання ліпідів із середовища, так і від ефективного шляху синтезу *ex novo* (біомодифікації) [12].

При вирощуванні на нежирних субстратах (таких як сирий гліцерин) більшість штамів *Y. lipolytica* дикого типу не здатні накопичувати високі рівні ліпідів, навіть в умовах обмеженого вмісту азоту, оскільки ті, що утворюються на ранніх стадіях росту, піддаються деградації на користь інших сполук, таких як органічні кислоти та поліоли.

Запасні ліпіди *Y. lipolytica* складаються здебільшого з триацилгліцеринів та стеринових ефірів, а не з вільних жирних кислот і накопичуються в спеціальному субклітинному відділі, ліпідному тілі. Ці ліпіди можуть містити до 80% ненасичених жирних кислот. Примітно, що *Y. lipolytica* є олійними дріжджами з найвищим відомим відсотком лінолевої кислоти, а саме понад 50% [12].

На відміну від більшості інших геміаскоміцетних дріжджів, *Y. lipolytica* є obligatним аеробом, для якого концентрація кисню є фактором, що обмежує ріст [12]. Поглинання кисню було посилено додаванням штучних переносників кисню, таких як перфторвуглеці (ПФУ), до живильного середовища. Киснева проникність збільшується в 10-20 разів у присутності ПФУ. Зі збільшенням їх концентрації та швидкості перемішування спостерігається вища деградація гідрофобного субстрату, питома швидкість росту, продукція ліпази та біомаси [11].

Для більшості штамів межа температури знаходиться в діапазоні від 32 до

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						21
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

34 °C, хоча деякі можуть досягати 37 °C. Більшість штамів можна вважати психротрофними, оскільки вони демонструють залишковий ріст при зберіганні температури 4–5 °C. Однак бажана температура росту знаходиться в діапазоні від 25 до 30 °C. *Y. lipolytica* здатний рости при широкому діапазоні pH: більшість штамів можна культивувати при pH від 3,5 до 8,0, а деякі можуть переносити нижчі (2,0) або навіть дуже високі pH (9,7) [12].

Для виробництва збагаченої білком біомаси штами культивують як у рідких, так і на твердих відходах, головним чином промислових субстратах, таких як гліцерин, відходи біопалива та твердий жир, а також сільськогосподарських відходах, таких як житня солома, висівки скату та вівса та гідролізати соєвих бобів. У випадку субстратів, що містять клітковину, наприклад, інулін або бульби топінамбура, необхідно використовувати рекомбінантні штами (мутанти) через те, що *Y. lipolytica* не здатний продукувати целюлази та геміцелюлази; таким чином, він не використовує волокна в сільськогосподарських або лісових відходах [8]. Необроблені субстрати, включаючи сільськогосподарські, харчові та хімічні відходи, часто містять інгібуючі сполуки, такі як органічні кислоти, феноли та метали, які можуть перешкоджати клітинному метаболізму. *Y. lipolytica* має добру толерантність до більшості інгібіторів. Він переносить високі концентрації солі (25% солі, 12% NaCl), органічних кислот (3 % оцтової кислоти і метанол (4%, частий забруднювач сирого гліцерину). Крім того, *Y. lipolytica* використовувався для детоксикації алканів, ароматичних, нітроароматичних, галогенованих орґанофосфатів і металів. Через нативні позаклітинні лаккази фенольні сполуки, отримані з лігніну, можуть окислюватися, що робить *Y. lipolytica* більш стійким до них. Широка толерантність *Y. lipolytica* є чудовою властивістю для промислових біопроеесів, що сприяє перетворенню відновлюваних субстратів у сполуки з доданою вартістю. Крім того, ця особливість також робить *Y. lipolytica* хорошим господарем для програм, пов'язаних із навколишнім середовищем, таких як біоремедіація, і, таким чином, він використовувався як

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						22
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

біоабсорбент для очищення стічних вод і твердих відходів [14]. Відомо також, що ці дріжджі здатні адсорбувати атоми металів, тому їх було запропоновано для біоремедіації відходів, що містять важкі метали, такі як Cd, Fe, Cr, Ni, Cu і Zn.

Отже, ключові ознаки *Y. lipolytica* : нездатність ферментувати кофермент Q-9, цукри, нездатність засвоювати поліолів, ряд спиртів, поліолів та органічні кислоти; нездатність виробляти протеази, позаклітинні ліпази та уреази. Переважно галактоза складає цукор клітинних стінок, а жирні кислоти, що містяться у структурних ліпідах мембран, включають лінолеву кислоту [8].

1.6 Поширення в природі

Y. lipolytica — це аскоміцетові дріжджі, які стали об'єктом досліджень завдяки своїй високій ліполітичній та протеолітичній здатності. Відповідно до цих рівнів секретованої ферментативної активності, ізоляти дикого типу цих дріжджів зазвичай походять із середовищ, багатих ліпідами та/або білками [12]. Наприклад в продуктах з високим вмістом жиру та білка: молочні продукти, такі як сир, особливо блакитний сир і сир чеддер, молоко, вершки, кефір, йогурт, масло та маргарин, а також ферментовані м'ясні продукти, наприклад, продукти з м'яса птиці, шинка, яловичина, свинячий жир, ковбаси, солоний бекон, риба, різні види ферментованих ковбас, таких як салямі, іспанські ферментовані ковбаси (чорізо), також в таких продуктах як сік, сидр, фрукти, фруктовий концентрат, майонез, морепродукти та вино. Така поява *Y. lipolytica* корелює з його здатністю ефективно використовувати широкий спектр джерел вуглецю (наприклад, алкани, жирні кислоти, жири та олії), для яких він має специфічні метаболічні шляхи [8].

Штами *Y. lipolytica* на сирах та інших продуктах харчування викликають рідкісні легкі інфекції, які або самообмежуються, або легко піддаються лікуванню у пацієнтів з ослабленим імунітетом та госпіталізованих пацієнтів [11].

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						23
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Крім того, дріжджі були виділені з організму здорової людини. Тому *Y. lipolytica* вважається нормальною мікробіотою людини, що належить до сапрофітів у дихальній системі дорослої людини, також його знаходять у ротовій порожнині. Він виявляється в тканинах молочної залози, деяких шкірних вузликах і травному тракті. Природне походження живих дріжджів підтверджує їх безпеку. Дріжджі непатогенні для людини і тварин. Живі дріжджові клітини в екстремальних випадках можуть рідко викликати опортуністичну фунгемію виключно в осіб з ослабленим імунітетом з основними захворюваннями та тих, хто має катетери через їх здатність утворювати біоплівки. Таким чином, *Y. lipolytica* вважається безпечним, а різні процеси виробництва на основі дріжджів були класифіковані Управлінням з контролю за харчовими продуктами та ліками (FDA) як загальноновизнані як безпечні (GRAS). Він також класифікується як мікроорганізм рівня біобезпеки (BSL) 1 Службою охорони здоров'я (Вашингтон, округ Колумбія, США), а також визнаний «мікроорганізмом із задокументованим використанням у харчових продуктах» Міжнародною молочною федерацією (IDF) та Європейська асоціація харчових та кормових культур (EFFCA) [8], [12].

Зростання в широкому діапазоні значень солоності та pH і унікальна здатність переносити важкі метали дозволили цим дріжджам диверсифікувати та колонізувати спеціальні ніші, такі як каналізація та промислові стічні води, забруднений нафтою ґрунт та морська вода, забруднені важкими металами ґрунти та водне середовище, озерні відкладення, відкладення нафтопереробних заводів, альпійські та пустельні ґрунти і навіть солевиділяючі листя посушливих рослин. Прилипання до поверхні є важливим першим кроком у мікробній колонізації нових середовищ існування. Цікаво, що *Y. lipolytica* має найвищу гідрофобність і, отже, високу адгезію серед досліджених видів дріжджів. Ця

унікальна здатність у поєднанні з розвитком гіф сприяє екологічній взаємодії, включаючи симбіоз з рослинами. Крім того, *Y. Lipolytica* може колонізувати внутрішні тканини рослини-господаря, не викликаючи жодних

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						24
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

симптомів захворювання, будучи «ендофітом». Ендофіти взаємодіють з рослиною-хазяїном, сприяючи росту рослини, покращуючи імунітет рослини, синтезуючи важливі біоактивні метаболіти.

Yarrowia lipolytica також була знайдена в таких екзотичних екологічних нішах, як кишківник сімейства наземних жуків *Silphidae* , які споживають мертвих хребетних і безхребетних і в кишечнику різних хижих жуків. Деякі морські штами *Y. lipolytica* можуть колонізувати кишечник морських тварин [9].

Таким чином, цей вид демонструє досить повсюдне поширення як у природному світі, так і в екстремальних середовищах, створених людиною. Екологічне значення *Y. lipolytica* був розглянутий зовсім недавно, встановлюючи ці дріжджі як екологічно чистий організм, здатний розвивати симбіоз з деякими комахами (жуками) і рослинами (мікробні ендофіти, мікоризи) [12]. Така екологічна повсюдність вказує на екологічну значущість *Y. lipolytica* , його метаболічну різноманітність і пристосованість до широкого діапазону фізичних і хімічних умов [9].

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика кінцевого продукту

$C_{20}H_{30}O$ – хімічна формула ретинолу. Структурна формула зображена на рис.2.1.

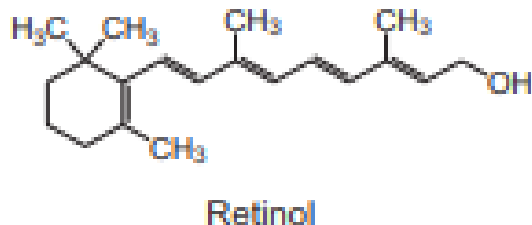


Рис.2.1. Структурна формула ретинолу

Ретинол (транс-ретинол; вітамін А1) та його похідні називаються ретиноїдами. Його метаболіти включають ретинальдегід/ретиноаль і ретиноеву кислоту. Вони беруть участь у імунній функції, репродукції, зору, клітинному зв'язку та диференціації. Вітамін А надходить з їжею в 2 форми: попередньо утворений вітамін А (ретинол) і провітамін А (каротиноїди), і обидві форми вітаміну А зберігаються в печінці. Кератиноцити зберігають і перетворюють більшу частину вітаміну А у вигляді ретинілових ефірів у шкірі [15].

Ретинол, що вивільняється з печінки, транспортується в кровообіг у комплексі з ретинолзв'язуючим білком плазми. Циркулюючий ретинол поглинається клітинами шкіри шляхом пасивної дифузії. У шкірі людини весь транс-ретинол метаболізується принаймні до чотирьох важливих продуктів: ретинілових ефірів, 14-гідрокси-4, 14-ретро-ретинолу, повністю транс-3,4-дидегідроретинолу (та його складного ефіру) і tRA. Серед цих трьох метаболітів рівень ретинілового ефіру є найвищим. Ретинілові ефіри функціонують як форма зберігання ретинолу. При їх гідролізі утворюється вільний ретинол, який

					ДП 9204. 00.000 ПЗ								
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата									
Розробив.	Вітович Я.А.				РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА				Стадія	Аркуш	Аркушів		
Консульт.	Шибєцький В.Ю.										26	109	
Керівник	Литвинов Г.С.												
Затвер.													
					КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ								

піддається подальшому метаболізму [16].

Ретинол є поліненасиченою сполукою і, як такий, чутливий до окисної деградації, а також до цис-транс-ізомеризації. Спорідненими препаратами є повністю транс-ретиноева кислота (третиноїн) і 13-цис-ретиноева кислота (ізотретиноїн). Ретинол, третиноїн та ізотретиноїн є поліненасиченими сполуками з численними подвійними зв'язками С-С і, як такі, піддаються автоокисленню. Ретинілпальмітат (складний ефір ретинолу і пальмітинової кислоти) менш схильний до автоокислення, ніж вільний ретинол, тому використовується у водних парентеральних і пероральних розчинах [17].

Ізомеризація зв'язку може бути викликана теплом і йодом. Ретинол чутливий до кисню, тепла, легких і важких металів. Тепло і сліди металів прискорюють розкладання ретинолу киснем і світлом. Високий рівень освітлення може викликати полімеризацію. Ретинол нестійкий з кислотами, які викликають перебудову зв'язків до ретровітаміну А, ізомеризацію та дегідратацію до ангідровітаміну А, іноді з наступним додаванням розчинника. Ретинол також нестійкий до лугу в присутності кисню (на відміну від ефіру пальмітату) [18].

2.2 Схема хімічних перетворень

Ретиноїди складаються з ізопентенілдіфосфату (IPP) і диметилалілдіфосфату (DMAPP), які є загальними п'ятивуглецевими будівельними блоками всіх ізопреноїдів. Будівельні блоки IPP і DMAPP, як правило, синтезуються за допомогою мевалонатного (MVA) шляху у еукаріот (рис.2.2) [1].

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						27
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

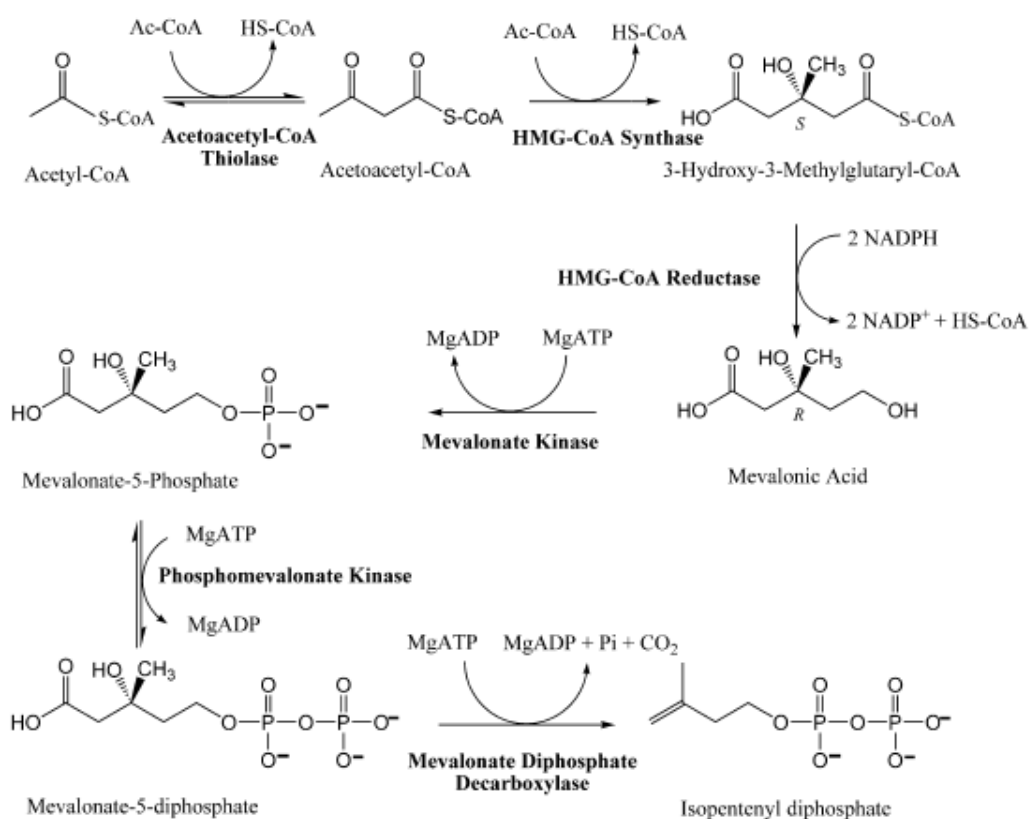


Рис.2.2. Мевалонатний (MVA) шлях біосинтезу ізопентенілдіфосфату. [19]

Ацетил-КоА (цикл Кребса) піддається конденсації з іншою молекулою ацетил-КоА з утворенням ацетоацетил-КоА (рис2.3):

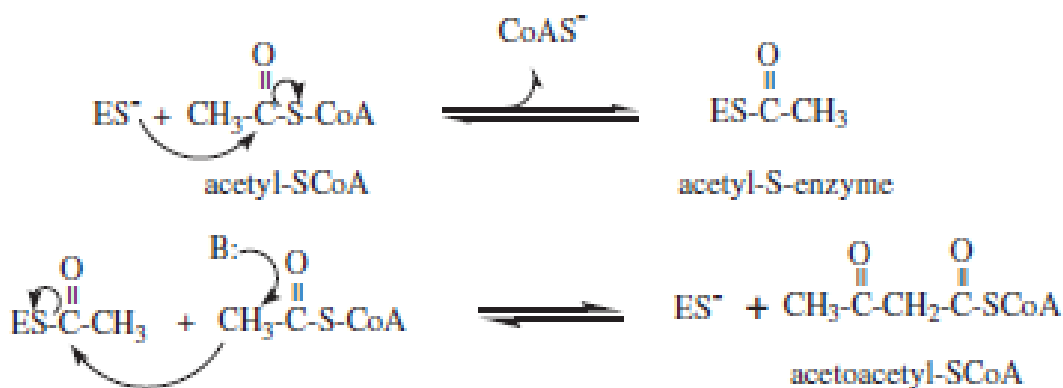


Рис.2.3. Хімічні стадії біосинтетичної ацетоацетил-КоА тіолазної реакції [19].

Ацетоацетил-КоА конденсується з іншою молекулою ацетил-КоА, утворюючи 3- гідрокси-3- метилглутарил -КоА (HMG-КоА) (рис2.4):

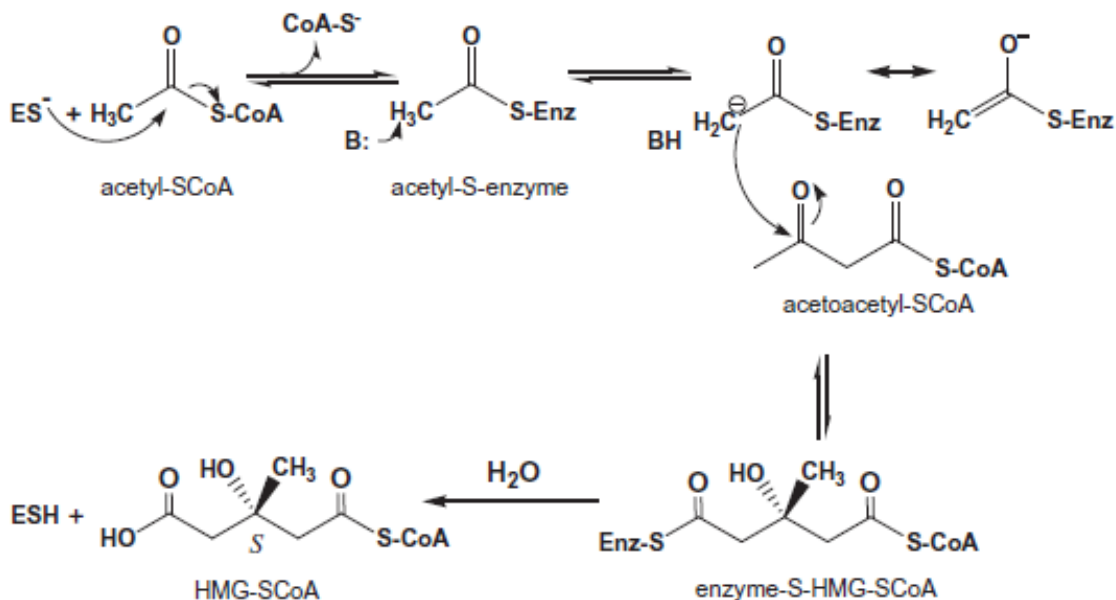
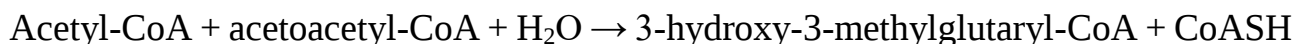


Рис.2.4. Хімічні етапи біосинтезу ГМГ-КоА [19].

HMG- КоА відновлюється до мевалонату за участю НАДФН (рис.2.5):

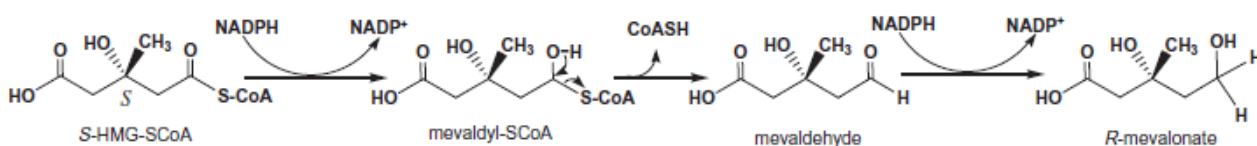
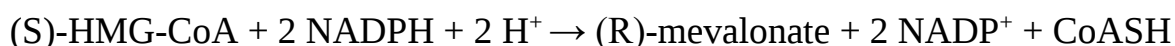


Рис.2.5. Хімічні стадії реакції HMG-КоА-редуктази [19].

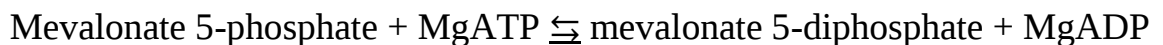
Мевалонат фосфорилується в позиції 5-ОН для утворення мевалонат-5-фосфату (також називається фосфомевалоновою кислотою) (рис.2.6):

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата



Рис.2.6. Хімічні етапи біосинтезу мевалонат-5-фосфату [19].

Мевалонат-5-фосфат фосфорилується для утворення мевалонат-5-дифосфату. Для цього процесу використовується 1 молекула АТФ:



Мевалонатдифосфатдекарбоксилаза каталізує АТФ-залежне декарбоксилювання мевалонат-5-дифосфату (MVAPP) з утворенням ізопентеніл-5-дифосфату (IPP) (рис.2.7):

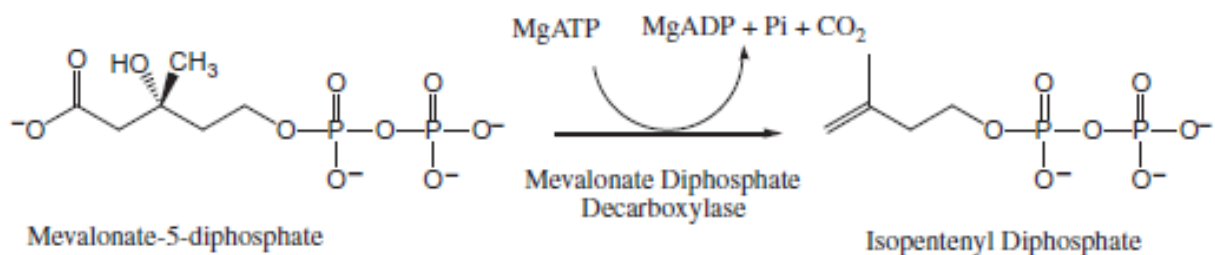


Рис.2.7. Хімічні етапи біосинтезу ізопентеніл-5-дифосфату [19].

