

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**Факультет медико-фармацевтичних технологій**  
**Кафедра біотехнології**

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

на тему: **«ОРГАНІЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА ПІГМЕНТУ ІНДИГО**  
**МІКРОБНИМ СИНТЕЗОМ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ**  
**ЦІАНОБАКТЕРІЙ»**

**Виконав:** здобувач вищої освіти групи БТ622(3,10д)-01  
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія  
освітньої програми Біотехнологія  
Дмитро СЕРВЕТНИК

**Керівник:** Доцент закладу вищої освіти кафедри біотехнології,  
к.фарм.н, доц. Ольга КАЛЮЖНАЯ

**Рецензент:** Завідувачка кафедри біотехнології, біофізики та  
аналітичної хімії Національного технічного університету  
«Харківський політехнічний інститут», д .т. н., проф.  
Ольга БЛИЗНЮК

## АНОТАЦІЯ

У кваліфікаційній роботі розглянуто питання організації пілотного виробництва пігменту індиго мікробним синтезом із використанням рекомбінантного штаму ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803. Актуальність роботи зумовлена необхідністю розробки екологічно безпечних технологій отримання барвників, що відповідають принципам сталого розвитку та «зеленої» хімії. У роботі проаналізовано сучасний стан мікробного синтезу індиго, обґрунтовано вибір біологічного агента та розроблено принципову технологічну схему процесу. Виконано продуктивний розрахунок та складено матеріальний баланс на 1 м<sup>3</sup> культуральної рідини. Розраховано основне технологічне обладнання, зокрема трубчастий фотобіореактор. Проведено аналіз критичних точок виробництва та розроблено систему постадійного контролю якості. Досліджено екологічні аспекти технології та запропоновано шляхи утилізації та переробки відходів.

Ключові слова: біоіндиго, мікробний синтез, ціанобактерії, *Synechocystis* sp. PCC 6803, фотобіореактор, пілотне виробництво, екологічно безпечні барвники, матеріальний баланс.

## ANNOTATION

The qualification work is devoted to the organization of pilot-scale production of indigo pigment by microbial synthesis using a recombinant strain of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. The relevance of the study is determined by the need to develop environmentally friendly technologies for obtaining dyes that comply with the principles of sustainable development and green chemistry. A product calculation was performed and a material balance was compiled for 1 m<sup>3</sup> of culture broth. The main technological equipment was calculated, including a tubular photobioreactor with a working volume of 220–

250 m<sup>3</sup>. An analysis of critical production points was carried out, and a system of in-process quality control was developed. The environmental aspects of the technology were studied, and recommendations for waste utilization and recycling were proposed.

Keywords: bio-indigo, microbial synthesis, cyanobacteria, *Synechocystis* sp. PCC 6803, photobioreactor, pilot-scale production, eco-friendly dyes, material balance.

## ЗМІСТ

Вступ.....	3
1 Аналітичний огляд.....	6
2 Характеристика готового продукту, сировини, матеріалів, напівпродуктів.....	14
2.1 Характеристика готового продукту.....	14
2.2 Характеристика сировини .....	15
2.3 Характеристика біологічного об'єкту .....	19
2.4 Біосинтез цільового продукту.....	23
3 Технологічна частина.....	28
3.1 Розрахунок матеріального балансу.....	28
3.2 Розрахунок і вибір технологічного обладнання .....	34
3.3 Опис технологічного процесу.....	41
3.4 Схеми виробництва.....	45
3.5 Контроль виробництва.....	48
3.6 Екологічні аспекти виробництва.....	54
Висновок.....	58
Список використаної літератури.....	60
Додатки.....	64

					<i>162.01.06.00 000 ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Організація виробництва індиго мікробним синтезом Пояснювальна записка</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Серветник</i>						
<i>Перевірив</i>		<i>Калюжная</i>					2	70
<i>Рецензент.</i>						<i>НФаУ</i>		
<i>Затвердив</i>		<i>Хохленкова</i>				<i>Кафедра біотехнології</i>		

## ВСТУП

Сучасна текстильна промисловість усе більше орієнтується на екологічно безпечні технології, що зумовлює зростання попиту на натуральні та біотехнологічні барвники. Традиційний хімічний синтез індиго, який домінує на світовому ринку вже понад століття, супроводжується значним негативним впливом на навколишнє середовище через утворення токсичних відходів, високе споживання води та енергії, а також використання небезпечних реагентів. У зв'язку з цим актуальним напрямом розвитку є пошук альтернативних, екологічно чистих способів отримання цього важливого пігменту. Одним із найбільш перспективних підходів є мікробний синтез індиго з використанням генетично модифікованих мікроорганізмів, зокрема ціанобактерій.