Ізопентенилдифосфат (IPP) ізомеризується до диметилалілдифосфату (DMAPP).

Диметилалілпірофосфат конденсується з 3 молекулами ізопентенілпірофосфату за каталізом фарнезилпірофосфат-синтази (FPPS) для утворення фарнезилпірофосфату (FPP). Фарнезилпірофосфат претворюється в геранілгеранілпірофосфат (GGPP) за допомогою GGPP-синтази.

Наступним кроком є конденсація двох молекул геранілгеранілдифосфату (GGDP) за участю ферменту фітоенсинтази. Це призводить до утворення фітоїну.

Фітоїн піддається послідовним десатураціям і ізомеризаціям за участю ферментів десатурази і ізомерази, що призводить до утворення лікопену. Лікопеїн має довгий полієновий ланцюг і служить прекурсором для синтезу каротиноїдів.

Лікопеїн піддається послідовній десатурації за допомогою ферменту лікопен- β -циклази, яка перетворює лікопен в бета-каротин. Цей процес включає додаткові подвійні зв'язки у молекулі, що призводить до формування характерної структури бета-каротину (рис.2.8):

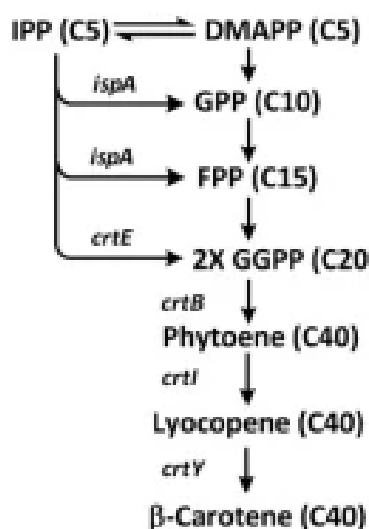


Рис.2.8. схема перетворень бета-каротину [1].

Розщеплення β -каротину BCM(D)O є початковим ключовим етапом синтезу різних ретиноїдів з β -каротину. Реакції розщеплення можна класифікувати як центральні та ексцентричні [1]. Спочатку β -каротин 15-15'-монооксигеназа розщеплює β -каротин за центральним подвійним зв'язком, утворюючи епоксид. Цей епоксид потім атакує вода, утворюючи дві гідроксильні групи в центрі структури. Розщеплення відбувається, коли ці спирти окислюються до альдегідів за допомогою NADH. Ця сполука називається ретиналем [20].

У центральному розщепленні BCM(D)O розщеплює центральний подвійний зв'язок (15, 15') полієнового ланцюга β -каротину з утворенням двох молекул ретиналю.

При ексцентричному розщепленні BCM(D)O випадковим чином розщеплює будь-який подвійний зв'язок у полієновому ланцюзі, утворюючи β -апокаротиналі з різною довжиною бічного ланцюга. У реакціях розщеплення BCMO використовує атом кисню, отриманий з молекулярного кисню та води через епоксидний проміжний продукт, тоді як BCDO використовує молекулярний кисень через нестабільний діоксетановий проміжний продукт.

Ретиналь, отриманий з каротиноїдів, може бути зведений до активної форми ретинолу за участю ферменту ретинолдегідрогенази.

У реакції перетворення ретиналю на ретинол група альдегідна ($-\text{CHO}$) в ретиналі зводиться до групи гідроксильної ($-\text{OH}$) в ретинолі. При цьому NADPH виступає як донор водню і зводить альдегідну групу до гідроксильної, перетворюючись в NADP^+ .

Також ретиналь перетворюється на ретиноєву кислоту за участі ретинальдегідрогенази (рис.2.9) [1]:

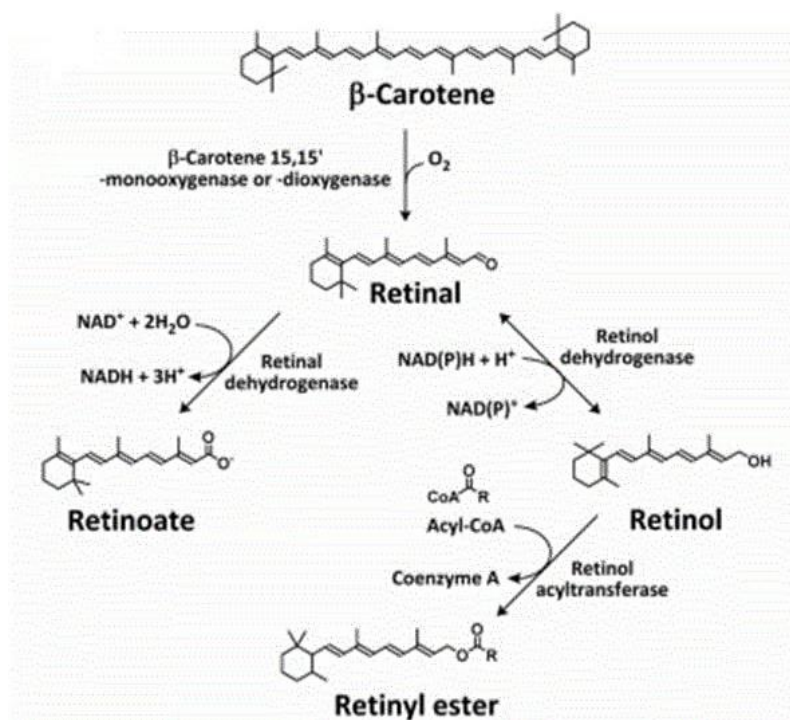


Рис.2.9. Перетворення β -каротину в ретинол [1].

2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Чистота кінцевого продукту (повністю транс-ретинолу) – 95%. Інші складники ретиноїдної суміші – цис-ізомери [18].

2.4 Методи очистки цільового продукту

Спочатку у процесі очищення вітаміну є відокремлення культурного розчину від біомаси шляхом проведення сепарації. Це може включати застосування спеціальних методів обробки культури, таких як зміна рН рівня або підвищення температури. Для сепарації використовуються різні методи, такі як флотація, фільтрація і центрифугування, і в деяких випадках можуть застосовуватись комбінації цих методів. Для осадження біомаси, яка містить вітамін, часто використовують центрифуги-сепаратори, де біомаса осідає на стінки обертового циліндра.

Другим етапом у процесі очищення цільового продукту є руйнування клітин, що досягається за допомогою фізичних, хімічних і хіміко-ферментативних методів.

Фізичне руйнування має найбільше промислове значення і включає різні процеси, такі як: продавлювання через вузьку отвір під високим тиском, осмотичний шок, трясіння зі скляними кульками, заморожування та розморожування, ультразвукове оброблення, стиск клітинної суспензії з наступним різким зниженням тиску (декомпресія), розмелювання в ступці, механічне руйнування за допомогою обертових лопатей або вібраторів - метод, який широко використовується в пілотних і промислових установках, розмелювання замороженої клітинної маси.

Фізичні методи руйнування є економічно більш вигідними в порівнянні з хімічними та хіміко-ферментативними методами. При використанні хімічних та хіміко-ферментативних методів є можливість провести обережне та вибіркове

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						33
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

руйнування клітинної стінки.

Осадження розчинених речовин можливе за фізичного впливу (нагрівання, охолодження, розведення або концентрування розчину) або хімічних реакцій, які переводять виділяємий продукт у малорозчинний стан.

Екстракцію можна розділити на твердо-рідкофазну, при якій продукт з твердої фази переходить в рідку, і рідко-рідкофазну, при якій продукт переходить з однієї рідкої фази в іншу.

До твердо-рідкофазної екстракції відноситься замочування твердого зразка у воді з метою виділення розчинних речовин, наприклад, металевих солей з руд, підданих бактеріальній обробці, або розчинних продуктів з субстратної маси при твердофазному культивуванні.

Рідко-рідкофазна екстракція органічним розчинником часто застосовується для виділення з культурної рідини каротиноїдів, вітамінів, ліпідів, антибіотиків. Екстрагування проводять фенолом та його похідними (крезол, інші алкілфеноли, галогеніди), специфічним екстрагуючим розчинником є бензиловий спирт, особливо в лужних умовах.

Методи холодової екстракції (криоекстракції) дозволяють повністю уникнути нагрівання, яке може бути небезпечним для багатьох цінних речовин. Екстракцію здійснюють розчинниками, які киплять за низьких температур і перебувають у газоподібному стані при кімнатній температурі.

Адсорбція - це метод екстракції, при якому тверде тіло виступає як екстрагуючий агент. Він полягає у зв'язуванні речовини з поверхнею твердого тіла з рідкої або газової фази. Традиційними адсорбентами є деревне вугілля, глини з розвиненою пористою поверхнею. За допомогою адсорбції з культурної рідини виділяють антибіотики та вітаміни.

Сучасні методи розділення речовин включають хроматографію,

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						34
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

електрофорез, ізотахофорез, електрофокусування, які ґрунтуються на принципах екстракції та адсорбції.

Розділення речовин за допомогою хроматографії пов'язане з їх нерівномірним розподілом між двома нерозмішуваними фазами. Розрізняють паперову, тонкослойну та колонкову хроматографію. У паперовій або тонкослойній хроматографії одна з нерозмішуваних фаз служить рухливим розчинником, наприклад, бутанолом, а інша, нерухома фаза - волокна паперу або частинки покривного шару, які містять силікагель або інший матеріал. При колонковій хроматографії рухлива фаза - розчинник, що протікає через колонку, а нерухома фаза - наповнюючий колонку адсорбент, зазвичай гранульований гель. Роздільна суміш вводиться в контакт з рухливою та нерухомою фазами.

Поміж хроматографії перспективними методами розділення речовин для біотехнології є електрофорез та його модифікації, наприклад, ізоелектрична фокусування. Роздільну суміш поміщають у потужне електричне поле, яке рухає йонізовані компоненти. Напрямок і швидкість руху іонів визначаються знаком їх заряду та іншими характеристиками, які в сукупності називають електрофоретичною рухливістю. Різниця у електрофоретичній рухливості дозволяє просторово розділити компоненти суміші. У сучасних варіантах електрофорезу, як і в хроматографії, використовують пластинки або колонки з наповнювачем (агарозою, поліакриламідом, сефарозою, оксиапатитом), що утворює гель [21].

Відомий також спосіб очищення термолізом: Термічна обробка та фільтрація міцелію є методами очищення ретинолу. Після завершення культивування мікроорганізму проводиться теплова обробка культурального розчину, відома як термоліз. Цей процес має на меті інактивацію мікроорганізму та ферментів шляхом нагрівання культурального розчину до 85 ± 5 °C та утримання його при цій температурі не менше 15 хвилин. Після термолізу, для відокремлення міцелію від розчину, використовується фільтрація. Міцелій є

важкопрофільтрованим слизьким осадом, тому для забезпечення ефективної фільтрації використовують стиснений азот з тиском 3-6 МПа. Цей процес допомагає зменшити вміст вологи в міцелії та запобігає окисненню ретинолу киснем у повітрі [22].

2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Метаболіти вітаміну А метаболіти необхідні для ембріонального розвитку, клітинної диференціації, росту, розмноження, гомеостазу дорослої тканини, зору та підтримки імунної системи. Ретиноїди опосередковують багато своїх плеiotропних ефектів, регулюючи активацію або інгібування транскрипції генів. Вони регулюють експресію багатьох генів, які беруть участь у їх власному транспорті та метаболізмі. Гени для різних підтипів ретиноїдних рецепторів, клітинних білків, що зв'язують ретинол (CRBP) I і II, і клітинного білка, що зв'язує ретиноеву кислоту II (CRABP II), регулюються або повністю транс-ретиноевою кислотою (RA), або 9-цис-RA. Ці метаболіти вітаміну А виявляють гормональну дію, зв'язуючись зі своїми ядерними рецепторами, які взаємодіють з елементами відповіді ДНК у цільових генах, впливаючи на транскрипцію генів. Ретиноїдні рецептори є членами надродини ядерних рецепторів стероїдів/тиреоїдів/ретиноїдів. Існує два різних сімейства ядерних ретиноїдних рецепторів: рецептори ретиноевої кислоти (RAR) і ретиноїдні X рецептори (RXR). Ці ядерні рецептори можуть діяти як інгібітори або активатори транскрипції. Механізм, за допомогою якого ці регуляторні властивості поширюються, полягає в залученні додаткових білків до ядерного рецептора. За відсутності ліганду, такого як all-trans RA, корепресорні білки зв'язуються з ретиноїдними рецепторами та викликають інгібування транскрипції цільового гена. І навпаки, зв'язування ліганду викликає конформаційну зміну в рецепторі так, що корепресорні білки вивільняються, а коактиваторні білки залучаються до ретиноїдного рецептора [23].

На нормальній шкірі людини ретинол викликає потовщення епідермісу та посилює експресію мРНК і білків CRABP II і CRBP, як і ретиноева

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						36
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

кислота. Ретинол демонструє лише мінімальні ознаки еритеми та подразнення на відміну від третиноїну. Також викликає значно меншу трансепідермальну втрату води, еритему та лущення, ніж ретиноева кислота. Він пригнічує УФ-індукцію ММП і стимулює синтез колагену в фотостаріючій шкірі. Спостерігається значне зменшення дрібних зморшок під час лікування засобами з ретинолом. Застосування ретинолу протягом 7 днів знижує експресію ММР (матричної металопротеїнази), колагенази та желатинази з супутнім збільшенням росту фібробластів і синтезу колагену в досліджуваних зразках тканини. Таким чином, можна зробити висновок, що ретинол повинен бути ефективним у лікуванні старіння та фотостаріння [24].

Користь ретинолу, як засіб для шкіри також полягає в тому, що він сприяє виробленню колагену, що є основним компонентом структури шкіри. Це може покращити еластичність та міцність шкіри. Ретинол має властивості антиоксиданта, що допомагає захищати клітини шкіри від пошкоджень, спричинених вільними радикалами та окислювальними стресами. Він може допомогти в зменшенні вироблення меланіну, що відповідає за пігментацію шкіри. Це може мати позитивний вплив на вирівнювання тону шкіри та зменшення гіперпігментації [16]. Він впливає на поверхневі ліпіди і підвищує здатність шкіри до регенерації [25].

Ретиноїди впливають на кілька репродуктивних подій, включаючи розвиток фолікулів, дозрівання ооцитів і ранній ембріональний розвиток. Введення ретинолу або β -каротину запобігає резорбції плоду у щурів, збільшує кількість пологів у кроликів і збільшує розмір посліду у свиней. Введення ретинолу вівцям у поєднанні із суперовуляцією з подальшим природним обслуговуванням покращує здатність ембріонів на стадії 1–4 клітини та морули, зібраних із яйцепроводу та матки відповідно, розвиватися до стадії бластоцисти при культивуванні *in vitro*. У великої рогатої худоби ін'єкція ретинолу покращила передбачувану якість ембріонів, зібраних у тварин із суперовуляцією [26].

Ретинол в організмі перетворюється на ретиноеву кислоту та ретиналь, які беруть участь у регуляції ряду функцій. Найбільш детально вивчено участь вітаміну А в зоровому акті. Світло, яке падає на сітківку, адсорбується і трансформується пігментами сітківки в іншу форму енергії. В сітківці людини міститься 2 типи рецепторних клітин: палички, які реагують на слабе освітлення, та колбочки, які реагують на гарне денне.

У паличках наявний зоровий пігмент – родопсин. Він є специфічним білком, пов'язаним з альдегідною формою вітаміну А - цис-ретиналем. Колбочки містять йодопсин. Обидва пігменти - складні білки, що відрізняються своєю білковою частиною. Як кофермент обидва білки містять 11-цис-ретиналь, альдегідне похідне вітаміну А, що утворюється у відповідь на світло, відновлюється у фоторецепторі до ретинолу, а потім переноситься до пігментного епітелію сітківки (RPE), де він естерифікується до жирної кислоти.

У темряві відбувається зворотний процес – синтез родопсину. Для цього необхідно транс-ретиналь, що утворився на світлі, перетворити на цисформу — це здійснює фермент ізомеразу. Транс-ретиналь може також перетворюватися на транс-ретинол. Ця реакція відновлення альдегідної форми вітаміну А в спиртову протікає за участю НАДН-залежної дегідрогенази. Транс-ретинол, надходячи зі струмом крові до печінки, ізомеризується в цис-ретинол. Цис-ретинол окислюється за участю НАД⁺ - залежної дегідрогенази в цис-ретиналь, що використовується для синтезу зорового пурпуру родопсину. У випадках, коли вказані механізми порушуються, може «куряча сліпота» [27], [28].

Вітамін А виявляє тропність до епітеліальної тканини; він також регулює диференціювання та поділ інших швидко проліферуючих тканин - сперматогенного епітелію, плаценти, хряща та кісткової тканини. Він необхідний для нормального зростання та диференціювання тканин ембріона та молодого організму.

Є дані про те, що ретинол необхідний для біосинтезу поліаденілової РНК, що бере участь у біосинтезі білків у клітині. Виражений вплив на хрящову та

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						38
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

кісткову тканину пояснюється участю вітаміну А у біосинтезі хондроїтинсульфату у клітинах хряща.

Вітамін А прийнято називати вітаміном антиоксидантної дії. Так, показано його участь у реакціях дозрівання епітелію: він запобігає його кератинізації. Посилення кератинізації епітелію (загибель епітеліальних клітин) призводить до його посиленого злущування, розвивається дерматит. Вітамін А сприяє підтримці SH-груп у відновленому стані, тобто. цим перешкоджає кератинізації епітелію. Антиоксидантна дія вітаміну А проявляється в тому, що він здатний значно посилювати антиоксидантну дію токоферолу. Він разом із вітамінами Е та С сприяє включенню Se до складу глутатіонпероксидази – найважливішого ферменту антиоксидантного захисту [27].

Вітамін А необхідний для нормального розвитку діафрагми, порушення передачі сигналів ретиноїдів може сприяти етіології захворювання людини. Існує взаємозв'язок між низьким рівнем ретинолу в пуповині та рівнем RBP і CDH у новонароджених. Грижа діафрагми спостерігалася як частина раннього синдрому дефіциту вітаміну А, і з'являється при 100% пенетрантності у ембріонів VAD з ревматоїдним артритом, що мають недостатню ревматоїдну артрит після розвитку E10.5, тоді як нормальна діафрагма виникає, якщо мати після цього вживає необхідну кількість ретинолом [29].

Виснаження ретиноїдів призводить до дисрегуляції функцій Т-лімфоцитів, порушення відповіді антитіл на регульовані Т-клітинами антигени та зниження неспецифічної імунної відповіді. Також за деяких обставин ретиноїди можуть посилити імунну відповідь [30].

РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

Геном розміром 20,5 Mb містить шість хромосом розміром від 2,6 до 4,9 Mb, містить 6703 генів [31]. Вміст G/C, що становить у середньому 49% і близько 53% у генах, і частка генів, що містять інтрони, 15%, є разюче вищими, ніж для інших дріжджів, як і розмір самого геному.

Серед дріжджів *Y. lipolytica* представляє атипові одиниці рибосомної ДНК з декількома кластерами генів рРНК, розкиданими по різних хромосомах (шість кластерів на чотирьох хромосомах). Крім того, ген 5S РНК не включений до цієї одиниці рДНК, але присутній у вигляді окремих копій, розкиданих по геному. Ці характеристики, такі як шлях котрансляційної секреції, згаданий вище, ближчі до характеристик ссавців, ніж до характеристик інших дріжджів, що підтверджує ексцентричну філогенетичну позицію *Y. lipolytica* на основі порівняння послідовностей рДНК 18S і 26S [32].

На диморфний перехід впливають гени (*RAC1* і *ZNC1*) і фактори транскрипції, такі як HOY1, який кодує фактор транскрипції гомеобоксу-білка, CLA4, який кодує протеїнкіназу та ген MNY1, який має домен C2H2-zincfinger, ДНК-зв'язуючий домен на С-кінці. Транскрипція генів *YIRAC1* (кодує білок G сімейства Rho) збільшується під час росту міцелію, тоді як *ZNC1* (кодує білок із 782 амінокислот, який містить ДНК-зв'язуючий домен цинкового пальця грибового типу та домен лейцинової застібки) транскрипція підвищується під час росту дріжджів.

Дослідження повного геному дріжджів *Y. lipolytica* у присутності генів, що кодують гомологи відомих білків, які зв'язують теломер, виявили відсутність аналогів типових дріжджових теломерних факторів, що містять домен Myb,

					ДП 9204. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив.	Вітович Я.А.						40	109
Консульт.	Шибєцький В.Ю.					КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Керівник	Литвинов Г.С.							
Затвер.								

включаючи Rap1 або Taz1. Замість цього було ідентифіковано ген YALI0D10923g, що кодує білок, що містить два домени Myb, демонструючи високий ступінь подібності до домену Myb людських теломерних білків TRF1 і TRF2 і гомологічний важливому дріжджовому білку Mug152 поділу, експресія якого підвищується під час мейозу.

Мітохондріальний геном *Y. lipolytica*, кільцева молекула ДНК розміром 47,9 кб, кодує 11 субодиниць дихального ланцюга, три субодиниці АТФ-синтази, малі та великі рибосомальні РНК і 27 функціональних тРНК. Він складається з генів, перерваних 17 інтронами, що належать до А+Т-збагачених послідовностей, які чергуються з потенційно транспонованими кластерами GC [9]. Він містить сім субодиниць комплексу I (ND1-6, ND4L), однієї субодиниці комплексу III (апоцитохром *B*), три комплексні IV субодиниці (I, II, III), три комплексні V субодиниці (6, 8, 9) і велика і мала субодиниці мітохондріальної РНК. Набір мітохондріальних тРНК є неповним, адже немає тРНК, здатної зчитувати кодон CGN; отже, такі кодони не знайдені в екзонічній ORF, хоча вони все ще присутні в деяких інтронних ORF, які, отже, повинні розглядатися як псевдогени [33].

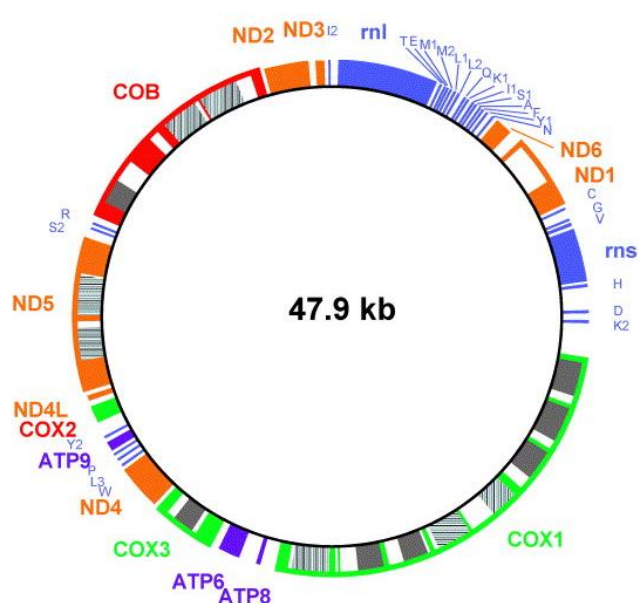


Рис. 3.1 . Мітохондріальний геном *Y. lipolytica* [33].

Синій колір: великі (rnl) і малі рибосомальні РНК (rns) і тРНК, помаранчевий: субодиниці комплексу I, червоний: апоцитохром В, зелений: субодиниці комплексу IV, фіолетовий: субодиниці АТФ-синтази, білий: послідовності інтронів, сірий: інтронні ORF, заштриховані вертикально (псевдогени) або горизонтально (неперекладають через кодони GCN).

Виражений поліморфізм довжини хромосом спостерігався між різними ізолятами, а також варіація кількості виявлених хромосомних смуг (від 4 до 6), що може відображати як гелеві артефакти (коміграція хромосом), так і анеуплоїдію (докази подвоєння маркера *URA3* на окремих хромосомах спостерігався в штамі з 6 смугами). Виявилося, що природні ізоляти *Y. lipolytica* мають дуже відмінні генетичні структури, що може пояснити низьку життєздатність спор, що спостерігається в початкових програмах інбридингу.

Генетичні дані та гібридизація розділених хромосом показали, що більшість ізолятів дикого типу *Y. lipolytica*, містили декілька кластерів одиниць рДНК, розташованих на 1–4. В одному штамі було ідентифіковано до п'яти типів повторюваних одиниць, що відрізняються довжиною та структурою нетранскрибованої спейсерної ДНК. Усі досліджені ізоляти показали цю поліморфну структуру рДНК [10].

3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

Спонтанні мутації відбуваються з низькою швидкістю, і тому клітини дріжджів часто обробляють мутагенами, щоб збільшити частоту мутантів. Мутантні штами дріжджів можна отримати шляхом обробки дріжджів ультрафіолетовим (УФ) світлом, етилметансульфонатом (EMS) та/або N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідом (NTG) як хімічними мутагенами. EMS викликає переважно трансверсії GC до AT. Повідомлялося, що ультрафіолетове світло викликає широкий спектр мутаційних змін, включаючи переходи та трансверсії [34].

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						42
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Y. lipolytica є природною дріжджовою культурою, яка виробляє природні масла, що робить її більш придатною для виробництва гідрофобного β -каротину, оскільки β -каротин є високо гідрофобним сполуком, яка накопичується в ліпідних краплях мікроорганізмів. β -каротин в подальшому може бути трансформований в ретинол під дією ферментів. Введення генів *Mucor circinelloides*, що кодують фітоєндегідрогеназу (*carB*) і біфункціональну фітоєнсиназу/лікопінциклазу (*carRP*), сприяло гетерологічному виробництву β -каротину. Також виробництво β -каротину було ефективно посилено за рахунок збільшення кількості копій генів *carB* і *carRP* і надмірної експресії *GGs1*, *ERG13* і *HMG*, генів, пов'язаних із шляхом мевалонату (*MVA*). Таким чином, оптимізований штам мав надлишкову експресію загалом восьми генів, включаючи три копії *carRP*, дві копії *carB* та окремі копії *GGs1*, *HMG* та *ERG13* [35].

3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Yarrowia lipolytica є промисловим організмом, який не здатний природним чином синтезувати ретинол, але має здатність виробляти велику кількість попередника ацетил-КоА. Виявлено, що штамми із надлишковою продукцією ліпідів здатні виробляти більше β -каротину, ніж дикий тип після експресії гетерологічного шляху.

Шлях біосинтезу ліпідів і шлях каротиноїдів мають спільний попередник, ацетил-КоА, який дуже доступний у *Y. lipolytica*. Крім того, геном цих дріжджів кодує всі необхідні гени для виробництва геранілгеранілдифосфату (*GGPP*), лише дві сполуки від β -каротину. Через це *Y. lipolytica* був запропонований як потенційний продуцент каротиноїдів.

Надмірна експресія трьох генів, геранілгеранілдифосфатсинтази (*GGs1* з *Y. lipolytica*), фітоєнсинази/лікопінциклази та фітоєндегідрогенази (*carPR* і *carB* з *Mucor circinelloides*) також сприяє виробленню β -каротину в *Y. lipolytica*. Було використано експресійну касету (*car-casette*), де експресія *GGs1* контролюється

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						43
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

промотором PGMp, CarB — GAPDHp і CarRP — TEF1p [36].

Найвище виробництво β -каротину і ретинолу було отримано шляхом збільшення трьох копій *crtE* і *crtI* і однієї копії *crtYB*. Одна молекула β -каротину продукує дві молекули ретинолу під дією β -каротин-15,15'-діоксигенази (Blh). У модулі синтезу ретинолу каталіз ретинолдегідрогеназою потребує НАДФН, щоб забезпечити відновну здатність. NADPH утворюється, коли NAD⁺/NADH отримує фосфатну групу від АТФ через мітохондріальні кінази. Оскільки активність НАДН-кінази POS5 має вирішальне значення для синтезу НАДФН. Але, було виявлено позаклітинного рівень ретиналю, що вказує на відтік попередника ретинолу з клітин у великих кількостях, що перешкоджало його синтезу. Щоб зменшити накопичення позаклітинного ретиналю, ми застосували наступні підходи: пригнічували експорт внутрішньоклітинного ретиналю, скринінгували та посилювали експресію ретинолдегідрогенази та покращували стійкість ретинолу до окислення.

Надмірне накопичення побічного продукту сквалену також може перешкоджати синтезу ретинолу. Тому було послаблено метаболічний потік модуля синтезу сквалену та посилено метаболічний потік модуля синтезу β -каротину. FPP перетворюється на сквален за допомогою скваленсинтази ERG9; отже, його ген ERG9 необхідний для нормального росту клітин. Оскільки ERG9 не може бути напряду нокаутований, використано індукований глюкозою промотор PHXT1 для динамічного регулювання експресії ERG9 [37].

Зі збільшенням вмісту β -каротину дріжджова форма овальної форми поступово замінювалася гіфами, що означає накопичення β -каротину в *Y. lipolytica* викликає морфологічний перехід. Щоб зняти цей метаболічний стрес, штами були морфологічно модифіковані шляхом видалення генів *CLA4* і *MHY1* для перетворення міцелію назад у форму дріжджів, що ще більше збільшило виробництво β -каротину на 139% [38].

Використовувався CJ0125 як вихідний штам, який демонструє високу здатність до продукції ліпідів. На його основі отримали штам, що продукує

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						44
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

β -каротин за допомогою генів, що надекспресують, включаючи гетерологічні гени біосинтезу β -каротину, GGS1 мутант ендогенної геранілгеранілпірофосфатсинтази, виділений шляхом спрямованої еволюції, і FAD1, що кодує флавінаденіндинуклеотидсинтетазу, видаляючи кілька генів, які раніше були відомі як корисні для виробництва каротиноїдів. Для виробництва ретинолу 11 копій гена BCO з морської бактерії 66A03 (Mb.Blh) були інтегровані в сайти рДНК надпродуцента β -каротину.

Надмірна експресія GSH2, що кодує глутатіонсинтетазу, ще більше покращила виробництво ретинолу. Комбінаційне зображення виявило спільну локалізацію ретинолу з крапельками ліпідів, а екстракція ретинолу за допомогою Tween 80 була ефективною для покращення виробництва ретинолу. Поєднуючи обробку ВНТ та екстракцію з використанням Tween 80, кінцевий штам *CJ2104* продукував найвищий титр виробництва ретинолу, коли-небудь зареєстрований[5].

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						45
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Назва: концентрат ретинолу, масляна форма; інша назва: концентрат вітаміну А (масляна форма)

Хімічна назва: 3,7-диметил-9-(2,6,6-триметил-1-циклогексен-1-іл)-2,4,6,8-нонатетраен-1-ол; Рег. CAS No68-26-8.

Опис: Масляниста рідина від жовтого до коричнево-жовтого кольору.

Розчинність: Практично нерозчинний у воді; розчинний або частково розчинний у зневодненому етанолі R; змішується з органічними розчинниками.

Категорія: Вітамін.

Зберігання: Масляну форму концентрату ретинолу слід зберігати в добре закритій та наповненій ємності, захищеній від світла та зберігати при температурі від 8 до 15 °C [39]. Ретинол у складі косметичних препаратів стабільний протягом ≥ 6 місяців [18].

Стабілізатор: бутилгідрокситолуол (BHT) або бутилгідроксіанізол (BHA).

Маркування: У позначенні на контейнері має бути вказано назву складного ефіру або ефірів, чи додано додаткові агенти та їх кількість, а також спосіб розчинення рідини, якщо відбулася часткова кристалізація.

Додаткова інформація: Навіть за відсутності світла масляниста форма концентрату ретинолу поступово розкладається під впливом вологої атмосфери, розкладання відбувається швидше за високих температур.

У концентрованих розчинах і при охолодженні може відбуватися часткова

					ДП 9204. 00.000 ПЗ							
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата								
Розробив.	Вітович Я.А.				РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА			Стадія	Аркуш	Аркушів		
Консульт.	Шибєцький В.Ю.									46	109	
Керівник	Литвинов Г.С.							КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ				
Затвер.												

кристалізація. Він може містити відповідні антимікробні агенти та стабілізуючі агенти, такі як антиоксиданти.

Вимоги: Заявлений вміст ретинолу не менше 500000 МО/г. Концентрат ретинолу містить не менше 95,0% і не більше 110,0% від кількості $C_{20}H_{30}O$, зазначеної на етикетці.

Примітка: після відкриття контейнера його вміст слід використати якомога швидше; будь-яка частина вмісту, яка не використовується відразу, повинна бути захищена атмосферою інертного газу.

Кислотне число: Не більше 2,0 [39].

4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Показники, що регламентують вимоги до якості сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у даному виробництві наведені в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1 – Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1) Основна сировина:			

1.1.Сусло-агар	ГОСТ 29112-91	Відсутність важких металів, йоду	Складник поживного середовища (відновлення культури)
1.1.Дріжджовий екстракт	ТУ 9385 – 007 - 39484474 - 2003	Не допускаються БГКП (коліформи), Кількість дріжджів в 1 г, КУО, не більше 10	Складник поживного середовища
1.2.Пептон	ГОСТ 13805 - 76	Не допускається вміст важких металів та вільного індолу	Складник поживного середовища
1.3.Глюкоза	ДСТУ 4464 : 2005	Не дозволено наявність вільних мінеральних кислот, масова частка вологи%, не більше 9	Складник поживного середовища
1.4.Урацил	ТУ виробника	Згідно з ТУ виробника	Складник поживного середовища
1.5.Лейцин	ТУ виробника	Згідно з ТУ виробника	Складник поживного середовища

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

Продовження таблиці 4.1.

1.6.Фосфат калію	ГОСТ 31687 - 2012	Масова частка свинцю мг/кг, не більше 4,0; фторидів, не більше 10,0; миш'яка, не більше 3,0	Складник поживного середовища
1.7.Етанол	ДСТУ 4221 : 2003	Об'ємна частка не менше 96 %	Екстрагування
1.8.Оливкова олія	ДСТУ 5065 : 2008	Кислотне число, мг КОН/г, не більше 0,85	Формування масляної форми
2) Допоміжна сировина:			
2.1.Кислота соляна	ДСТУ 2904 - 94	Масова частка хлористого водню, %, не більше 35; заліза, не більше 0,001, вільного хлору, не більше 0,01	Регулювання кислотності
2.2.Засіб миючий синтетичний порошкоподібний	ДСТУ 2972 : 2010	Рівень первинного розкладу ПАР, не менш як 80 %.	Мийка приміщень/обладнання

Продовження таблиці 4.1.

2.3.Перекис водню	ГОСТ 177 - 88	Масова частка перекису – 30 - 40 %	Дезінфекція приміщень/обладнанн я
2.4.Натр їдкий технічний	ГОСТ Р 55064 - 2012	Масова частка гідроксиду натрію не менше 42%	нейтралізації стічних вод/регулювання кислотності
2.5.Вода питна	ДСТУ 7525 : 2014	Не допускається наявність термостабільних кишкових паличок, патогенних мікроорганізмів, спор сульфіторедукувальни х клостридій	Ополіскування, складник поживного середовища,
3) Матеріали:			
3.1.Ампули скляні	ТУ У 0048094 5 – 005 - 96	Без видимих механічних дефектів	Розлив продукту
3.2.Картон пакувальний	ДСТУ 8401 : 2015	Відповідно до вимог ДСТУ	Пакування
3.3.Фільтрувальни й матеріал	ДСТУ 7770 : 2015	Відповідно до вимог ДСТУ	Фільтрація повітря

4) Напівпродукти:			
4.1.Музейна культура	Відповідно до технологічних регламентів виробництва	Мікробіологічна чистота	Для засіву

4.3. Опис технологічного процесу

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.

Підготовка виробництва має на меті забезпечення препаратів регульованої якості на всіх етапах виробництва. Робочий і підготовчий блок включає в себе такі дії, як навчання персоналу, підготовку розчинів для очищення та дезінфекції, підготовку обладнання, виробничих приміщень та комунікацій, а також готування робочих розчинів і стеження за якістю повітря та води. Дотримання санітарних норм GMP, ДСанПІН та стандартів фармацевтичної та біотехнологічної галузей є обов'язковим на цих етапах.

ДР 1.1. Підготовка персоналу.

Навчання персоналу охоплює проведення інструктажу з питань безпеки та заходів щодо збереження здоров'я.

Для забезпечення належної гігієни працівників, здоров'я зайнятості проводить регулярні медичні перевірки, які відбуваються мінімум один раз на рік згідно з вимогами Міністерства охорони здоров'я України, або здійснюється регулярний медичний огляд осіб, які страждають на хронічні захворювання, якщо це необхідно, разом з дотриманням особистих правил гігієни.

Усі працівники в біотехнологічній галузі, незалежно від характеру роботи, досвіду та кваліфікації, зобов'язані пройти навчання з питань безпеки. Насамперед співробітники проходять навчання, додаткові курси, а протягом процесу роботи - регулярні перепідготовки. Високий рівень кваліфікації є

однією з ключових вимог до працівників. Навчання включає отримання необхідних знань та навичок, пов'язаних з виробничими процесами та відповідними етапами виробництва. Всі працівники повинні періодично проходити професійне навчання з дисциплін, що стосуються належної виробничої практики та процесів виробництва.

Дотримання зазначених вимог допомагає знизити ризик виробництва непридатної продукції та уникнути аварійних ситуацій, що виникають через неправильні дії персоналу.

ДР 1.2. Підготовка дезінфікуючих та миючих розчинів.

Згідно з вимогами GMP, з метою зменшення ризику зараження цільового продукту (отримати неякісного продукту), необхідно правильно обробляти дезінфікуючими засобами як персонал, так і обладнання.

Щоб приготувати дезінфікуючі розчини, які використовуються для обробки пристроїв та будівель, слід дотримуватись: "Методичних рекомендацій щодо приготування і застосування робочих розчинів мийних, дезінфекційних, мийно-дезінфекційних засобів та антисептиків" - затверджених Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001 року № 502.

Під час приготування антисептичних розчинів слід дотримуватись правил особистої безпеки, таких як надягання гумових рукавичок, окулярів та марлевих пов'язок.

Після приготування дезінфікуючого розчину рекомендується зберігати його у спеціальній ємності для попереднього миття обмежаний час. Цю ємність також можна використати для відбору проб із підтвердження мікробіологічної чистоти.

Для обробки обладнання, виробничих приміщень та комунікацій можна готувати такі розчини: миючий розчин з синтетичного порошку, розчин перекису водню.

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						52
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 1.2.1. Підготовка розчину миючого засобу.

Щоб підготувати розчин, використовують збірник з перемішуючим пристроєм, де певна кількість синтетичного порошкового миючого засобу розчиняється температурі 40-50 °С в питній воді і перемішується зі швидкістю 40 об/хв. Очисний розчин, що отримують в результаті, використовується для обробки обладнання та виробничих приміщень.

ДР 1.2.2. Підготовка розчину перекису водню.

Для отримання 6% розчину перекису водню у даному процесі використовують перемішувальний пристрій зі швидкістю 40 об/хв: розводять 33 % розчин перекису водню з питною водою. Після цього, отриманий розчин перекису водню зберігається у відповідному контейнері, призначеному для дезінфекції, протягом певного періоду часу. У виробничому процесі цей 6 % розчин перекису водню разом з миючим розчином використовують з метою обробки обладнання та промислових будівель.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень, обладнання та комунікацій.

Виробничі приміщення, зовнішні поверхні пристроїв та обробка зв'язків піддаються обробці миючим розчином, а тоді дезінфікуючим розчином та промиваються чистою водою. Відходи після обробки - рідкі та промивні води підлягають подальшій обробці та очищенню, щоб уникнути появи стійких форм мікроорганізмів. Потрібно періодично замінювати дезінфікуючий розчин. Також проводиться контроль концентрації мікроорганізмів та рівня пилу в повітрі виробничих приміщень.

Підготовка виробничих приміщень передбачає регулярне прибирання, яке проводиться щодня і розподіляється на певні частини.

Підготовка комунікацій та обладнання відбувається перед і після проведення технологічного процесу. Цей робочий блок включає обробку

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						53
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

обладнання та очищення дезінфікуючими засобами. Необхідно також перевірити наявність протікань, правильну роботу та, якщо можливо, стерилізувати обладнання. Очищення обладнання є частиною робочого блоку з догляду за обладнанням і здійснюється згідно з технологією, установленю компанією, а також діючими технічними рекомендаціями та інструкціями з експлуатації обладнання.

ДР 1.3.1. Мийка вузлів обладнання.

Для очищення обладнання використовується теплий розчин синтетичного миючого засобу при температурі 40°C. Для цього використовуються поролонові губки та серветки з безворсової тканини з зачепленими краями. Знімальні частини або вузли обладнання, які мають контакт з сировиною або її проміжними продуктами, знімаються, розбираються та очищаються у розчинах миючих засобів та питної води при такій же температурі. Після цього обладнання ополіскується питною водою, а якість промивки перевіряється візуально. Промивні води та відпрацьовані розчини підлягають подальшому знешкодженню відходів.

ДР 1.3.2. Дезинфекція обладнання.

Однократну або двократну повну дезінфекцію комунікацій і обладнання рекомендується проводити щорічно за допомогою 6% розчину перекису водню або іншого дозволеного антисептика. З метою дезінфекції обладнання повністю наповнюють дезінфікуючим розчином та залишають протягом 1,5-3 год при температурі 55-65°C. Знімні частини обладнання також зберігають в дезінфікуючому розчині згідно з тими ж самими правилами. Здійснюють дезінфекцію зв'язку шляхом передачі консервантів від одного приладу до іншого. Після обробки комунікації та обладнання консервантами, їх кілька разів промивають питною водою, при цьому перевіряють якість промивної води.

Після процедур промивні води та відпрацьовані розчини підлягають подальшому очищенню. Аналогічно до підготовки виробничих приміщень

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						54
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

проводять обробку зовнішньої поверхні обладнання.

Щоденна дезінфекція комунікацій та обладнання передбачає візуальний контроль якості.

ДР 1.3.3. Стерилізація обладнання.

Термічна стерилізація вважається важливим методом для забезпечення стерильності обладнання. Рекомендується використовувати вологу термообробку з використанням води і пари, оскільки цей процес має більший ефект, ніж сушка при підвищеній температурі. Зазвичай застосовується стерилізація перегрітою парою, яка надходить до пристрою під тиском. Швидкість та ефективність знищення мікробіологічних забруднень зростають зі збільшенням температури.

Процес стерилізації обладнання та пристроїв здійснюється за допомогою гарячої пари під тиском 0,2 МПа протягом однієї години при температурі 140 °С, якщо не встановлено інші параметри для конкретного пристрою. Після цього перевіряється герметичність пристрою, створюючи надлишковий тиск 0,25 МПа та спостерігаючи показання манометра протягом 30 хв. Ці показники повинні залишатися стабільними, що свідчить про герметичність пристрою.

ДР 2. Підготовка повітря.

ДР 2.1. Підготовка вентиляційного повітря.

Очищення повітря є важливим аспектом технічної гігієни в промислових умовах, зокрема в фармацевтичному виробництві. Заходи щодо очищення повітря забезпечуються за допомогою використання фільтрів з відповідною ефективністю.

Згідно з принципами доброї практики виробництва (Good Manufacturing Practice, GMP), розроблені спеціально для фармацевтичної промисловості, одним з основних підходів є багатоступінчаста фільтрація повітря.

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						55
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

При впуску повітря в приміщення необхідно виконувати чотири основні операції:

1. Стиснення повітря для подолання опору арматури і повітропроводів
2. Видалення пилу та інших частинок з повітря шляхом фільтрації.
3. Усунення та знищення мікроорганізмів, що залишилися та можуть бути присутніми в повітрі, шляхом використання відповідних методів.
4. Контроль вологості повітря та температури для забезпечення оптимальних умов для виробничого процесу та збереження якості продукту.

Ці кроки допомагають забезпечити чистоту повітря в виробничих приміщеннях, усунути потенційні забруднювачі і забезпечити безпеку та якість продукції.

ДР 2.1.1. Забір повітря.

Для підготовки вентиляційного повітря використовують повітрозбірник ЗП-29. Повітря з атмосфери вдихається через повітрозбірник, який може розташовуватися на висоті 20-30 метрів. Високий впускний вал забезпечує стабілізацію концентрації мікроорганізмів та інших параметрів повітря перед введенням його у виробничі приміщення. Також важливо враховувати фактори, що залежать від зовнішнього середовища, такі як температура, вологість, кількість пилу та мікроорганізмів. Ці параметри можуть змінюватися залежно від пори року та погодних умов.

ДР 2.1.2. Механічне очищення повітря.

Фільтр грубого очищення використовується для попереднього очищення повітря від механічних частинок розміром більше 5 мкм. Цей фільтр має за мету видалити більші частинки з повітря перед подальшою обробкою.

Стільникові фільтри, такі як ФЯВ (коміркові з вінілопластиковою сіткою),

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						56
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

є одним з типів фільтрів, що використовуються для грубого очищення повітря. Вони заповнені фільтруючим матеріалом, у даному випадку - вінілопластиковою сіткою. Ці фільтри є надійними і зручними в експлуатації.