Останніми роками значний внесок у розробку біотехнологічних методів виробництва індиго зробили дослідники, які запропонували використовувати рекомбінантні штами *Escherichia coli* та ціанобактерії. Особливої уваги заслуговує робота Loprete et al. (2025), в якій вперше детально описано можливість ефективного світлозалежного синтезу індиго за допомогою рекомбінантного штаму *Synechocystis* sp. PCC 6803, що експресує флавін-вмісну монооксигеназу (mFMO). Цей підхід поєднує в собі переваги фотоавтотрофного метаболізму ціанобактерій – здатність до фіксації атмосферного CO<sub>2</sub> та використання сонячної енергії – з можливістю цільової біотрансформації індолу в індиго. Водночас питання організації промислового виробництва біоіндиго з використанням ціанобактерій, особливо в умовах України, залишаються недостатньо опрацьованими.

Актуальність теми дослідження полягає у необхідності розробки вітчизняної технології виробництва екологічно безпечного пігменту індиго, яка б відповідала сучасним вимогам сталого розвитку, забезпечувала

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		3

імпортозаміщення та створювала передумови для розвитку біотехнологічного сектору економіки України. З огляду на зростання глобального попиту на «зелені» барвники для текстильної промисловості та посилення екологічних вимог до виробництва, створення технології мікробного синтезу індиго на основі ціанобактерій має як наукове, так і практичне значення.

Метою кваліфікаційної роботи є розробка технологічного рішення організації виробництва пігменту індиго мікробним синтезом із використанням ціанобактерій, придатного для реалізації на пілотному рівні вітчизняного біотехнологічного підприємства.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити такі завдання:

1. проаналізувати сучасний стан світового виробництва індиго та існуючі підходи до його мікробного синтезу;
2. обґрунтувати вибір біологічного агента та розробити принципову технологічну схему виробництва;
3. виконати продуктивний розрахунок та скласти матеріальний баланс процесу;
4. розрахувати основне технологічне обладнання, зокрема фотобіореактор;
5. провести аналіз критичних точок виробництва та розробити систему контролю якості;
6. оцінити екологічні аспекти запропонованої технології та надати рекомендації щодо поводження з відходами.

Об'єктом дослідження є процес мікробного синтезу пігменту індиго з використанням ціанобактерій.

Предметом дослідження є технологічні, апаратурні та екологічні аспекти організації пілотного виробництва біоіндиго на основі рекомбінантного штаму *Synechocystis* sp. PCC 6803.

У процесі виконання роботи були використані такі методи дослідження: аналіз і систематизація наукової та патентної літератури, метод матеріального балансу, розрахункові методи проектування біотехнологічного обладнання,

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		4

методи аналізу критичних контрольних точок (НАССР), а також методи валідації технологічного процесу.

Практичне значення отриманих результатів полягає в розробці комплексного технологічного рішення для організації пілотного виробництва біоіндиго, яке може бути використане як основа для створення вітчизняного біотехнологічного стартапу або впровадження на діючих підприємствах фармацевтичної та біотехнологічної галузі України. Запропонована технологія відповідає принципам «зеленої» хімії та може сприяти зменшенню залежності вітчизняного ринку від імпорتنих барвників.

Результати роботи представлені на низці науково-практичних заходах та опубліковані в збірках тез (Додатки).

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		5

# 1 АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

## 1.1 Загальна характеристика виробництва індиго

Індиго - це природний ароматичний барвник синього кольору, який традиційно застосовується у текстильній промисловості для фарбування бавовняних тканин, зокрема джинсових виробів. Окрім текстильної сфери, індиго знаходить застосування в харчовій промисловості, косметичці та фармацевтиці завдяки біологічній активності та фармакологічним властивостям. Біологічне виробництво індиго, зокрема за рахунок мікробного синтезу, останнім часом поступово замінює хімічні методи, що характеризуються екологічною небезпекою і високими витратами [1, 4].

Збільшення екологічної свідомості в світі сприяє зростанню попиту на «зелені» барвники, що викликано обмеженнями традиційного хімічного синтезу, який генерує токсичні відходи. Попит на індиго, отриманий біотехнологічними методами, особливо з використанням фотосинтезуючих ціанобактерій, прогнозується зростати в найближчі десятиліття. Це пов'язано з не лише підвищеною екологічністю і стійкістю процесу, а й можливістю виробляти барвник із поновлюваної сировини в сталих умовах [1, 2]. Технологічні вдосконалення мають на меті підвищення виходу продукту, зниження енергетичних витрат і витрат води, що забезпечить ширше впровадження таких технологій на промисловому рівні [3].