Фільтр попереднього очищення з діаметром пор 5-10 мкм F-30 використовується для видалення механічних домішок з повітря. Коли повітря проходить через цей фільтр, він утримує частинки такого розміру, забезпечуючи подальше очищення повітря перед введенням його в приміщення.

Використання фільтрів попереднього очищення повітря допомагає зменшити забруднення вентиляційних систем, підвищує ефективність фільтрації та забезпечує кращу якість повітря в приміщеннях, що має важливе значення для процесів виробництва, таких як виробництво вітамінів.

ДР 2.1.3. Подача повітря.

Подача повітря відбувається через вентилятор В-31, тиск 0,2 МПа. В-31 використовується для створення потоку повітря, його переміщення або нагнітання в системі вентиляції. Він створює тиск, який примушує повітря рухатися через вентиляційну систему і забезпечує потрібну вентиляцію або циркуляцію повітря в приміщенні або на об'єкті.

ДР 2.1.4. Кондиціонування та стабілізація параметрів повітря.

Повітря подається в нагрівальну колону НК-32 через вентилятор В-31. У нагрівальній колоні НК-32 відбувається усереднення фізико-хімічних параметрів до температури 20 °С та вологості 40-60%. Клапан розташований на вході гарячої пари нагрітої пари і відповідає за регулювання потоку гарячої пари та скидання конденсату. Цей фільтр має фільтруючий матеріал з діаметром пор 1,5 мкм, який забезпечує очищення повітря від дрібних пилових частинок та мікроорганізмів. Повітря, після проходження через фільтр Ф-33, вважається очищеним і підготовленим для входу в будівлю. Його подають до виходу фільтра Ф-33 і в подальшому розподіляють в приміщення за допомогою системи

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						57
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

вентиляції.

Цей процес дозволяє усереднити температуру повітря на рівні 20 °С і забезпечити вологість у діапазоні 40-60%. Також за допомогою повітряного

фільтра Ф-33 досягається очищення повітря від дрібних пилових частинок та мікроорганізмів, забезпечуючи високу якість вентиляційного повітря, що вводитьься в будівлю.

ДР 2.2. Підготовка стерильного повітря.

ДР 2.2.1. Забір повітря.

За допомогою повітрязабірника ЗП-22 проводять забір атмосферного повітря на висоті 20-30 м. ЗП-22 має діаметр 300 мм, процес відбувається аналогічно до ДР 2.1.1.

ДР 2.2.2. Нагнітання та механічна очистка повітря.

Для очищення забраного повітря від частинок розміром більше 10 мкм використовують фільтр попередньої очистки Ф-23. Він має фільтруючий матеріал з діаметром пор, що відповідає цим розмірам, аналогічно до ДР 2.1.2.

Після проходження через фільтр Ф-23, повітря очищається від більших частинок, що допомагає підготувати його для подальшого використання. Потім повітря нагнітається до тиску 0,2 МПа насосом Н-24.

ДР 2.2.3. Видалення вологи з повітря.

Щоб охолодити повітря до температури 15°С використовується кожухотрубний теплообмінник ТО-25. У цьому процесі технічна холодна вода використовується як холодоагент.

Під час проходження повітря через кожухотрубний теплообмінник, також відбувається процес видалення надлишкової вологи. Це стає можливим завдяки різкій різниці температур між повітрям і холодною водою. При охолодженні

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						58
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

повітря до низької температури волога в ньому конденсується і видаляється з повітряного потоку.

ДР 2.2.4. Стабілізація термодинамічних показників повітря.

Після охолодження повітря проходить до ресивера РС-26, де відбувається стабілізація термодинамічних параметрів. Основні завдання стабілізації включають видалення залишків масляного туману та зниження пульсації тиску.

Встановлюються воротні клапани та електроприводні запірні клапани в лінії подачі повітря до ресивера. Запірні клапани розташовані на вході гарячої пари та на виході конденсату з ресивера, а зворотні клапани встановлюються на виході пари, яка використовується.

Ресивер РС-26 служить як приймач повітря і підтримує тиск повітря на рівні 0,2 МПа і температуру 20 °С.

ДР 2.2.5. Очищення повітря на головному фільтрі.

Типовий фільтр НЕРА Н 11 F-27 з ефективністю очищення на рівні 95% затримує частинки розміром до 1,5 мкм, що допомагає забезпечити високу якість повітря, знижує ризик вдихання шкідливих речовин і допомагає запобігти поширенню мікроорганізмів, завдяки стерилізуючому ефекту. Фільтр приймає стабілізоване повітря з приймача.

ДР 2.2.6. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі.

Фільтри типу ФТО-60 Ф-28 є індивідуальними фільтрами, які використовуються для додаткового очищення повітря після головного фільтра НЕРА. Ці фільтри затримують ще більш дрібні часточки до 0,5 мкм і мають високу ефективність очищення до 99,999% від мікроорганізмів та їх спор.

Для цих фільтрів рекомендується використовувати спеціальні фільтруючі матеріали, такі як матеріали на основі базальтового надтонкого волокна, синтетичного волокна або базальтового мікрОВОлокна. Ці матеріали мають

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						59
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

високу ефективність затримання дрібних частинок і мікроорганізмів. Окремі фільтри ФТО-60 Ф-28 не вимагають додаткового тиску для своєї роботи, що

дозволяє забезпечити ефективне очищення повітря без необхідності додаткових пристроїв.

Під час процесу очищення повітря тиск у системі контролюється, і різниця тиску може вказувати на наявність мікробного забруднення або наявність механічних частинок. Це дозволяє контролювати ефективність роботи фільтрів і вчасно виявляти можливі проблеми з забрудненням.

Після промивання окремими фільтрами, стерильне повітря подається в прищепи інокуляторів І-4 та І-6, а також в ферментер ФВ-8 для провітрювання культури виробника. Це допомагає забезпечити чистоту та стерильність в процесі виробництва.

ДР 3. Підготовка робочих розчинів

В якості робочого розчину використовують титруючий розчин, який потребує попередньої підготовки - для стабілізації рН культури.

ДР 3.1. Приготування 10%-го розчину НСІ.

Для отримання 10% розчину НСІ в цьому виробництві використовується дозатор колектора з перемішувачем. Кислоту додають через дозатор, разом з необхідною кількістю питної води, при швидкості 40 об/хв, після цього розчин перемішують до отримання бажаної концентрації. Отриманий робочий розчин зберігається в спеціальній ємності протягом певного часу.

ДР 4. Підготовка лабораторного посуду.

ДР 4.1 Миття лабораторного посуду.

Процес відбувається в автоматичних мийках, куди також вносять миючий засіб. Після завантаження посуду водопровідна вода під тиском 0,2 МПа

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						60
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

подається до мийки, процес миття триває протягом 15 хвилин. Температура підтримується на рівні 50 °С, що допомагає ефективно видалити забруднення та забезпечити гігієнічну чистоту посуду.

ДР 4.2 Продувка лабораторного посуду.

Процес продувки полягає у пропусканні очищеного повітря з ДР 2.1.7 температурою 70 °С протягом 5 хвилин через лабораторний посуд. Це допомагає висушити посуд та забезпечити видалення залишків вологи, що можуть бути присутні після миття, а відпрацьоване повітря відправляється до системи очистки повітря.

ДР 4.3 Стерилізація лабораторного посуду.

На цьому етапі митий та висушений посуд обгортається фольгою або іншим стерильним матеріалом. Завантажений посуд розміщується всередині автоклаву.

Процес стерилізації відбувається за допомогою насиченої водяної пари під тиском 0,2 МПа і за температури 132 °С. Ці параметри підтримуються протягом 20 хвилин.

ДР 5. Підготовка тари.

ДР 5.1. Мийка та сушка тари.

Зі складу підготовлюють скляні банки, які миються розчинами з ДР 1.2.2., потім ополіскуються питною водою та сушаться протягом години.

ДР 6. Підготовка ампул.

Ампули миються вакуумним методом миючим розчином з ДР 1.2.2. та ополіскуються питною водою, після чого направляються в сушильні шафи при температурі 120-130 °С на 15-20 хв. Після цього ампули стерилізуються протягом години при 180 °С.

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						61
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 7. Підготовка поживних середовищ.

ДР 7.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для посівного матеріалу.

Використовується середовище YPD. Склад цього середовища включає наступні компоненти: 10 г/л дріжджового екстракту, 20 г/л пептону та 20 г/л глюкози [5].

Середовище для вирощування посівного матеріалу готують у колбах К-2, які стерилізують в автоклаві під тиском 0,1 МПа та при температурі $121 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 30 хвилин. Для приготування поживного середовища та його стерилізації використовують 2 інокулятори І-3 та І-4 об'ємом 0,63 м³. Після стерилізації, рН середовища повинно бути в межах 5,9-6,3. Під час приготування середовища, необхідні компоненти додаються у відповідній кількості за допомогою дозатора Д-5 та перемішуються при швидкості 30-40 об/хв протягом 30 хвилин після додавання всіх компонентів. Середовище охолоджується до температури 30 °С та стерилізується під тиском 0,3 МПа та при температурі 120 °С протягом 30 хвилин "гострою" парою. Після цього до кожуха інокулятора І-4 подається охолоджуюча вода, забезпечуючи надлишковий тиск понад 0,05 МПа. На цьому етапі здійснюється контроль мікробіологічної чистоти середовища шляхом висіву проб на чашки Петрі та їхнього інкубування в термостаті.

ДР 7.2. Підготовка поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Виробничий біосинтез ретинолу проводять ферментері Фв-6, для цього було вибрано середовище YPDUL40. Склад цього середовища включає наступні компоненти: 10 г/л дріжджового екстракту, 20 г/л. L пептону, 40 г/л глюкози, 1 г/л урацилу, 1 г/л лейцину та 100 мМ фосфату калію (рН 7,0) [5].

ДР 7.2.1. Приготування та стерилізація композиції поживного середовища.

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						62
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Для завантаження всіх необхідних компонентів в необхідній кількості використовують дозатор Д-7, при цьому здійснюють перемішування (30-40 об/хв) протягом 30 хв. Після приготування поживного середовища проводять стерилізацію. Її здійснюють при 0,3 МПа "гарячої" пари, за температури 125 °С протягом 15 хвилин. Після стерилізації воду, що надходить з-під ферментації, для охолодження середовища до 30 °С подають в кожух ферментатора. Надлишковий тиск становить понад 0,05 МПа. Попередньо стерилізований водний розчин лимонної кислоти для забезпечення антиоксидантного захисту, додається в ферментер через стерилізовану систему шлангів, після чого здійснюється перемішування всіх компонентів. На цій стадії контролюється мікробна чистота середовища шляхом висівання зразка на чашку Петрі та його інкубації в термостаті. Також перевіряється рівень рН та його стабілізація на значення 6,1-6,5 (за необхідності коригуючи його шляхом додавання розчину НСІ або NaOH).

ТП 8. Підготовка посівного матеріалу.

ТП 8.1 Відновлення музейної культури

До пробірки Пр-1 додають 2 мл стерильного живильного середовища з посівом на твердому живильному середовищі. Здійснюють перемішування до утворення клітинної суспензії, яку додають у колбу (об'єм 0,75 л) К2 у стерильних умовах разом із простерилізованим поживним середовищем. Тоді колбу поміщають в термостат Т-3 і розміщують на качалці зі швидкістю 200 об/хв. Інкубація проводиться протягом 28-56 годин при температурі 28 °С. Візуально здійснюється контроль мікробної чистоти.

ТП 8.2. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі.

Посівний матеріал з колб К-2 після вирощування в термостаті Т-3 передається у підготовлені інокулятори І-4 та І-6 з використанням системи стерильних шлангів. Це здійснюється через попередньо обпалений стерильний штуцер для кінцевого накопичення посівного матеріалу. Об'єм обраного апарату

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

складає 0,63 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Процес у інокуляторах І-4 та І-6 відбувається при температурі 28 °С, яка забезпечується подачею гарячої технічної води до сорочки апарату, тривалістю 36-72 годин. Інокулятори І-4 та І-6 оснащені механічним змішувальним агрегатом - відкритою турбінною мішалкою і барботером, які працюють зі швидкістю 200 об/хв.

Вміст в інокуляторі після завантаження культури перемішують за допомогою мішалки протягом 2 хвилин, а потім відбирають певний об'єм культури в стерильну ємність для дослідження мікробіологічної чистоти та відповідного рівня рН.

ТП 9. Виробничий біосинтез.

Посівна рідина з інокуляторів І-4 та І-6 відправляється у ферментер Фв-8 у кількості 5% від об'єму живильного середовища, яке перед цим було стерилізоване стерильною шланговою системою. Виробничий ферментер Фв-8 є циліндричною ємністю об'ємом 6,3 м³ і має коефіцієнт наповнення 0,6. У ферментері встановлено механічний змішувальний пристрій - відкрити турбінну мішалку зі швидкістю 2,67 с⁻¹. Барботер забезпечує аерацію культури, через який очищене технологічне повітря подається через фітинги.

Виробничий біосинтез здійснюється за температури 28 °С, яка забезпечується протягом 72 годин подачею в кожух пристрою технічної гарячої води.

Після того, як культуру завантажено у ферментер, здійснюється перемішування вмісту за допомогою мішалки протягом 2 хвилин. Для контролю мікробіологічної чистоти відбирають певний об'єм культури в стерильну ємність. Проби висівають на чашки Петрі, потім інкубують в термостаті.

ТП 10. Стандартизація рН культуральної рідини.

Після завершення процесу виробничого біосинтезу у ферментері, культуральну рідину направляють до збірника З-10, який оснащений

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						64
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

механічною мішалкою, для коригування кислотності, через штуцер нижнього спуску. За Рівень допомогою рН-метра визначають рН, у разі необхідності його коригують до 6,5, додаючи відповідні кількості р-ну соляної кислоти за допомогою дозатора Д-11. Після додавання розчину НСІ рідина перемішується мішалкою, а потім знову визначається рівень рН.

ТП 11. Екстрагування продукту з культуральної рідини.

За допомогою наноса Н-10 нейтральна рН-культура подають до змішувального реактора Р-12 об'ємом 5м³. Цей пристрій використовується для вилучення ретинолу з культури.

Екстракція здійснюється в реакторі Р-12, до якого подається об'єм етанолу, як органічного розчинника у співвідношенні до об'єму культуральної рідини 1:1. Подача розчинника здійснюється за допомогою дозатора Д-13. При цьому здійснюється перемішування механічним перемішуючим пристроєм за температури 85 ° С протягом 3 годин зі швидкістю 2,67 с⁻¹.

ТП 12. Відділення екстракту центрифугуванням.

Для цього етапу використовується надцентрифуга Ц-14 з метою розділення суміші після екстрагування, яка містить ретинол та супутні БАР. Нерозділений екстракт надходить до надцентрифуги, яка складається з верхньої та нижньої кришок у вигляді пластин, засобів для подачі суспензії та засобів для відведення очищеної рідини.

Вхідна рідина подається через канал до роздільної камери з ротором. Під впливом відцентрової сили тверді частинки, що містяться в рідині, осідають на внутрішній поверхні стінок ротора з антифрикційним покриттям, а очищена рідина спочатку виводиться через отвір у поршні, а потім через отвір у верхній кришці.

Центрифугування здійснюється при 3000 об/хв та триває 10 хвилин, після чого за допомогою поршня видається осад, який накопичується на внутрішній

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						65
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

поверхні стінок ротора, спускаючи поршень на дно.

Отриманий осад містить залишки етанолу та культуру продуцента і збирається для подальшої переробки. Легка етанолова фаза відокремлюється через отвір і верхню кришку поршня за допомогою насоса Н-14 на герметичній шланговій системі і подається до збірника 3-15.

ТП 13. Промивання екстракту водою.

В процесі, коли легка етанолова фаза подається до збірника 3-15, в цій ємності знаходиться механічна мішалка. Через дозатор Д-15 у збірник 3-15 подається питна вода у об'ємі, рівному об'єму культуральної рідини, яка була в апараті після надцентрифуги. Процес в збірнику 3-15 відбувається за інтенсивного перемішування механічним перемішуючим пристроєм з частотою обертання 3,33 с-1 за температури 25°C протягом 30 хв.

ТП 14. Упарювання та видалення розчинників, кристалізація продукту.

Процес вакуумного випаровування відбувається при температурі 85°C з метою видалення органічних домішок та залишків реагентів з рідини. Цей процес відбувається у вакуум-випарному апараті Ва-16.

Під вакуумом рідина піддається нагріванню, що сприяє її випаровуванню при нижчій температурі, ніж при атмосферному тиску. В результаті випаровування вода та інші легкі компоненти рідини видаляються, залишаючи більш концентровану суміш речовин.

У процесі випаровування концентрація сухих речовин досягає 65%, тоді як решта речовин (розчинені водою) випаровуються та видаляються.

ТП 15. Висушування екстракту.

У Розпилювальній сушарці С-19 використовується процес висушування екстракту. Такі сушарки використовуються для випаровування в'язки, термічно

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						66
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

нестійких або пастоподібних р-нів. Усередині циліндричного корпусу пристрою, диск на валу обертається, створюючи різкий пар, що розпилює розчин у вигляді дрібних крапель. Розчин, який поступає у пристрій зверху, висихає на гарячому повітрі. На стінку відкидаються краплі та фіксуються до підлоги під впливом відцентрової сили. За температури 85 ° С і тиску 0,03 МПа поступово сушать порошок, а тонкий шар порошку, який залишається на стінках пристрою, падає на дно. Через секторний затвор можна видалити сухий залишок, який надходить у збірник 3-20.

ТП16. Екстрагування олією для формування масляної форми.

У збірник 3-20 до отриманого ретинолу додають оливкову олію через дозатор Д-18 та добре перемішують за допомогою механічної мішалки, щоб отримати масляну форму концентрату ретинолу.

ТП 17. Розлив ретинолу в ампули.

Масляну форму концентрату ретинолу в кількості 2 мл розливається в підготовлені ампули з ДР5 вакуумним методом.

ТП18. Запаювання ампул

Процес відбувається на першому етапі на лінії пакування.

ТП 19. Перевірка ампул на герметичність.

Для перевірки на герметичність ампули потрібно помістити в розчин метиленового синього. Далі в ємність за допомогою насоса повертають розчин. Ампула вважається бракованою, якщо сліди метиленового синього наявні всередині, таку ампулу відправляють на ЗВ.

ПМВ 20. Пакування, маркування, відвантаження готового продукту.

У картонні коробки пакуються ампули пакуються по 10 штук у кожну.

Перед пакуванням на ампули з ретинолом наносять етикетки, на яких

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						67
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

вказується відповідна інформація:

- найменування продукту
- номер серії
- строк придатності
- кількість продукту

ЗВ 21. Знешкодження відходів та промислових викидів.

Під час виробництва утворюються різні відходи, які потребують процедури знезараження. Здійснюється знезараження вентиляційного та стерильного повітря, конденсату, некондиційного посівного матеріалу та культуральної рідини, промислових стоків, непридатних партій препаратів і т.д.

Очищення повітря, що містить живі клітини мікроорганізмів та краплі культуральної рідини з продуктами метаболізму, вимагає використання спеціального сепаратора для відокремлення крапель і піни, а потім проводиться очищення від клітин мікроорганізмів у скрубєрі. Потім це очищене повітря може бути повторно використано як вентиляційне або технологічне повітря.

Некондиційний посівний матеріал, одержаний в посівному апараті, а також некондиційна культуральна рідина, отримана в ферментері, піддаються термічній обробці відповідними апаратами за допомогою "гострої" пари під тиском $P = 0,3$ МПа при температурі $130-132^{\circ}\text{C}$ протягом 40 ± 5 хвилин. Після цього вони охолоджуються за допомогою холодної технічної води до $25-30^{\circ}\text{C}$, розбавляються водою до заданого рівня окислення ($450-700$ мг/л), а рН середовища доводять до $7,0$ за допомогою розчинів соляної кислоти або їдкого натру. Потім ці речовини відводяться в загальну каналізаційну систему.

Промивні дезінфікуючі розчини, залишки розчинів СМЗ після санітарної обробки виробництва та відпрацьована вода направляються до збірника нейтралізації стічних вод. Там їх розбавляють водою в 3-4 рази та за допомогою

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						68
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

розчинів HCl або їдкого натру встановлюють рН на рівні 7,0, після його відводять у загальну каналізаційну систему. У цей же збірник також стокують промивні води після миття інокулятора І-4 та ферментера Фв-6.

Тверді відходи виробництва, такі як скло, рукавички, упаковочні матеріали, пошкоджені флакони, затички та ковпачки, підлягають утилізації на міському сміттєзвалищі.

ВВ 22. Відновлення відходів

В даному виробництві широко застосовуються матеріали та речовини, які можуть бути повторно використані при належній обробці. Фільтрувальні матеріали і органічні розчинники є основними з них.

Тканинний фільтр, що використовується для підготовки води та повітря, підлягає відновленню. Цей процес полягає в замочуванні фільтра у гарячій воді, а потім його очищенні та обробці дезінфікуючим розчином. Таким чином, фільтр може бути повторно використаний.

На різних етапах екстрагування, центрифугування та випаровування використовуються пари та розчини, що містять органічні розчинники, такі як лимонна кислота та етанол. Використана пара перед тим, як вона попадає у регенератор (дистилятор), конденсується разом із використаним розчином. Це дозволяє перегнати до 95% об'єму використаного розчину, що допомагає знизити вміст органічного розчинника. Вакуумний генератор використовується для випаровування в її установці під час нагрівання. Отримана пара потім направляється до конденсатора для охолодження, де вона знову перетворюється на рідку форму. Цей процес дозволяє знизити температуру кипіння розчину без домішок. Очищений розчинник протікає з конденсатора до збірника чистого розчинника для подальшого повторного використання.

Таким чином, використання фільтрувальних матеріалів та повторне використання органічних розчинників допомагають зменшити витрати та

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						69
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

покращити екологічну ефективність процесів у даному виробництві.

4.4 Матеріальний баланс

Таблиця 4.2 – Матеріальний баланс стадії виробництва.

Використано					Отримано				
Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Стадія	Назва кінцевого продукту або напів-продукту, відходів та витрат	Кількість		
		кг	шт	л			кг	шт	л
ДР 7.1.	Дріжджовий екстракт	1,95			ДР 7.1.	Поживне середовище	195		
	Пептон	3,9							
	Глюкоза	3,9							
	Вода питна	185,25							
Всього		195			Всього		195		
ДР 7.2.	Дріжджовий екстракт	35,91			ДР 7.2.	Поживне середовище	3591		
	Пептон	71,82							
	Глюкоза	143,6							
	Урацил	3,6							
	Лейцин	3,6							
	Фосфат калію	0,36							
	Вода питна	3332							
Всього		3591			Всього		3591		

ТП 8.1.	Музейна культура			0,1	ТП 8.1.	Інокулят першої генерації			19,40
	Колби об'ємом 0,75л		27			Брудні колби		27	
	Поживне середовище			19,9		Витрати			0,6
Всього			27	20	Всього			27	20
ТП 8.2.	Інокулят першої генерації			19,4	ТП 8.2.	Посівний матеріал			189
	Поживне середовище			175,2		Витрати			5,6
Всього				194,6	Всього				194,6
ТП 9	Посівний матеріал			189	ТП 9	Культуральна рідина			3770
	Поживне середовище			3591		Витрати			10
Всього				3780	Всього				3780
ТП 10	Культуральна рідина			3770	ТП 10	Стабілізована культуральна рідина			4130
	Розчин НСІ			370		Витрати			10
Всього				4140	Всього				4140
ТП 11	Стабілізована культуральна рідина			4130	ТП 11	Суспензія			8200

Продовження таблиці 4.2.

	Етанол			4130		Витрати			60
Всього				8260	Всього				8260
ТП	Суспензія			8200	ТП	Осад			2200
12					12	Етанолова фаза			6000
Всього				8200	Всього				
ТП	Етанолова фаза			6000	ТП	Суспензія			12000
13	Вода питна			6000	13				
Всього				12000	Всього				12000
ТП	Суспензія				ТП	Упарений розчин			3846
14					14	Випарена волога			8050
						Витрати			103,85
Всього				12000	Всього				12000
ТП	Упарений розчин			3846	ТП	Порошок			36
15					15	Волога			3724
						Витрати			86
Всього					Всього				3846
ТП	Порошок			36	ТП				48
16	Оливкова олія			12					
Всього				48	Всього				48

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 9204. 00.000 ПЗ

Арк.

72

Продовження таблиці 4.2.

ТП 17	Концентрат			48	ТП 17	Препарат ретинолу в ампулах			48
	Підготовлені ампули		24тис			Ампули		24тис	
Всього			24тис	48	Всього			24тис	48

4.5 Контроль виробництва

Наводиться перелік контрольних точок (найважливіших місць та етапів виробництва), що забезпечують виконання технологічного режиму у вигляді таблиці (таблиця 4.3):

Таблиця 4.3 – Перелік контрольний точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 1.2.1. Підготовка розчину миючого засобу. К _т 1.2.1.1.	Синтетичний порошковий миючий засіб, температура	термометр	Кожен процес	40-50 °С

ДР 1.2.2. Підготовка розчину перекису водню. К _х 1.2.2.1.	Р-н перекису водню, концентрація	аналітичний	Кожен процес	6 %
ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень, обладнання та комунікацій. К _м 1.3.1. К _т 1.3.2.	Вміст м/о у повітрі	Мікробіологічний аналіз	Кожен процес	≤ 500 од/м ³
	Рівень пилу	візуальний		мінімальний
ДР 1.3.2. Дезинфекція обладнання. К _т 1.3.2.1.	Тривалість	Годинник	Кожен процес	1,5-3 год
	температура	термометр		55-65°C
ДР 1.3.3. Стерилізація обладнання. К _т 1.3.3.1.	тиск	Манометр	Кожен процес	0,2 Мпа
	температура	термометр		0,25 МПа
	час	годинник		140 °С
ДР 2.1.3. Подача повітря. К _т 2.1.3.1.	тиск	манометр	Протягом процесу	30 хв
				0,2 Мпа

ДР 2.1.4. Кондиціонування та стабілізація параметрів повітря. К _Т 2.1.4.1.	вологість	Психрометр технічний	Протягом процесу	W= 40-60 %
	температура	манометр		20 °С
ДР 2.2.2. Нагнітання та механічна очистка повітря. К _Т 2.2.2.1.	тиск	манометр	Протягом процесу	0,2 МПа
ДР 2.2.3. Видалення вологи з повітря К _Т 2.2.3.1.	температура	термометр	Протягом процесу	15 °С
ДР 2.2.4. Стабілізація термодинамічних показників повітря. К _Т 2.2.4.1.	температура	термометр	Кожен процес	20 °С
	тиск	манометр		0,2 МПа
ДР 3.1. Приготування 10%-го розчину НСІ. К _х 3.1.1.	Р-н НСІ, концентрація	аналітичний	Кожен процес	10%

ДР 4.1 Миття лабораторного посуду. К _Т 4.1.1.	тривалість	годинник	Протягом процесу	15 хв
	тиск	манометр		0,2 МПа
	Візуальна чистота	візуальний		Відсутність забруднення
	температура	термометр		50 °С
ДР 4.2 Продувка лабораторного посуду. К _Т 4.2.1.	температура	термометр	Протягом процесу	70 °С
	тривалість	годинник		15 хв
ДР 4.3 Стерилізація лабораторного посуду. К _Т 4.3.1.	тиск	манометр	Протягом процесу	0,2 МПа
	температура	термометр		132 °С
	тривалість	годинник		20 хв
ДР 5.1. Мийка та сушка тари. К _Т 5.1.1.	Очищеність, цілісність	візуально	Кожен процес	Відсутність пошкоджень, відсутність забруднень
ДР 6. Підготовка ампул. К _Т 6.1. К _М 6.2.	Сушильні шафи, температура	термометр	Кожен процес	120-130 °С
	Сушильні шафи, тривалість	годинник		15-20 хв
	Стерилізація, тривалість	годинник		1 год

	Стерилізація, температура	термометр		180 °С
	Стерилізація, вміст м/о	контроль		відсутність
ДР 7. Підготовка поживних середовищ. К _т 7.1 К _х 7.2. К _м 7.3.	Автоклав, тиск	Манометр	Кожен процес	0,1 МПа
	Дозування	Ваги, дозуючі пристрої		Відповідно до технології
	Автоклав, температура	термометр		121 ± 1°С
	Автоклав, тривалість	годинник		30 хв
	Середовище, рН	рН-метр		рН 5,9-6,3
	Перемішування, тривалість	годинник		30 хв
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний аналіз		Відсутність сторонніх м/о
	Стерилізація, тиск	манометр		0,3 МПа
	Стерилізація, температура	термометр		120 °С
	Стерилізація, тривалість	годинник		30 хв

ДР 7.2. Підготовка поживного середовища для виробничого біосинтезу К _т 7.2.1.	Дозування	Ваги, дозуючі пристрої	Кожен процес	Відповідно до технології
ДР 7.2.1. Приготування та стерилізація композиції поживного середовища К _т 7.2.1.1. К _х 7.2.1.2. К _м 7.2.1.3.	Перемішування, тривалість		Кожен процес	30 хв
	Стерилізація, температура			125 °С
	Стерилізація, тривалість			15 хв
	Стерилізація, тиск			0,3 МПа
	рН			рН 6,1-6,5
	Мікробна чистота			Відсутність сторонніх м/о
ТП 8.1 Відновлення музейної культури. К _т 8.2.1. К _м 8.2.2.	Інкубація, тривалість	годинник	Кожен процес	28-56 год
	Інкубація, температура	термометр		28 °С
	Мікробіологічна чистота	Візуально		Відсутність сторонніх м/о

ТП 8.2. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі. К _Т 8.3.1. К _М 8.3.2.	Коефіцієнт заповнення	Рівнемір, візуально	Кожен процес	0,6
	Інокулятор, температура	термометр		28 °С
	Інокулятор, тривалість	годинник		36-72 год
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний аналіз		Відсутність сторонніх м/о
ТП 9. Виробничий біосинтез. К _Т 9.1 К _М 9.2.	Мікробіологічна чистота	висів проб на чашки Петрі	Кожен процес	Відсутність сторонніх м/о
	Ферментер, температура	термометр		28 °С
	Ферментер, тривалість	годинник		72 год
ТП 10. Стандартизація рН культуральної рідини. К _Х 10.1.	Культуральна рідина, рН	рН-метр	Кожен процес	6,5
ТП 11. Екстрагування продукту з культуральної рідини. К _Т 11.1.	Екстрагування, тривалість	годинник	Кожен процес	3 год
	Екстрагування, температура	термометр		85 ° С

ТП 12. Відділення екстракту центрифугуванням. К _Т 12.1.	Центрифугування, тривалість	Годинник	Протягом процесу	10 хв
	перемішування	тахометр		3000 об/хв
ТП 13. Промивання екстракту водою К _Т 13.1	температура	термометр	Протягом процесу	25°C
	тривалість	годинник		30 хв
ТП 14. Упарювання та видалення розчинників, кристалізація продукту. К _Т 14.1.	температура	термометр	Протягом процесу	85°C
ТП 15. Висушування екстракту. К _Т 15.1.	температура	термометр	Протягом процесу	85 ° С
	тиск	манометр		0,03 МПа
ТП 17. Розлив ретинолу в ампули К _Т 17.1.	дозування	дозатор	Протягом процесу	2 мл
ТП 19. Перевірка ампул на герметичність К _Т 18.1.	проникненість	Нанос, візуальний	Протягом процесу	відсутня
	Тривалість, р-н метиленового синього	годинник		10 хв

ПМВ 20. Пакування, маркування, відвантаженн я готового продукту. К _т 20.1.	Вміст	візуальний	Кожен процес	по 10 штук
ЗВ 21. Знешкодженн я відходів та промислових викидів. К _т 21.1. К _х 21.2. К _м 21.3.	Концентрація відходів	Кількісний мікробіологіч ний та хімічний аналіз	Кожен процес	Відповідно до санітарних норм
ВВ 22. Відновлення відходів К _т 22.1. К _х 22.2. К _м 22.2.	Наявність механічних, мікробіологічни х хімічних, забруднень	Кількісний мікробіологіч ний та хімічний аналіз	Кожен процес	Згідно з НТД для певних речивин/матеріал ів

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

У промисловому виробництві біотехнологічних продуктів, спеціальний пристрій, відомий як ферментер або біологічний реактор, використовується для створення оптимальних умов для культивування мікроорганізмів. Ферментер має кілька функцій, зокрема забезпечує гідродинамічні та масообмінні процеси, а також виконує функцію теплообмінника.

Для отримання мікробних мас та біологічно активних речовин, найпоширенішим методом є глибинне культивування біологічних агентів. Ферментери, призначені для глибинного культивування, дозволяють ефективно створювати оптимальні умови, що сприяють реалізації потенційних властивостей біологічних агентів [40].

В даному проєкті було обрано ферментер для культивування *Y. lipolytica* для виробництва ретинолу. Оптимальними умовами є: аерація 0,6-0,7 м³, температура 28 °С, перемішування швидкістю 2,67 с⁻¹.

Механічне перемішування здійснюється у пристроях з механічними перемішувальними пристроями. Для перемішування добре розчинних рідин використовують потокове перемішування. Пневматичне перемішування здійснюється газами (зазвичай повітрям) або парою. Перше зазвичай застосовується для насичення середовища відповідним газом, а друге - для одночасного нагрівання. Такий вид перемішування знаходить широке використання для культивуванні мікроорганізмів в бродильній та мікробіологічній промисловості. При цьому повітря подається у формі струменя, де відбувається перемішування, за допомогою барботерів [41].

					ДП 9204. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив.	Вітович Я.А.						82	109
Консульт.	Шибєцький В.Ю.							
Керівник	Литвинов Г.С.					КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Затвер.								

Ферментери в які введення енергії здійснюється механічними перемішувачами можна класифікувати за видами самих мішалок (рис. 5.1) або за особливостями конструкції реактора. В біотехнології традиційно перевага віддається швидкісним лопатевим, гвинтовим та турбінним.

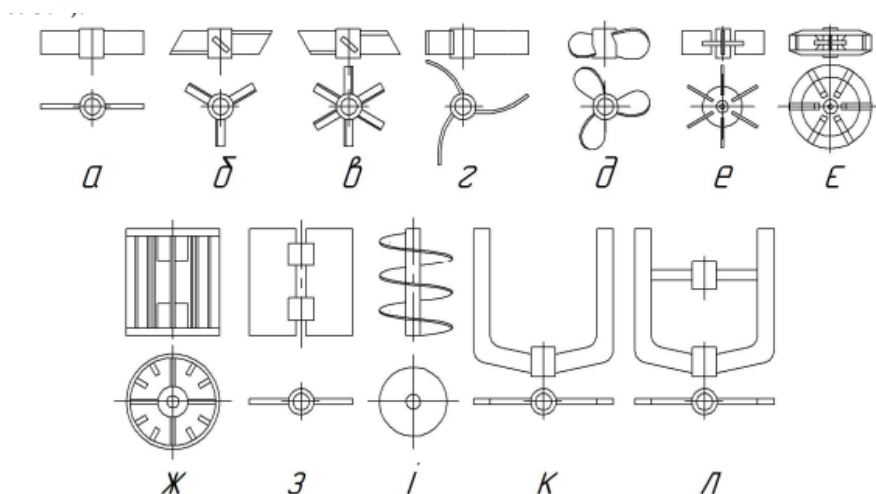


Рис.5.1. Конструкції механічних мішалок: а – лопатева; б – трьохлопатева; в – шестилопатева мішалка; г – спіраль-лопатева; д – гвинтова; е – відкрита турбінна; є – закрита турбінна; ж – клітьова; з – листова; і – шнекова; к – якірна; л – рамна [42].

Механічне перемішування здійснюється з метою: оптимізації процесів масообміну та теплообміну та створення однорідних розчинів, емульсій та суспензій [41].

Один з найбільш поширених ферментерів - ферментер з турбінною мішалкою та барботером (рис. 5.2). Турбінна мішалка є потужним та ефективним інструментом для забезпечення гомогенного змішування реагентів у ферментері. Вона забезпечує інтенсивну та однорідну циркуляцію середовища, що сприяє оптимальному контакту між мікроорганізмами та поживними речовинами, необхідними для біосинтезу ретинолу. Барботер (або аераційна система) забезпечує постійне постачання кисню до ферментера, що є важливим для росту та метаболізму мікроорганізмів, використовуваних для біосинтезу ретинолу. Оптимальна рівновага кисню в середовищі є ключовим чинником для підтримки

активності ферментів та забезпечення максимальної продуктивності процесу. Барботер також допомагає вивести зайвий вуглекислий газ та інші вироблені побічні продукти з ферментера.

Передбачена наявність технологічного штуцера для введення миючих засобів, штуцерів для входу та виходу теплоносія. Зливний штуцер розташований знизу. На кришці апарату передбачено декілька штуцерів: для подачі очищеної води, повітря, пари для стерилізації, миючих засобів, завантаження поживного середовища, а також технічний люк. На днищі корпусу розташований штуцер для зливу розчину по закінченню процесу.

Обрано одинарне торцеве ущільнення, тому що воно має високу герметичність. Торцеве ущільнення має високий ККД, високу зносостійкість, довговічність, добре працює при наявності биття вала.

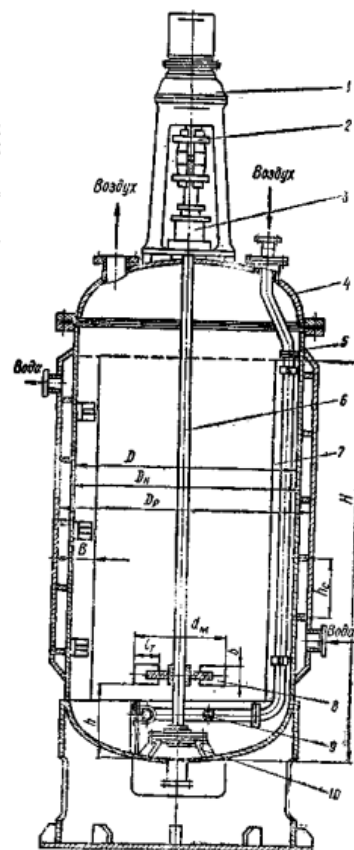


Рис.5.1. Загальний вид ферментеру з механічним перемішуючим пристроєм і барботером [43]:

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 9204. 00.000 ПЗ

Арк.

84

1 - привод перемішуючого приладу; 2 - муфта; 3 - ущільнення валу; 4 - кришка корпусу; 5 - корпус; 6 - вал перемішуючого пристрою; 7 - відбивні перегородки; 8 - мішалка; 9 - барботер; 10 - кінцева опора валу.

5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Вихідні дані для розрахунку:

- об'єм апарата: $V = 6,3 \text{ м}^3$;
- коефіцієнт заповнення: $\varphi = 0,6$;
- температура в апараті: $t_c = 28 \text{ }^\circ\text{C}$;
- тривалість культивування: $\tau_k = 24 \text{ год} = 86\,400 \text{ с}$;
- інтенсивність аерації: $0,7 \text{ м}^3/(\text{м}^3 \cdot \text{хв})$;
- холодний теплоносіє: вода.

5.2.1. Визначення теплофізичних властивостей середовища

Враховуючи склад поживного середовища, доцільно визначити його теплофізичні властивості відповідно до вмісту глюкози ($C = 4 \%$). Тоді:

- густина поживного середовища $\rho_c = 1013,8 \text{ кг} / \text{м}^3$;
- коефіцієнт динамічної в'язкості поживного середовища $\mu_c = 0,316 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$;
- коефіцієнт кінематичної в'язкості поживного середовища
$$\nu_c = \frac{\mu_c}{\rho_c} = \frac{0,316 \cdot 10^{-3}}{1013,8} = 0,312 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2 / \text{с} [44];$$
- теплоємність поживного середовища
$$c_c = 4190 - ((2514 - 7,54 t_c) \cdot C) = 4190 - ((2514 - 7,54 \cdot 28) \cdot 0,04) = 4097,88 \text{ Дж} / (\text{кг} \cdot \text{K}) [45];$$
- коефіцієнт теплопровідності поживного середовища $\lambda_c = 0,598 \text{ Вт} / (\text{м} \cdot \text{K}) [44]$
- критерій Прандтля
$$\text{Pr}_c = \frac{c_c \cdot \mu_c}{\lambda_c} = \frac{4097,88 \cdot 0,316 \cdot 10^{-3}}{0,598} = 2,16$$

5.2.2. Конструктивний розрахунок

Розраховуємо робочий об'єм апарата:

$$V_p = V \cdot \varphi = 6,3 \cdot 0,6 = 3,78 \text{ м}^3.$$

Відповідно до ГОСТ 20680-75 визначаємо характеристики ферментера обраного об'єму:

- внутрішній діаметр апарата $D = 1,6 \text{ м}$;
- висота корпусу апарата $H = 3,35 \text{ м}$.

Відповідно до ГОСТ 6533-78 визначаємо розміри днища апарату:

- висота борта $h_1 = 0,04 \text{ м}$;
- висота еліптичної частини днища $h_g = 0,4 \text{ м}$;
- товщина стінки днища $s_{ст} = 0,01 \text{ м}$;
- внутрішня поверхня днища $F = 2,98 \text{ м}^2$;
- об'єм днища $V_{дн.} = 0,6141 \text{ м}^3$;
- маса днища $m = 237,1 \text{ кг}$.

Розраховуємо повну висоту днища:

$$h_{дн.} = h_1 + h_g = 0,04 + 0,4 = 0,44 \text{ м}.$$

Розраховуємо об'єм циліндричної частини апарата:

$$V_{ц} = V - 2V_{дн.} = 6,3 - 2 \cdot 0,6141 = 5,0718 \text{ м}^3.$$

Розраховуємо площу основи циліндричної частини:

$$F_{ос.ц.} = \frac{\pi D^2}{4} = \frac{\pi \cdot 1,6^2}{4} = 2,01 \text{ м}^2.$$

Розраховуємо висоту циліндричної частини:

$$h_{ц} = \frac{V_{ц}}{F_{ос.ц.}} = \frac{5,0718}{2,01} = 2,52 \text{ м}.$$

Розраховуємо висоту апарата:

$$h_{н.ан.} = h_{ц} + 2h_{дн.} = 2,52 + 2 \cdot 0,44 = 3,4 \text{ м}.$$

Розраховуємо висоту рівня рідини в апараті:

$$H_p = \frac{4(V_p - V_{\text{дн}})}{\pi D^2} + h_{\text{дн.}} = \frac{4(3,78 - 0,6141)}{\pi(1,6)^2} + 0,44 = 2,01 \text{ м.}$$

5.2.3. Розрахунок перемішування

Відповідно до ГОСТ 20680-75 діаметр мішалки повинен відповідати співвідношенню:

$$d_m = \frac{D}{3 \div 4} = \frac{1,6}{3 \div 4} = 0,4 \div 0,53 \text{ м.}$$

Обираємо стандартний діаметр мішалки:

$$d_m = 0,5 \text{ м}$$

За співвідношенням діаметру мішалки та її основних розмірів визначаємо останні.

Висота мішалки:

$$h_m = 0,2 \cdot d_m = 0,2 \cdot 0,5 = 0,1 \text{ м.}$$

Висота розміщення мішалки над днищем апарата:

$$h = (0,4 \div 1)d_m = (0,4 \div 1) \cdot 0,5 = 0,2 \div 0,5 = 0,4 \text{ м.}$$

Довжина лопаті мішалки:

$$l = 0,25d_m = 0,25 \cdot 0,5 = 0,125 \text{ м.}$$

Товщина відбивної перегородки:

$$b = 0,1d_m = 0,1 \cdot 0,5 = 0,05 \text{ м.}$$

Коефіцієнт гідравлічного опору турбінної мішалки:

$$\xi_M = 8,4.$$

Кількість мішалок:

$$z_m = 1.$$

Обираємо стандартний діаметр вала мішалки для даного об'єму апарата:

$$d_{\text{в}} = 0,08 \text{ м.}$$

Розрахунок глибини воронки

Відповідно до описаної технології частота обертання мішалки становить 140 об/хв:

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						87
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$n = 2,33 \text{ c}^{-1}.$$

Округлюємо до найближчого стандартного значення:

$$n = 2,67 \text{ c}^{-1}.$$

Розраховуємо параметр висоти завантаження апарата:

$$\gamma = 8 \frac{H_p}{D} + 1 = 8 \frac{2,01}{1,6} + 1 = 11,05.$$

Розраховуємо центробіжний критерій Рейнольдса за формулою:

$$\text{Re}_u = \frac{\rho_c n d_m^2}{\mu_c} = \frac{1013,8 \cdot 2,67 \cdot 0,5^2}{0,316 \cdot 10^{-3}} = 2141492,09.$$

Розраховуємо параметр гідравлічного опору мішалки:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_m z_m R_u^{0,25}} = \frac{11,05}{8,4 \cdot 1 \cdot 2141492,09^{0,25}} = 0,034.$$

За значенням параметру Е на рис. 5.3 визначаємо параметр розподілення швидкості.