Індиго традиційно добувають шляхом екстракції з рослин (індигоферу, індигоферрової кустарної культури), але цей метод обмежений низькою продуктивністю і сезонністю збору сировини. Хімічний синтез індиго залишається домінуючим промисловим методом, однак він пов'язаний із використанням токсичних реагентів та утворенням шкідливих відходів [4].

Мікробний синтез індиго, зокрема за участю грамнегативних бактерій

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		6

(наприклад, *Escherichia coli* з рекомбінантними генами) та фотосинтетичних ціанобактерій, має низку переваг: екологічна безпека, можливість використання недорогих субстратів (вуглецевих джерел), виробництво за помірних умов (температура, рН), а також потенціал для масштабування. Особливістю ціанобактерій є їх фотосинтетична здатність, що зменшує потребу у зовнішньому джерелі вуглецю і енергії, що в перспективі знижує енерговитрати виробництва [1, 2, 3].

Ключовим процесом у мікробному синтезі індиго є ферментативне перетворення індолу у індигоферринову форму, що подальше окислюється до індиго. У ціанобактерій метаболічний шлях включає активність ферментів, таких як триптофан-індол-ліаза, а також механізми фотосинтетичної асиміляції вуглецю, що створюють умови для енергетично вигідного процесу. Технологія потребує контролю умов культивування, що впливають на продуктивність: освітлення (інтенсивність і спектр), рН, температуру, концентрацію поживних речовин [1, 3].

Для ефективного виробництва індиго у фотобіореакторах необхідно оптимізувати: освітлення - продовження і інтенсивність світла визначають швидкість фотосинтезу і обсяг синтезованого пігменту, температуру - типові умови для культивування ціанобактерій становлять 25–35 °С, рН середовища - підтримання оптимального рівня (близько 7-8) забезпечує активність ферментів, концентрацію поживних речовин - дефіцит або надлишок може пригнічувати ріст і синтез [1, 3]. Контроль цих параметрів дозволяє підвищити вихід пігменту, стабільність процесу та якість кінцевого продукту.

В Україні переважно застосовують традиційні хімічні барвники, значна частина яких імпортована. Продукти, що містять біологічно синтезований індиго, поки не представлені. Імпорتنі біологічні барвники відомих світових брендів відзначаються високою якістю і екологічністю, але через високі ціни поки що мають обмежене застосування. Мікробний індиго, синтезований із ціанобактерій, потенційно має кращі екологічні характеристики і здешевлення

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		7

виробництва завдяки розробленим технологіям [1, 2].

Промислові схеми виробництва індиго містять кілька основних етапів: культивування мікроорганізмів, біоконверсія, виділення та очистка пігменту. Методи варіюються залежно від використовуваних культур і технічних засобів. Використання ціанобактерій дозволяє застосування фотобіореакторів із замкнутим циклом, що знижує витрати води та енергії і мінімізує забруднення [3]. Вибір технологічної схеми ґрунтується на: максимальному виході індиго з одиниці сировини, енергетичній ефективності та екологічності, механізації і автоматизації процесів культивування та очистки, мінімізації шкідливих відходів.

Обрана схема включає культивування ціанобактерій у фотобіореакторі, збір біомаси з індиго, його вилучення за допомогою екологічно безпечних розчинників або біокаталізаторів, а також очистку і сушіння для отримання стандартної субстанції [1].

Для організації промислового виробництва індиго з використанням ціанобактерій необхідно розробити технічні рішення, що забезпечать стабільне та ефективне культивування, покращать методи вилучення і очищення пігменту. Серед вузьких місць технології - забезпечення однорідного освітлення у фотобіореакторах і вирішення проблеми деградації індиго в процесі виділення. Запропоновано шляхами вдосконалення є використання сучасних фотобіореакторів із контролем параметрів, удосконалення ферментативних систем та впровадження автоматизованого контролю технологічних процесів. Реалізація цих заходів сприятиме збільшенню виходу продукції, зниженню собівартості і поліпшенню екологічних показників виробництва.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		8