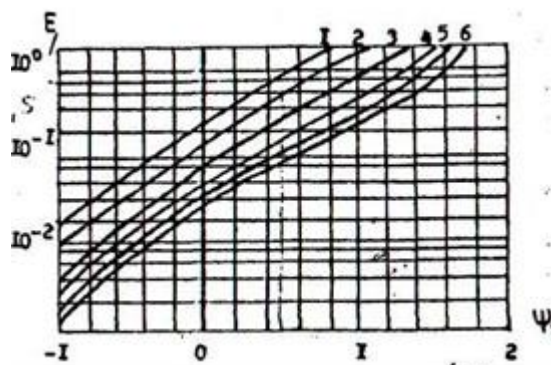


Рисунок 5.3. Параметр розподілення швидкості $\psi = f(E)$ для мішалок: трьохлопастної (01), турбінної відкритої (03), шестилопастної (05), лопастної (07), емальованих лопастної, фрезерної та пропелерної при $z_D \geq 1,5$

$$\psi_1 = -0,25$$

За цим параметром знаходимо параметр глибини воронки В на рис. 5.4.

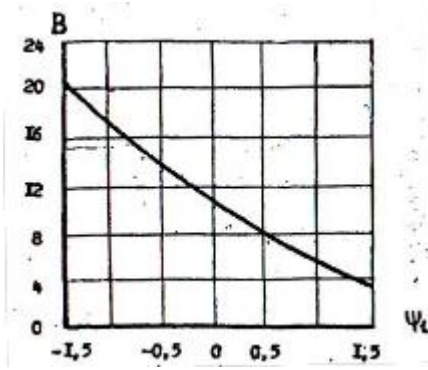


Рисунок 5.4. Параметр глибини воронки $B = f(\psi_1)$

$$B = 4,4$$

Розраховуємо глибину воронки:

$$h_B = \frac{Bn^2 d_m^2}{2} = \frac{4,4 \cdot 2,67^2 \cdot 0,5^2}{2} = 3,92 \text{ м.}$$

Розраховуємо гранично допустиму глибину воронки:

$$h_{zp} = H_p - h = 2,01 - 0,4 = 1,61 \text{ м.}$$

Оскільки $h_B > h_{zp}$, то в апараті встановлюються відбивні перегородки (4 од.).

Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

За графіком (рис. 5.5) знаходимо коефіцієнт потужності, який залежить від $Re_{ц.}$

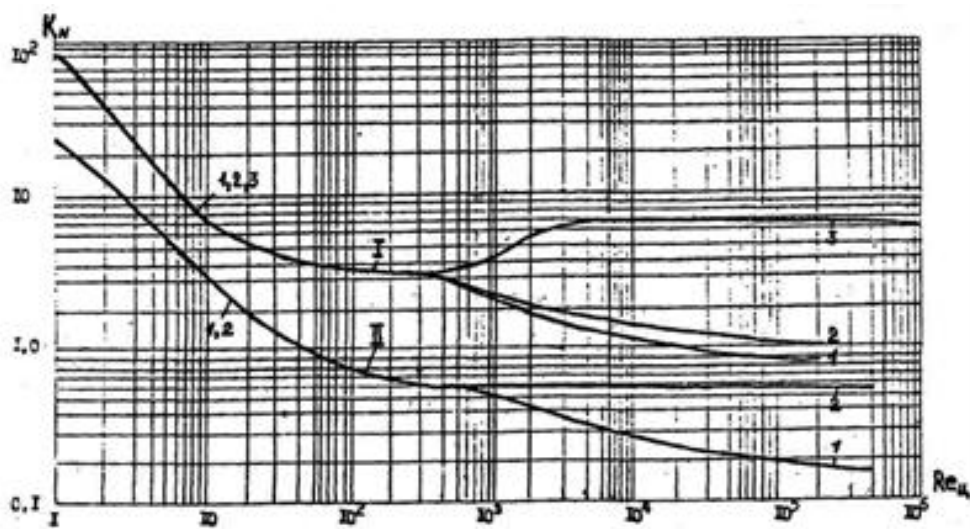


Рисунок 5.5. Число $K_N = f(Re_{ц})$ для мішалок: I – турбінна відкрита, 3 – в апараті з перегородками

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 9204. 00.000 ПЗ

Арк.

89

$$K_N = 6$$

Розраховуємо потужність, що витрачається на перемішування:

$$N = K_N \cdot \rho_c \cdot n^3 \cdot d_m^5 = 6 \cdot 1013,8 \cdot 2,67^3 \cdot 0,5^5 = 3618,16 \text{ Вт}.$$

Розрахунок потужності привода мішалки

Розраховуємо потужність, що витрачається на тертя в одинарному торцевому ущільненні:

$$N_{ущ} = 6020 d_6^{1,3} = 6020 \cdot 0,08^{1,3} = 225,74 \text{ Вт}.$$

Розраховуємо коефіцієнт, що враховує рівень рідини в апараті:

$$K_H = \sqrt{\frac{H_p}{D}} = \sqrt{\frac{2,01}{1,6}} = 1,12.$$

Розраховуємо потужність привода мішалки за формулою:

$$N_{ел} = \frac{(K_n K_H \cdot \sum K_i \cdot N + N_{ущ})}{\eta},$$

де $K_n = 1$ для апаратів з перегородками; K_i – коефіцієнти, які враховують витрати потужності на подолання опору внутрішніх пристроїв ферментера ($K_i = 1,1 \div 1,2$ приймають за наявності в апараті гільзи термометра, труби передавлювання, пристрою для вимірювання рівня рідини, $K_i = 2$ приймають за наявності змійовика, що розміщений вздовж стінки реактора.); $\sum K_i = 1,8$ для апарата з перегородками, трубою передавлювання та гільзою термометра; $\eta = 0,85 \div 0,9$ – коефіцієнт корисної дії привода.

$$N_{ел} = \frac{1 \cdot 1,12 \cdot 1,8 \cdot 3618,16 + 225,74}{0,9} = 8355,5 \text{ Вт}.$$

Відповідно до ГОСТ 12139-84 обираємо привод із номінальною потужністю 11 кВт.

Розрахунок барботера

Розраховуємо висоту мішалки над барботером:

$$h_\delta = 0,25 d_m = 0,25 \cdot 0,5 = 0,125 \text{ м}.$$

Оскільки на 1 м^3 поживного середовища треба $0,7 \text{ м}^3$ повітря на 1 хв, розраховуємо витрату повітря, яке подається в ферментер:

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						90
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$W_z = V_p \cdot \frac{0,7}{60} = 3,78 \cdot \frac{0,7}{60} = 0,0441 \text{ м}^3 / \text{с}.$$

Приймаємо швидкість газу в трубі барботера $w_6 = 20 \text{ м} / \text{с}$. Розраховуємо внутрішній діаметр труби барботера:

$$d_{6.в.} = \sqrt{\frac{4W_z}{\pi w_6}} = \sqrt{\frac{4 \cdot 0,0441}{\pi \cdot 20}} = 0,053 \text{ м}.$$

Приймаємо для барботера трубу стандартним діаметром $d_{6.н.} \times s_6 = 0,06 \times 0,0035 \text{ м}$.

Зі співвідношення визначаємо діаметр барботера:

$$D_6 = 6d_{6.н.} = 6 \cdot 0,06 = 0,36 \text{ м}.$$

Приймаємо, що швидкість газу в отворах барботера $w_o = 20 \text{ м} / \text{с}$, а діаметр отворів барботера $d_o = 5 \text{ мм} = 0,005 \text{ м}$.

Розраховуємо кількість отворів в барботері:

$$z_o = \frac{4W_z}{\pi d_o^2 w_o} = \frac{4 \cdot 0,0441}{\pi \cdot 0,005^2 \cdot 20} = 112,3 \approx 113 \text{ отв.}$$

Розраховуємо крок розміщення отворів:

$$t_{отв} = \frac{\pi D_6}{z_o} = \frac{\pi \cdot 0,36}{113} = 0,01 \text{ м}.$$

5.2.4. Тепловий розрахунок

Приймаємо, що теплофізичні властивості посівного матеріалу, поживного середовища та культуральної рідини співпадають. Об'єми поживного середовища та посівного матеріалу:

$$V_{nc} = 0,9 \cdot V_p = 0,9 \cdot 3,78 = 3,402 \text{ м}^3.$$

$$V_{nm} = 0,1 \cdot V_p = 0,1 \cdot 3,78 = 0,378 \text{ м}^3.$$

Розраховуємо маси поживного середовища, посівного матеріалу та культуральної рідини:

$$m_{nc} = V_{nc} \rho_c = 3,402 \cdot 1013,8 = 3448,95 \text{ кг}.$$

$$m_{nm} = V_{nm} \rho_c = 0,378 \cdot 1013,8 = 383,22 \text{ кг}.$$

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						91
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$m_{кр} = V_p \rho_c = 3,78 \cdot 1013,8 = 3832,16 \text{ кг}.$$

Енергія надходить у ферментер:

1) із поживним середовищем:

$$E_{nc} = m_{nc} c_c t_c = 3448,95 \cdot 4097,88 \cdot 28 = 395,73 \cdot 10^6 \text{ Дж} = 395,73 \text{ МДж}.$$

2) із посівним матеріалом:

$$E_{nm} = m_{nm} c_c t_c = 383,22 \cdot 4097,88 \cdot 28 = 43,97 \cdot 10^6 \text{ Дж} = 43,97 \text{ МДж}.$$

3) із повітрям:

$$E_{пов.над.} = \rho_{пов.} \cdot W_z \cdot c_{пов.} \cdot t_{пов.} \cdot \tau_k,$$

де $\rho_{пов.}$ – густина повітря при температурі 28 °С ($\rho_{пов.} = 1,173 \text{ кг/м}^3$); $c_{пов.}$ – питома теплоємність повітря ($c_{пов.} = 1000 \text{ Дж/(кг} \cdot \text{К)}$).

$$E_{пов.над.} = 1,173 \cdot 0,0441 \cdot 1000 \cdot 28 \cdot 86400 = 125,14 \cdot 10^6 \text{ Дж} = 125,14 \text{ МДж}.$$

4) теплота, яка виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішувачів пристроїв:

$$E_{дис.} = N \cdot \tau_k = 3618,16 \cdot 86400 = 312,61 \cdot 10^6 \text{ Дж} = 312,61 \text{ МДж}.$$

5) теплота, яка виділяється в процесі дисиміляції цукрів:

$$E_{цук.} = m_{цук.} \cdot q_{цук.},$$

де $m_{цук.}$ – маса цукру, яка є сумою маси глюкози та маси цукру в дріжджовому екстракті (1,6 % цукру):

$$m_{цук.} = m_{nc} (C_{гл.} + C_{др.ек.} \cdot C_{цук.др.ек.}) = 3448,95 \cdot (0,04 + 0,01 \cdot 0,016) = 138,51 \text{ кг}; \quad q_{цук.} = 16,7 \text{ МДж/кг}.$$

$$E_{цук.} = 138,51 \cdot 16,7 \cdot 10^6 = 2313,12 \cdot 10^6 \text{ Дж} = 2313,12 \text{ МДж}.$$

Визначаємо сумарне надходження енергії до ферментера:

$$\Sigma E_{надх.} = E_{nc} + E_{nm} + E_{пов.над.} + E_{дис.} + E_{цук.} = 395,73 + 43,97 + 125,14 + 312,61 + 2313,12 = 3190,57 \text{ МДж}$$

Витрати теплової енергії відбуваються:

1) із культуральною рідиною:

$$E_{кр} = m_{кр} c_c t_c = 3832,16 \cdot 4097,88 \cdot 28 = 439,7 \cdot 10^6 \text{ Дж} = 439,7 \text{ МДж}.$$

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						92
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2) із повітрям:

$$E_{\text{нов.вит.}} = 1,173 \cdot 0,0441 \cdot 1000 \cdot 28 \cdot 86400 = 125,14 \cdot 10^6 \text{ Дж} = 125,14 \text{ МДж}.$$

3) втрати теплоти в навколишнє середовище приймаємо 2 % від усіх витрат:

$$E_{\text{втр.}} = 0,02 \cdot (E_{\text{кр}} + E_{\text{нов.вит.}}) = 0,02 \cdot (439,7 + 125,14) = 11,3 \text{ МДж}.$$

Визначаємо сумарні витрати теплоти:

$$\Sigma E_{\text{вит.}} = E_{\text{кр}} + E_{\text{нов.вит.}} + E_{\text{втр.}} = 439,7 + 125,14 + 11,3 = 576,14 \text{ МДж}.$$

Теплове навантаження у ферментері:

$$E_m = \Sigma E_{\text{надх.}} - \Sigma E_{\text{вит.}} = 3190,57 - 576,14 = 2614,43 \text{ МДж}.$$

Оскільки $E > 0$, то для підтримання заданої температури культивування необхідно проводити охолодження.

Приймаємо початкову температуру теплоносія $t_1 = 15^\circ\text{C}$, кінцеву – $t_2 = 23^\circ\text{C}$, тоді різниця між ними – $\Delta t = t_2 - t_1 = 23 - 15 = 8^\circ\text{C}$.

Розраховуємо середню температуру води:

$$t_{\text{ср}} = \frac{t_1 + t_2}{2} = \frac{15 + 23}{2} = 19^\circ\text{C}.$$

Визначаємо теплофізичні параметри води за цієї температури:

$$\rho_{\text{в}} = 998,2 \text{ кг} / \text{м}^3;$$

$$\nu_{\text{в}} = 1,04 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2 / \text{с};$$

$$c_{\text{в}} = 4190 \text{ Дж} / (\text{кг} \cdot \text{K});$$

$$\lambda_{\text{в}} = 0,597 \text{ Вт} / (\text{м} \cdot \text{K});$$

$$\text{Pr}_{\text{в}} = 7,27.$$

Розраховуємо тепловий потік:

$$Q = \frac{E_m}{\tau_{\text{к}}} = \frac{2614,43 \cdot 10^6}{86400} = 30,26 \cdot 10^3 \text{ Вт}.$$

Розраховуємо витрату води для відведення тепла:

$$G_{\text{в}} = \frac{Q}{c_{\text{в}} \cdot \Delta t} = \frac{30,26 \cdot 10^3}{4190 \cdot 8} = 0,9 \text{ кг} / \text{с}.$$

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						93
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Розраховуємо меншу та більшу різниці температур:

$$\Delta t_m = t_c - t_2 = 28 - 23 = 5 \text{ } ^\circ\text{C}.$$

$$\Delta t_\theta = t_c - t_1 = 28 - 15 = 13 \text{ } ^\circ\text{C}.$$

$$\frac{\Delta t_\theta}{\Delta t_m} = \frac{13}{5} = 2,6 > 2, \quad \text{тоді середня різниця температур теплоносіїв}$$

розраховується за формулою:

$$\Delta t_{cp} = \frac{\Delta t_\theta - \Delta t_m}{\ln \frac{\Delta t_\theta}{\Delta t_m}} = \frac{13 - 5}{\ln \frac{13}{5}} = 8,37.$$

Визначення коефіцієнта тепловіддачі середовища в реакторі

Розраховуємо критерій Нуссельта:

$$Nu_1 = C \cdot Re_y^\alpha \cdot Pr_c^{0,33},$$

де C і α – коефіцієнти критеріального рівняння (для апарата з турбінною мішалкою та відбивними перегородками $C = 0,76$; $\alpha = 0,67$).

$$Nu_1 = 0,76 \cdot (2141492,09)^{0,67} \cdot 2,16^{0,33} = 17090,84.$$

Розраховуємо коефіцієнт тепловіддачі:

$$\alpha_1 = \frac{Nu_1 \cdot \lambda_c}{D} = \frac{17090,84 \cdot 0,598}{1,6} = 6387,7 \text{ Вт} / (\text{м}^2 \cdot \text{К}).$$

Визначення коефіцієнта тепловіддачі води в сорочці

Розраховуємо площу перетину сорочки:

$$f = 0,785(D_1^2 - (D + 2s)^2),$$

де D_1 – внутрішній діаметр сорочки ферментера ($D_1 = D + (0,1 \div 0,3) = 1,6 + 0,2 = 1,8 \text{ м}$).

$$f = 0,785(1,8^2 - (1,6 + 2 \cdot 0,01)^2) = 0,483 \text{ м}^2.$$

Розраховуємо швидкість води в сорочці:

$$w_\theta = \frac{G_\theta}{\rho_\theta f} = \frac{0,9}{998,2 \cdot 0,483} = 0,00187 \text{ м} / \text{с}.$$

Розраховуємо критерій Рейнольдса:

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						94
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$Re_2 = \frac{w_{\text{в}} \cdot (D_1 - (D + 2s))}{\nu_{\text{в}}} = \frac{0,00187 \cdot (1,8 - (1,6 + 2 \cdot 0,01))}{1,04 \cdot 10^{-6}} = 323,65.$$

$Re_2 < 2300$, відповідно, режим руху води – ламінарний.

Приймаємо, що температура стінки ферментера середня між температурою середовища та охолоджувальної води:

$$t_{cm} = \frac{t_c + t_{cp}}{2} = \frac{28 + 19}{2} = 23,5^\circ\text{C}.$$

Розраховуємо критерій Нуссельта:

$$Nu_2 = C \cdot (Gr \cdot Pr)^a,$$

де C і a – коефіцієнти, значення яких залежить від $(Gr \cdot Pr)$.

$$Gr \cdot Pr = H_c^3 (t_{cm} - t_{cp}) \cdot B,$$

де H_c – висота стінки сорочки ($H_c = H_p = 2,01 \text{ м}$); $B = 19,525 \cdot 10^9$ (для $t_{ст} = 23,5^\circ\text{C}$).

$$Gr \cdot Pr = 2,01^3 \cdot (23,5 - 19) \cdot 19,525 \cdot 10^9 = 713,5 \cdot 10^9.$$

$(Gr \cdot Pr) > 10^9$, тоді коефіцієнти: $C = 0,15$, $a = 0,33$.

$$Nu_2 = 0,15 \cdot (713,5 \cdot 10^9)^{0,33} = 1223,8.$$

Розраховуємо коефіцієнт тепловіддачі від води до стінки апарата:

$$\alpha_2 = \frac{Nu_2 \cdot \lambda_{\text{в}}}{H_c} = \frac{1223,8 \cdot 0,597}{2,01} = 363,49 \text{ Вт} / (\text{м}^2 \cdot \text{К}).$$

Визначення коефіцієнта теплопередачі

Розраховуємо коефіцієнт теплопередачі від середовища до охолоджуючої води:

$$K_m = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta_{cm}}{\lambda_{cm}} + \frac{1}{\alpha_2}},$$

де $\delta_{ст} = s$; $\lambda_{ст}$ – коефіцієнт теплопровідності стінки (приймаємо $17,5 \text{ Вт}/(\text{м} \cdot \text{К})$).

$$K_m = \frac{1}{\frac{1}{6387,7} + \frac{0,01}{17,5} + \frac{1}{363,49}} = 287,43 \text{ Вт} / (\text{м}^2 \cdot \text{К}).$$

З урахуванням забруднень на стінках:

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						95
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$K = 0,95K_m = 0,95 \cdot 287,43 = 273,06 \text{ Вт} / (\text{м}^2 \cdot \text{К}).$$

Розраховуємо необхідну площу поверхні охолодження ферментера:

$$F_n = \frac{Q}{K \Delta t_{cp} \tau_k} = \frac{30,26 \cdot 10^3}{273,06 \cdot 8,37} = 13,24 \text{ м}^2.$$

Розраховуємо дійсну площу поверхні теплообміну:

$$F_o = \pi D H_{роб.с.},$$

де $H_{роб.с.}$ – висота робочої частини сорочки (

$$H_{роб.с.} = H_c - h_{дн.} = 2,01 - 0,44 = 1,57 \text{ м}).$$

$$F_o = \pi \cdot 1,6 \cdot 1,57 = 7,89 \text{ м}^2$$

$F_o < F_n$, тоді площі поверхні охолодження ферментера не вистачає для підтримання температурного режиму культивування, необхідно встановити змійовик.

Розрахунок змійовика

Для розрахунку змійовика визначимо, яка частина теплового потоку припадає на сорочку.

$$Q_{cop} = F_o \cdot K \cdot \Delta t_{cp} = 7,89 \cdot 273,06 \cdot 8,37 = 18032,69 \text{ Вт}.$$

Розраховуємо частину теплового потоку, яка припадає на змійовик:

$$Q_{зм} = Q - Q_{cop} = 30,26 \cdot 10^3 - 18032,69 = 12227,31 \text{ Дж}.$$

Для охолодження обираємо внутрішні змійовики, які мають діаметр витка спіралі $D_s = 0,6 \text{ м}$, внутрішній діаметр труби $d_{вн} = 0,05 \text{ м}$, зовнішній діаметр труби $d_{зв} = 0,054 \text{ м}$ та, відповідно, товщину стінки $\delta_{ст} = 0,002 \text{ м}$.

Розраховуємо площу перетину каналу:

$$S_k = \frac{\pi d_{вн}^2}{4} = \frac{\pi \cdot 0,05^2}{4} = 0,00196 \text{ м}^2.$$

Температура охолоджуючої води на вході та на виході в змійовик відповідає температурі води на вході та на виході з сорочки.

Розраховуємо витрату води для відведення тепла у змійовику:

$$G_{в.зм} = \frac{Q_{зм}}{c_g \cdot \Delta t} = \frac{12227,31}{4190 \cdot 8} = 0,36 \text{ кг} / \text{с}.$$

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		96

Розраховуємо швидкість течії води в каналі:

$$w_{\epsilon.3M} = \frac{G_{\epsilon.3M}}{S_{\kappa} \rho_{\epsilon}} = \frac{0,36}{0,00196 \cdot 998,2} = 0,18 \text{ м / с.}$$

Визначаємо коефіцієнт динамічної в'язкості середовища при температурі стінки [44]:

$$\mu_{cm} = 0,414 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с.}$$

Для подальшого розрахунку необхідно визначити симплекси геометричної подібності. Для обраного апарата $\Gamma_{D_0} = \Gamma_{H_0} = 3$. Розрахункові значення знаходяться за формулами:

$$\Gamma_D = \frac{D}{d_m} = \frac{1,6}{0,5} = 3,2,$$

$$\Gamma_H = \frac{H_p}{d_m} = \frac{2,01}{0,5} = 4,02.$$

Розраховуємо коефіцієнт Нуссельта:

$$\begin{aligned} Nu_{3M.1} &= 0,76 \left(\frac{nd_m^2 \rho_c}{\mu_c} \right)^{0,67} Pr_c^{0,33} \left(\frac{\mu_c}{\mu_{cm}} \right)^{0,14} \left(\frac{\Gamma_D}{\Gamma_{D_0}} \right)^{-0,13} \left(\frac{\Gamma_H}{\Gamma_{H_0}} \right)^{-0,56} = \\ &= 0,76 \left(\frac{2,67 \cdot 0,5^2 \cdot 1013,8}{0,316 \cdot 10^{-3}} \right)^{0,67} \cdot 2,16^{0,33} \cdot \left(\frac{0,316 \cdot 10^{-3}}{0,414 \cdot 10^{-3}} \right)^{0,14} \cdot \left(\frac{3,2}{3} \right)^{-0,13} \cdot \left(\frac{4,02}{3} \right)^{-0,56} = 13852,15. \end{aligned}$$

Розраховуємо коефіцієнт тепловіддачі:

$$\alpha_{3M.1} = \frac{Nu_{3M.1} \cdot \lambda_c}{D_{\epsilon}} = \frac{13852,15 \cdot 0,598}{0,6} = 13805,98 \text{ Вт / (м}^2 \cdot \text{К)}.$$

Розраховуємо коефіцієнт, який враховує кривизну спіралі:

$$X = 1 + 3,54 \frac{d_{\epsilon H}}{D_{\epsilon}} = 1 + 3,54 \frac{0,05}{0,6} = 1,295.$$

Визначаємо критерій Прандтля для води при температурі стінки:

$$Pr_{cm} = 6,46.$$

Критерій Рейнольдса розраховується за формулою:

$$Re_{3M.2} = \frac{w_{\epsilon.3M} d_{\epsilon H}}{\nu_{\epsilon}} = \frac{0,18 \cdot 0,05}{1,04 \cdot 10^{-6}} = 8653,85.$$

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						97
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Розраховуємо критерій Нуссельта:

$$Nu_{зм.2} = 0,021 Re_{зм.2}^{0,8} Pr_6^{0,43} X = 0,021 \cdot 8653,85^{0,8} \cdot 7,27^{0,43} \cdot 1,295 = 90,1.$$

Розраховуємо коефіцієнт тепловіддачі:

$$\alpha_{зм.2} = \frac{Nu_{зм.2} \lambda_6}{d_{вн}} = \frac{90,1 \cdot 0,597}{0,05} = 1075,8 \text{ Вт} / (\text{м}^2 \cdot \text{К}).$$

Розраховуємо коефіцієнт теплопередачі для зміювика:

$$K_{зм.т} = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_{зм.1}} + \frac{\delta_{ст}}{\lambda_{ст}} + \frac{1}{\alpha_{зм.2}}} = \frac{1}{\frac{1}{13805,98} + \frac{0,002}{17,5} + \frac{1}{1075,8}} = 895,85 \text{ Вт} / (\text{м}^2 \cdot \text{К}).$$

З урахуванням забруднень на стінках:

$$K_{зм} = 0,95 K_{зм.т} = 0,95 \cdot 895,85 = 851,06 \text{ Вт} / (\text{м}^2 \cdot \text{К}).$$

Розраховуємо площу поверхні охолодження зміювика:

$$F_{зм} = \frac{Q_{зм}}{K_{зм} \Delta t_{ср}} = \frac{12227,31}{851,06 \cdot 8,37} = 1,72 \text{ м}^2.$$

Розраховуємо довжину труби зміювика:

$$L = \frac{F_{зм}}{\pi d_{зв}} = \frac{1,72}{\pi \cdot 0,054} = 10,14 \text{ м}.$$

Розраховуємо довжину витка зміювика:

$$l = \pi \cdot 0,6 = 1,885 \text{ м}.$$

Розраховуємо кількість витків у спіралі:

$$N = \frac{L}{l} = \frac{10,14}{1,885} = 5,38 \approx 6 \text{ в.}$$

Приймаємо, що відстань між витками дорівнює внутрішньому діаметру труби зміювика. У такому випадку висота зміювика:

$$H_{зм} = N d_{зв} + (N - 1) d_{вн} = 6 \cdot 0,054 + 5 \cdot 0,05 = 0,574 \text{ м}.$$

$h_y > H_{зм}$, тому для підтримання температурного режиму культивування встановлюємо у ферментер сорочку та розрахований зміювик.

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

Деякі етапи технологічного процесу вимагають переміщення посівного

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						98
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

матеріалу, поживного середовища та інших по трубопроводах. Крім того, необхідно постачати шкідливі та вибухонебезпечні речовини, такі як етанол. Для цього використовуються герметичні відцентровані насоси типу ХГ та ЦГ у вибухозахищеному виконанні та мають корпус стійкий до корозії. Ці насоси запобігають викидам речовин у навколишнє середовище завдяки відсутності сальникових і торцевих ущільнень. Вони також не допускають інфікування середовища та просочування парів етанолу. Крім того, підшипники насосів змащуються рідиною, що перекачується, тому не забруднюються змащувальним матеріалом. Основна частина насосу виготовлена з нержавіючої сталі Х18Н10Т [46].

У системах промислової вентиляції, пневмотранспортних системах та інших установках широко використовуються вентилятори. Вентилятори поділяються на два типи залежно від принципу їх дії: центробіжні та осьові. При виборі типу вентилятора враховують задані параметри, такі як тиск, продуктивність, концентрація механічних домішок у повітрі, температура газів та інші фактори.

Для ефективного протікання виробничих процесів у ферментері, необхідно забезпечувати виконання додаткових операцій: постачання середовища до ферментора та подача води для охолодження оболонки. Для вирішення цих завдань, рекомендується використовувати насос з електричним двигуном. За розрахунками виявлено, що необхідний електродвигун потужністю 11 кВт, тому було обрано тип АІР132М4 [47].

Було також обрано типовий головний фільтр НЕРА Н 11 з ефективністю очищення на рівні 95%.

На мікробіологічних підприємствах близько 85% води використовується для охолодження технологічного обладнання. Для цього розробляють систему зворотного водопостачання, яка дозволяє використовувати теплу, відпрацьовану воду. Під час контакту відпрацьованої, теплої, відносно чистої води зі струмом

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						99
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

повітря у градирнях відбувається її охолодження шляхом часткового випаровування.

5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Вимоги безпеки до ферментерів згідно з ГОСТ 31833-2012 «Устаткування для мікробіологічних виробництв. Апарати для гідролізу рослинної сировини. Ферментери»:

Ферментери повинні бути обладнані витяжними трубами, переріз яких повністю забезпечує видалення повітря, що подається для аерації, з робочих приміщень в атмосферу. Після стерилізації ферментерів, комунікацій та арматури, пар повинен бути відведений за межі будівель. Для визначення різних параметрів ферментери оснащуються контрольно-вимірювальними приладами, вони визначають температуру та рН середовища, рівень рідини в апараті згідно з технологічною схемою ведення процесу. Для введення кислоти заборонене ручне завантаження, для цього повинна забезпечуватися самостійна лінія подачі кислоти. Для відбору проб з ферментерів використовуються методи, при яких обслуговуючий персонал уникає контакту з культуральною рідиною. Всі процеси пов'язані з ферментерами проводяться відповідно до регламентів та експлуатаційних документів, затверджених у встановленому порядку.

Протягом усього терміну служби обладнання для мікробіологічних виробництв повинно відповідати вимогам безпеки згідно з ГОСТ 12.2.003. Обладнання має забезпечувати вимоги безпеки під час виготовлення, монтажу, експлуатації, ремонту, транспортування та зберігання при використанні як автономно, так і в складі технологічних ліній. Визначений термін служби обладнання (призначений ресурс) повинен бути зазначений у технічних документах, затверджених у встановленому порядку. Всі апарати повинні мати міцність та герметичність відносно зовнішнього середовища. Ступінь герметичності апаратів, а також способи їх випробування на герметичність, повинні визначатись згідно з нормативними документами держав, що прийняли цей стандарт.

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						100
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Обладнання, яке використовується під час технологічних процесів, повинно відповідати наступним вимогам безпеки: загальні вимоги безпеки згідно з ГОСТ 12.3.002; вимоги пожежної безпеки згідно з ГОСТ 12.1.004; вимоги вибухобезпеки згідно з ГОСТ 12.1.010; вимоги біологічної безпеки згідно з ГОСТ 12.1.008; загальні вимоги електробезпеки згідно з ГОСТ 12.1.019; загальні ергономічні вимоги згідно з ГОСТ 12.2.049. У виробничих приміщеннях необхідно постійно контролювати стан повітряного середовища, справність герметичних засобів обладнання, комунікацій, систем вентиляції та аспірації, не допускаючи перевищення значень ПДК згідно з ГОСТ 12.1.005.

Поверхні обладнання та трубопроводи з температурою понад 45 °С повинні бути ізольовані. Обладнання повинно мати надійне заземлення, яке захищає обслуговуючий персонал від ураження електричним струмом [48].

У промисловому виробництві, стічні води утворюються внаслідок технологічних процесів. Якість та концентрація зароджувальних речовин у стічних водах залежить від типу виробництва, вихідної сировини та режиму технологічних процесів. Склад та властивості стічних вод нормується за допомогою санітарно-хімічного аналізу, який включає хімічні, фізичні, фізико-хімічні та санітарно-бактеріологічні вимірювання, разом зі стандартними хімічними тестами. Технологія очищення стічних вод повинна забезпечити заданий рівень очищення при мінімальних витратах. Відповідно від необхідного рівня очищення та подальшого використання очищених вод, можуть використовуватися різноманітні технологічні схеми. Загальна схема очищення побутових стічних вод із використанням двоступеневої схеми включає механічну та біологічну очистку. Однак, з посиленням вимог до охорони навколишнього середовища та потреби у використанні очищених стічних вод у промисловості та сільському господарстві, розробляються технологічні схеми з глибокою біологічною очисткою стічних вод. У технологічній системі, споруди, призначені для механічної очистки, розташовуються у такому порядку, щоб спочатку видалити найбільші частки забруднення (решітки, сита), а потім

зосередитися на речовинах мінерального походження, зокрема піску (гідроциклони та піскоуловлювачі) та за допомогою відстійників видаляють основну масу менших завислих речовин та плаваючі речовини (нафтопродукти, жири, смоли, масла). Механічну очистку застосовують як попередній етап перед біохімічною [49].

					ДП 9204. 00.000 ПЗ	Арк.
						102
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВКИ

1. Обсяг світового ринку ретинолу в 2022 році оцінювався в 1,33 мільярда доларів США, і очікується, що з 2023 по 2030 рік він зростатиме на 3,8% у середньому за рік. Це пов'язано зі зростанням використання продукту в різних галузях застосування включаючи засоби особистої гігієни та косметики, корми для тварин, їжу та напої.
2. Було запропоновано вибір найефективнішого продуцента для виробництва ретинолу, а саме: *Y. lipolytica* CJ2104. Який був обраний за рахунок найбільшого показника синтезу ретинолу серед запропонованих - 4,86 г/л.
3. Представлено цільовий продукт, охарактеризовано його вплив на біохімічні процеси та запропоновано методи його очистки.
4. Розроблено схему отримання продуценту, який було використано в роботі та наведені оптимальні умови для його культивування: аерація – 0,6-0,7 м³, температура 28 °С, перемішування швидкістю 2,67 с⁻¹.
5. Розраховано матеріальний баланс ділянки біосинтезу ретинолу, вказано контрольні точки та охарактеризовано сировину, матеріали та напівпродукти, які необхідні в процесі виробництва.
6. Складено розрахунки конструкції апарату – ферментеру, для виробничого біосинтезу. Було обрано ферментер з об'ємом 6,3 м³ з механічним перемішуванням (відкрита турбінна мішалка) та барботером.
7. Згідно з вимогами розроблено апаратурну та технологічну схеми отримання ретинолу, який фасується в ампули по 2 мл в картонні коробки по 10 шт.

					ДП 9204. 00.000 ПЗ						
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							
Розробив.		Вітович Я.А.			ВИСНОВКИ			Стадія	Аркуш	Аркушів	
Консульт.		Шибецький В.Ю								103	109
Керівник		Литвинов Г.С.						КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ			
Затвер.											

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- [1] H. J. Jang *et al.*, “Retinoid production using metabolically engineered *Escherichia coli* with a two-phase culture system,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 10, pp. 1–12, 2011, doi: 10.1186/1475-2859-10-59.
- [2] N. Balchp. B. D. Houstone. Lamj. McMahonj. T. ViAROUGE, “Production of retinol, WO2019057998A1,” 2018
- [3] A. Triandafyllidou and M. McAuliffe, “Report overview,” *Migr. Smuggling Data Res.*, pp. 1–18, 2019, doi: 10.18356/e0636308-en.
- [4] Q. Hu, T. Zhang, H. Yu, and L. Ye, “Selective biosynthesis of retinol in *S. cerevisiae*,” *Bioresour. Bioprocess.*, vol. 9, no. 1, 2022, doi: 10.1186/s40643-022-00512-8.
- [5] H. Park *et al.*, “Efficient production of retinol in *Yarrowia lipolytica* by increasing stability using antioxidant and detergent extraction.,” *Metab. Eng.*, vol. 73, pp. 26–37, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.ymben.2022.06.001.
- [6] NCBI, “Taxonomy Browser.” url: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4952&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- [7] C. P. Kurtzman, J. W. Fell, and T. T. A.-T. T.- Boekhout, “The yeasts : a taxonomic study.” Elsevier Science, Burlington, 2011. doi: LK - <https://worldcat.org/title/700701893>.
- [8] M. E. Jach and A. Malm, “*Yarrowia lipolytica* as an Alternative and Valuable Source of Nutritional and Bioactive Compounds for Humans,” *Molecules*, vol. 27, no. 7, pp. 27–29, 2022, doi: 10.3390/molecules27072300.

					ДП 9204. 00.000 ПЗ				
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розробив.	Вітович Я.А.				СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	Стадія	Аркуш	Аркушів	
Консульт.	Шибєцький В.Ю.						104	109	
Керівник	Литвинов Г.С.					КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ			
Затвер.									

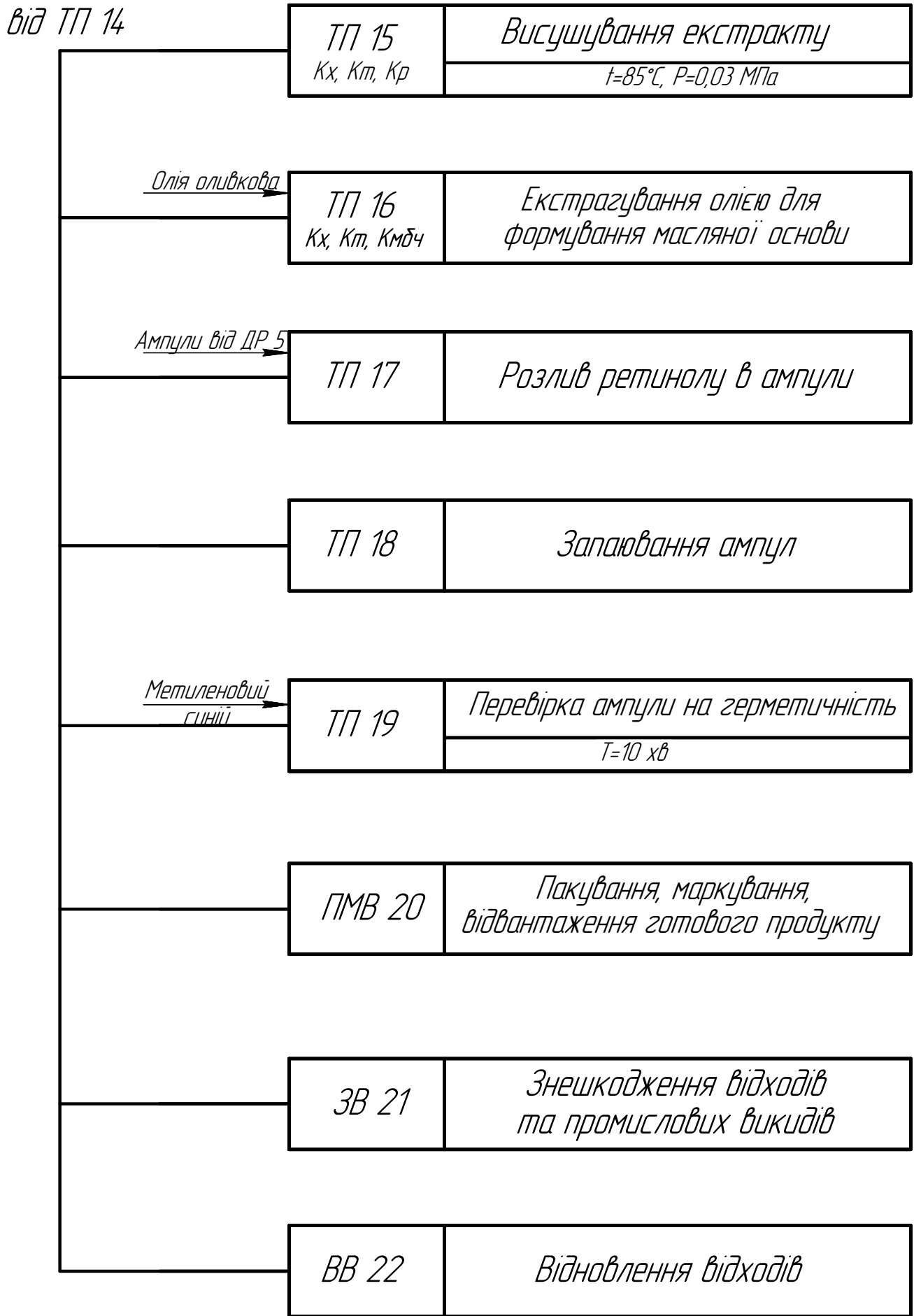
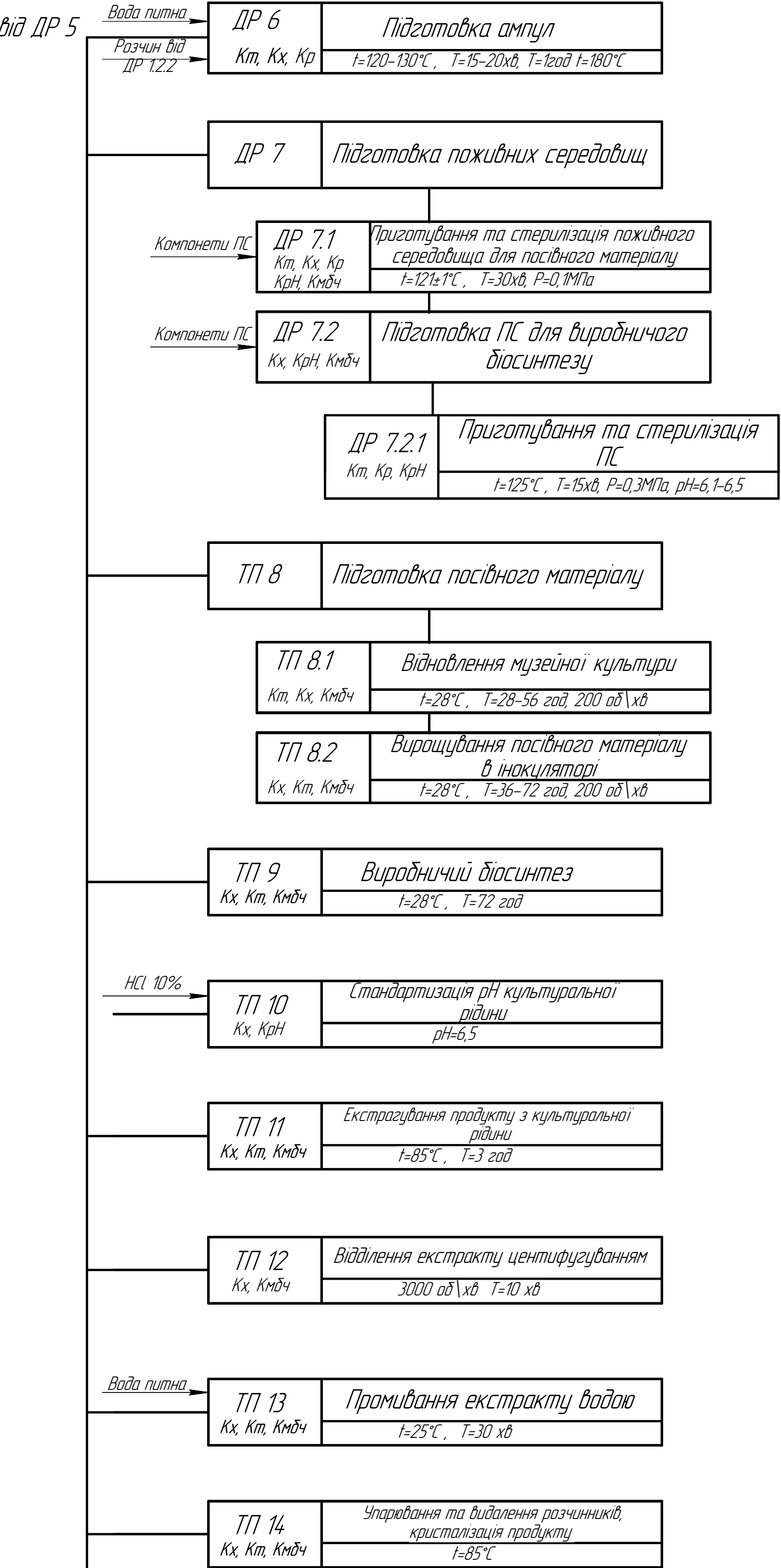
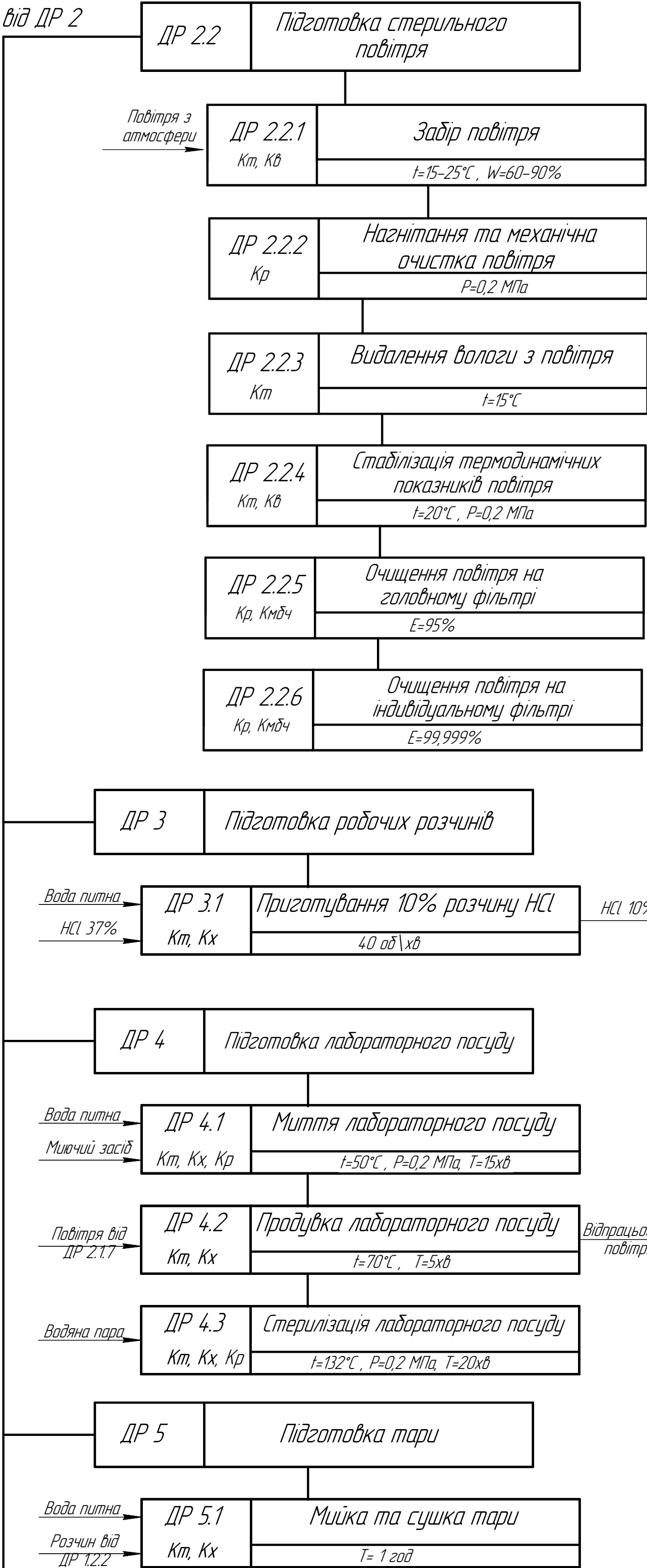
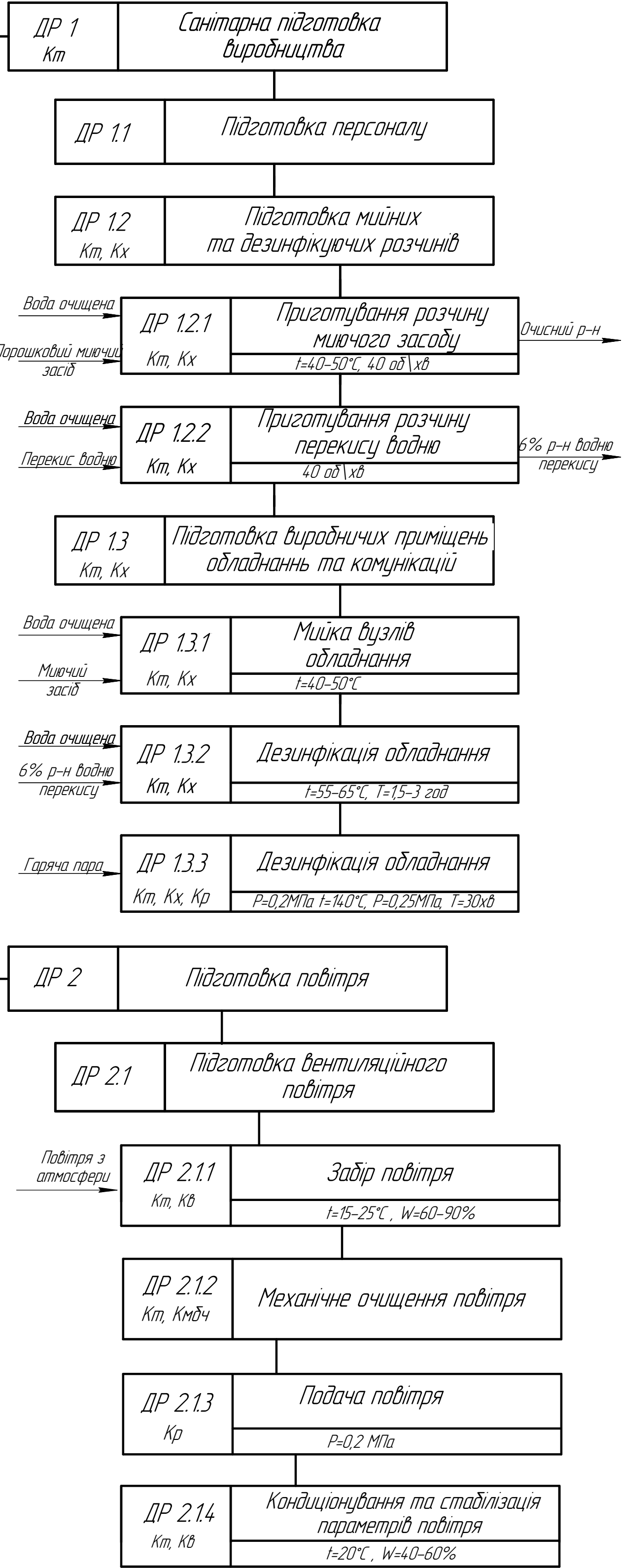
- [9] D. Mamaev and R. Zvyagilskaya, “Yarrowia lipolytica: A multitalented yeast species of ecological significance,” *FEMS Yeast Res.*, vol. 21, no. 2, pp. 1–18, 2021, doi: 10.1093/femsyr/foab008.
- [10] G. Barth and C. Gaillardin, “Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 19, no. 4, pp. 219–237, 1997, doi: 10.1016/S0168-6445(97)00002-8.
- [11] F. D. Harzevili, *Biotechnological Applications of the Yeast Yarrowia lipolytica*. Springer International Publishing, 2014. [Online]. Available: <https://books.google.com.ua/books?id=ZuNeAwAAQBAJ>
- [12] C. Madzak, “Yarrowia lipolytica strains and their biotechnological applications: How natural biodiversity and metabolic engineering could contribute to cell factories improvement,” *J. Fungi*, vol. 7, no. 7, 2021, doi: 10.3390/jof7070548.
- [13] A. Beopoulos, J. Cescut, R. Haddouche, J.-L. Uribe Larrea, C. Molina-Jouve, and J.-M. Nicaud, “Yarrowia lipolytica as a model for bio-oil production,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 48, no. 6, pp. 375–387, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.005>.
- [14] Y. K. Park and R. Ledesma-Amaro, “What makes *Yarrowia lipolytica* well suited for industry?,” *Trends Biotechnol.*, vol. 41, no. 2, pp. 242–254, 2023, doi: 10.1016/j.tibtech.2022.07.006.
- [15] M. Motamedi, A. Chehade, R. Sanghera, and P. Grewal, “A Clinician’s Guide to Topical Retinoids,” *J. Cutan. Med. Surg.*, vol. 26, no. 1, pp. 71–78, 2022, doi: 10.1177/12034754211035091.
- [16] G. J. Fisher and J. J. Voorhees, “Molecular mechanisms of retinoid actions in skin,” *FASEB J.*, vol. 10, no. 9, pp. 1002–1013, 1996, doi: 10.1096/fasebj.10.9.8801161.

- [17] T. Loftsson, “Degradation Pathways,” *Drug Stab. Pharm. Sci.*, pp. 63–104, 2014, doi: 10.1016/b978-0-12-411548-4.00003-9.
- [18] C. Rousselle, “Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) – Final version of the Opinion on Vitamin A (retinol, retinyl acetate and retinyl palmitate) in cosmetic products,” *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 84, no. October, pp. 102–104, 2017, doi: 10.1016/j.yrtph.2016.11.017.
- [19] H. M. Miziorko, “Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 505, no. 2, pp. 131–143, 2011, doi: 10.1016/j.abb.2010.09.028.
- [20] “Front Matter,” in *Medicinal Natural Products*, 2009, pp. i–x. doi: <https://doi.org/10.1002/9780470742761.fmatter>.
- [21] К. Е.В., “Біотехнологія мікроорганізмів,” 2020.
- [22] Ю. М. Краснопольский and Н. Ф. Клещев, *Фармацевтическая Биотехнология. Производство Биологически Активных Веществ. Часть II*. 2012.
- [23] M. M. Mcgrane, “Further Reading Mcgrane RETINOL:Physiology,” pp. 4957–4967.
- [24] S. Mukherjee, A. Date, V. Patravale, H. C. Korting, A. Roeder, and G. Weindl, “Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety,” *Clin. Interv. Aging*, vol. 1, no. 4, pp. 327–348, 2006, doi: 10.2147/cia.2006.1.4.327.
- [25] A. Wójcik, E. Bartnicka, P. Namieciński, and H. Rotsztein, “Influence of the complex of retinol–vitamin C on skin surface lipids,” *J. Cosmet. Dermatol.*, vol. 14, no. 2, pp. 92–99, Jun. 2015, doi: <https://doi.org/10.1111/jocd.12140>.

- [26] T. Livingston, D. Eberhardt, J. L. Edwards, and J. Godkin, "Retinol improves bovine embryonic development in vitro," *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 2, pp. 1–7, 2004, doi: 10.1186/1477-7827-2-83.
- [27] "Кафедра біохімії: Біохімічні основи вітамінології," 2015.
- [28] J. B. H. Kimberly A. Lee, Maria Nawrot, Gregory G. Garwin, John C. Saari, "Relationships between visual cycle retinoids, rhodopsin phosphorylation and phototransduction in mouse eyes during light and dark-adaptation," *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2010, doi: 10.1021/bi1001085.Relationships.
- [29] M. Clagett-Dame and D. Knutson, "Vitamin a in reproduction and development," *Nutrients*, vol. 3, no. 4, pp. 385–428, 2011, doi: 10.3390/nu3040385.
- [30] A. C. Ross, "Vitamin A, retinoids and immune responses," *Vitam. A Retin. An Updat. Biol. Asp. Clin. Appl.*, pp. 83–95, 2000, doi: 10.1007/978-3-0348-8454-9_7.
- [31] X. Li, J.-N. Ren, G. Fan, J. He, L.-L. Zhang, and S.-Y. Pan, "Genomic and transcriptomic analysis screening key genes for (+)-valencene biotransformation to (+)-nootkatone in *Yarrowia lipolytica*," *Microbiol. Res.*, vol. 260, p. 127042, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127042>.
- [32] J. M. Nicaud, "Yarrowia lipolytica," *Yeast*, vol. 29, no. 10, pp. 409–418, 2012, doi: 10.1002/yea.2921.
- [33] S. Kerscher, S. Dröse, K. Zwickler, V. Zickermann, and U. Brandt, "Yarrowia lipolytica, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1555, no. 1, pp. 83–91, 2002, doi: [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(02\)00259-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(02)00259-1).

- [34] F. Darvishi, J. Destain, I. Nahvi, P. Thonart, and H. Zarkesh-Esfahani, “High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate,” *N. Biotechnol.*, vol. 28, no. 6, pp. 756–760, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.02.002>.
- [35] Y. Jing, J. Wang, and M. Jiang, “Enhanced β -carotene production in *Yarrowia lipolytica* through the metabolic and fermentation engineering,” *Res. Sq. Prepr.*, no. April, pp. 1–21, 2022.
- [36] M. Larroude, E. Celinska, A. Back, S. Thomas, J. M. Nicaud, and R. Ledesma-Amaro, “A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 115, no. 2, pp. 464–472, 2018, doi: 10.1002/bit.26473.
- [37] X. Wang *et al.*, “Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Efficient Retinol Synthesis,” *J. Fungi*, vol. 9, no. 5, 2023, doi: 10.3390/jof9050512.
- [38] M. Liu, J. Zhang, J. Ye, Q. Qi, and J. Hou, “Morphological and Metabolic Engineering of *Yarrowia lipolytica* to Increase β -Carotene Production,” *ACS Synth. Biol.*, vol. 10, no. 12, pp. 3551–3560, 2021, doi: 10.1021/acssynbio.1c00480.
- [39] W. A. THOMSON, “The International Pharmacopoeia.,” *Practitioner*, vol. 168, no. 1004, pp. 166–170, 1952, doi: 10.5694/j.1326-5377.1952.tb84059.x.
- [40] “Дніпровський державний технічний університет «Устаткування галузі»,” 2019.
- [41] Т.Ю.Румянцева, “Теплообмін в рідинних сумішах при перемішуванні,” pp. 153–158.

- [42] Д. М. Закоморний, В. М. Поводзинський, and В. Ю. Шибецький,
“Classification and analysis of the fermenter with mechanical mixing devices in
aerobic processes of biotechnology,” *ScienceRise*, vol. 5, no. 2(10), p. 24, 2015,
doi: 10.15587/2313-8416.2015.42614.
- [43] В.Н.Стабнікова, “Проектування процесів і апаратів харчових
виробництв.” 1982.
- [44] Г. А. С. и Др., *Теплофізичні властивості харчових продуктів. Довідник.*
М., 1980.
- [45] BakerGroup., “Основи розрахунку теплообмінних апаратів та станцій для
приготування цукрових сиропів та карамельної маси.” url: [https://baker-
group.net/confectionery-formulations-technology-raw-materials-and-
ingredients/articles-about-the-confectionery-business/bases-for-design-of-heat-
exchangers-and-plants-for-the-preparation-of-sugar-syrup-and-caramel-
mass.html#comments](https://baker-group.net/confectionery-formulations-technology-raw-materials-and-ingredients/articles-about-the-confectionery-business/bases-for-design-of-heat-exchangers-and-plants-for-the-preparation-of-sugar-syrup-and-caramel-mass.html#comments)
- [46] “Українські насоси (Герметичні насоси ЦГ, ХГ).” url: [https://nasos-
ukraine.com.ua/ua/g5622463-nasosy-germetichnye-tsg](https://nasos-ukraine.com.ua/ua/g5622463-nasosy-germetichnye-tsg)
- [47] “Київсервісмонтаж.Електродвигун.” url:
<https://reduktora.com.ua/elektrodivgun-11-kvt-1500-ob-hv-ayr132m4.html>
- [48] “ГОСТ 31833-2012 ‘Устаткування для мікробіологічних виробництв.
Апарати для гідролізу рослинної сировини. Ферментери”
- [49] Т. С. Айрапетян, “«Очистка побутових стічних вод»,” 2014.

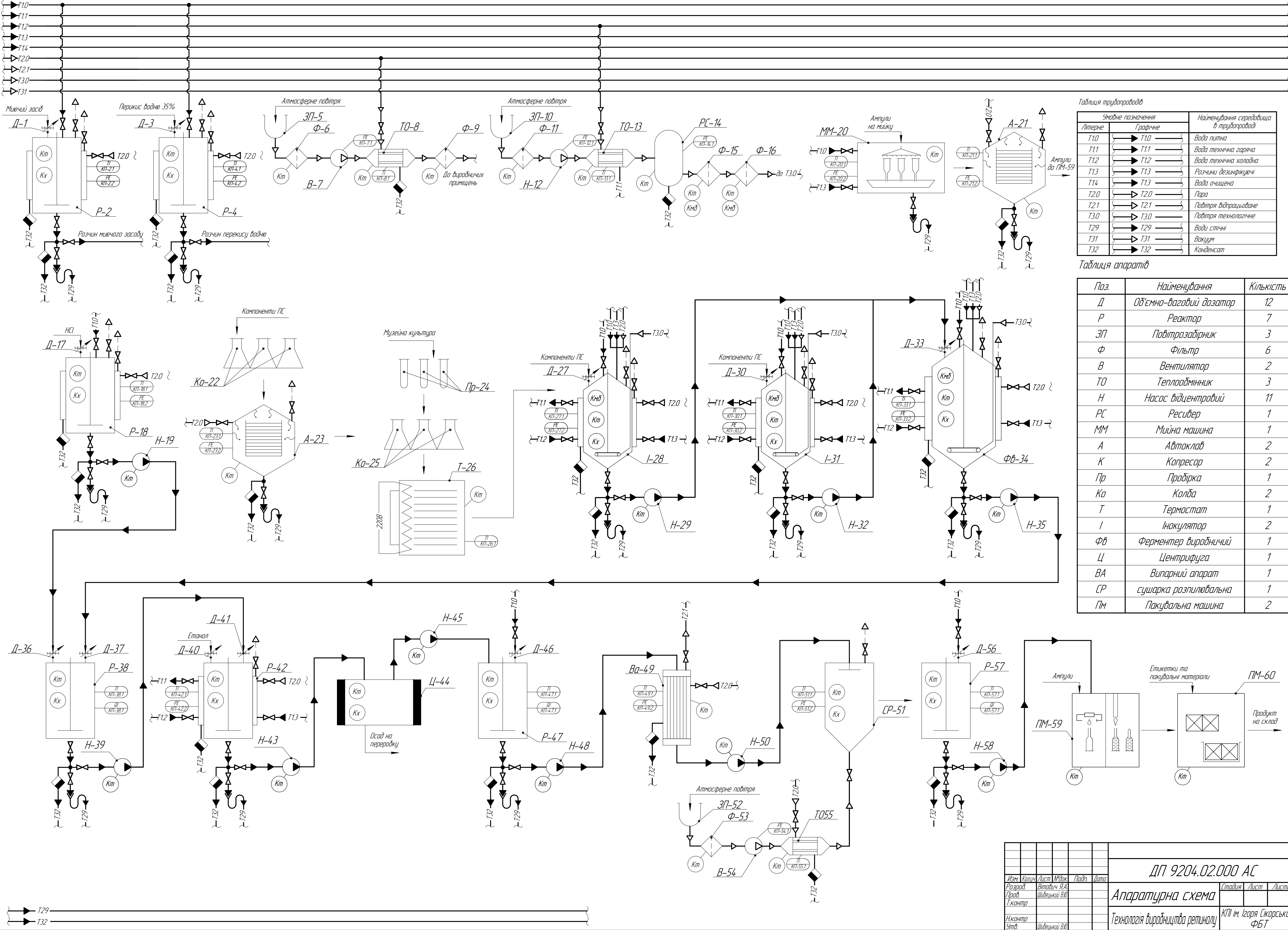


до ДР 2.2

до ДР 6

до ТП 15

Лист № 1
Взам. інв. №
Підп. і дата
Місц. № розд.



Таблиця трубопроводів

Умовне позначення		Найменування середовища в трубопроводі
Літерне	Графічне	
T10	→	Вода питна
T11	→	Вода технічна гаряча
T12	→	Вода технічна холодна
T13	→	Розчини дезінфікуючі
T14	→	Вода очищена
T20	→	Пара
T21	→	Повітря відпрацьоване
T30	→	Повітря технологічне
T29	→	Води стічні
T31	→	Вакуум
T32	→	Конденсат

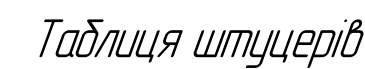
Таблиця апаратів

Поз.	Найменування	Кількість
Д	Об'ємно-ваговий дозатор	12
Р	Реактор	7
ЗП	Повітряздійрник	3
Ф	Фільтр	6
В	Вентилятор	2
ТО	Теплообмінник	3
Н	Насос відцентровий	11
РС	Ресивер	1
ММ	Мийна машина	1
А	Автоклав	2
К	Компресор	2
Пр	Продірка	1
Ко	Колба	2
Т	Термостат	1
І	Інкулятор	2
ФВ	Ферментер виробничий	1
Ц	Центрифуга	1
ВА	Випарний апарат	1
СП	сушарка розпилювальна	1
ПМ	Пакувальна машина	2

Ім.	Кол.	Лист	№ док.	Підп.	Дата
Розроб.	Витовч	Я.А.			
Пров.	Шибенький	В.В.			
Т.контр.					
Н.контр.					
Утв.	Шибенький	В.В.			

ДП 9204.02.000 АС		
Апаратурна схема	Стадія	Лист
	Лист	Листов
Технологія виробництва ретинолу		
КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

Формат А1



Позн.	Найменування	Указаний прохід Ду, мм	Указаний тиск Ру МПа
А	Люк	400	0,6
Б	Вхід теплоносія	100	0,6
В	Вихід теплоносія	100	0,6
Г	Вихід продукту	250	0,6
Д	Датчик рН-метра	25	0,6
Е	Гільза манометра	25	0,6
Ж	Вхід поживного середовища	150	0,6
И	Гільза термопар	25	0,6
К	Технологічний	50	0,6
Л	Запасний	50	0,6
М	Труба барботера	50	0,6
Н	Вхід теплоносія до змішувача	50	0,6
О	Вихід теплоагента зі змішувача	50	0,6

Позначення	Найменування	Кількість	Найменування та марка матеріалу	Додаткові вказівки
1	Привід	1	12х18Н10Т ГОСТ 5632-72	
2	Кришка	1	12х18Н10Т ГОСТ 5632-72	
3	Сарочка	1	Сталь 10 ДСТУ 2651:2005	
4	Вал	1	12х18Н10Т ГОСТ 5632-72	
5	Переміщуючий пристрій	1	12х18Н10Т ГОСТ 5632-72	
6	Днище	1	12х18Н10Т ГОСТ 5632-72	
7	Опора	4	12х18Н10Т ГОСТ 5632-72	

Технічна характеристика

- | | |
|--|---------------------------|
| 1. Апарат призначений для аеробного культивування <i>Yarrowia lipolytica</i> | |
| 2. Номінальний об'єм апарату, м ³ | 6,3 |
| 3. Коефіцієнт заповнення | 0,6 |
| 4. Тип перемішуючого пристрою | мішалка відкрита турбіна; |
| кількість мішалок | 1, |
| частота обертання валу мішалки, с ⁻¹ | 2,67; |
| потужність приводу, кВт | 11; |
| 8. Габаритні розміри: | |
| – довжина, мм | 2020 |
| – ширина, мм | 2165 |
| – висота, мм | 5200 |
| 9. Маса, кг | 1200 |

Технічні вимоги

1. Виготовлення, маркування, пакування та транспортування апарату у відповідності з вимогами ТУ 26-01-629-82.
2. Апарат виготовляти згідальним тиском – 0,6 МПа.
3. Апарат повинен бути теплоізоляований на місці монтажу, якщо цього потребують умови експлуатації.
4. Вскріпання поверхня та всі деталі, які стикаються з робочим середовищем емальовати універсальною емаллю вищого класу.
5. Апарат комплектувати електрообладнанням у вудузахисному виконанні.
6. Зварку вести електродами Е42 ГОСТ 9467-60, ЕА1, ЕА2
7. Гранічні відхилення на вилит штицерів 5 мм.
8. Вентилі нижнього спуску, пускоду апарату, запасні частини, опорні пластини упакувати в пару запчастин.
9. Фундамент під обладнання виконати на підну монтажну відмітку та злати під монтаж з вирівнювн поверхнею.

						ДП 9204.03 000 ТК			
Изм./Лист	№ докум.	Подп.	Дата	Ферментер		Лит	Масса	Масштаб	
Разраб.	Виталич Я.А.								1:10
Проб.	Шибельский В.В.								
Т.контр.						Лист	Листов	1	
Н.контр.				Технология биодобывания ретинолу Дильница биосинтезу		КП. И.горя Сикорского			
Улт.	Шибельский В.В.					ФБТ			