## 1.2 Аналіз виробництва пігменту індиго у світі та мікробних технологій його синтезу

Виробництво пігменту індиго ( $C_{16}H_{10}N_2O_2$ ) у світі сьогодні переважно базується на хімічному синтезі з нафтохімічної сировини (анілін, ціаністий водень, формальдегід), що супроводжується значним негативним впливом на довкілля - високим споживанням води (до 1000 л на 10 кг барвника), утворенням токсичних відходів, використанням сильних відновників та енергозатратними процесами. Глобальний обсяг виробництва індиго оцінюється в 70–80 тис. т на рік, з яких переважна більшість (понад 99 %) припадає на синтетичний продукт, що використовується переважно для фарбування деніму. Основними виробниками синтетичного індиго є великі хімічні корпорації: BASF (приблизно 40 % світового ринку), DyStar Group, Archroma, Huntsman Corporation, а також низка китайських компаній (Zhejiang Runtu, Jiangsu Taifeng та ін.). Китай домінує у виробництві, тоді як європейські та американські виробники зосереджені на преміум-сегменті та дотриманні жорстких екологічних норм [21, 22].

Натуральний індиго з рослин (*Indigofera tinctoria* та інші види) займає незначну частку ринку (близько 1–2 %) через низьку врожайність, великі площі земель і високу вартість. Компанії, що розвивають цей напрямок, - Stony Creek Colors (США) ([stonycreekcolors.com](http://stonycreekcolors.com)), яка вирощує високоврожайні сорти індиго та співпрацює з Archroma для масштабного виробництва попередньо відновленого рослинного індиго. Однак навіть натуральний продукт не вирішує повністю проблеми стійкості через водо- та землекористування [21, 23].

Мікробний біосинтез індиго розглядається як перспективна альтернатива, що дозволяє використовувати відновлювані джерела вуглецю

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		9

(глюкоза, відходи), уникати токсичних проміжних продуктів та значно зменшити споживання води й викиди CO<sub>2</sub>. Історично перші роботи з рекомбінантного синтезу розпочалися у 1980-х роках: компанія Genencor (США) розробила штами *Escherichia coli*, що експресують нафталіндіоксигеназу (NDO) з *Pseudomonas putida*, та отримала патенти (US4520103A, US5866396A). Проте технологія не була впроваджена у великому промисловому масштабі через недостатню економічну конкурентоспроможність порівняно з хімічним синтезом [23].

Сучасний етап розвитку мікробного синтезу пов'язаний зі стартапами та дослідницькими проектами, що використовують досягнення синтетичної біології. Французька компанія PILI (pili.bio) виробляє Eco-Indigo - біоіндиго на основі бактеріальної ферментації з біомаси. Продукт має високу чистоту (>90 %), знижує викиди CO<sub>2</sub> до 50 % порівняно з нафтохімічним аналогом і вже використовується у колекціях преміум-деніму (наприклад, співпраця з Citizens of Humanity). Компанія стверджує суттєве зменшення споживання води (співвідношення барвник:вода 1:20 проти 1:100 у хімічному процесі) [9].

Американський стартап Huue (huue.bio) розробляє біосинтетичний індиго шляхом перенесення генів рослин у мікроорганізми, що ферментують цукор. Барвник сумісний з існуючими технологіями фарбування деніму, має у 5 разів нижчий токсичний потенціал і вже тестується у промислових масштабах (у співпраці з Ginkgo Bioworks).

Компанія Colorifix (colorifix.com) розвиває унікальну технологію in situ мікробного фарбування, коли бактерії безпосередньо наносять та фіксують барвник на тканині, що дозволяє радикально зменшити витрати води на етапі фарбування. Японська корпорація NAGASE (nagase.com) пропонує продукт FermeBlue - індиго, отримане мікробною ферментацією, як частину лінійки стійких барвників.

1. Наукові дослідження активно рухають галузь вперед. У 2025 році опубліковано роботу Planchestainer et al., де інженерний штам *E. coli* досяг

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		10

титру 12 г/л індиго з подальшим успішним фарбуванням бавовни; процес повністю біологічний і демонструє стійкість барвника. Інші дослідження (Nam et al., 2023; Lu et al., 2025) оптимізують штами *E. coli* через мембранну інженерію та двоетапну ферментацію, досягаючи 3,9 г/л у ферментерах об'ємом 5 л [1, 16, 23].

Особливо перспективним для теми роботи є напрямок з ціанобактеріями. У 2025 році Loprete et al. вперше продемонстрували світлозалежний синтез індиго у рекомбінантному штамі *Synechocystis sp.* PCC6803, що експресує флавін-вмісну монооксигеназу (mFMO) з *Methylophaga aminisulfivorans*. За оптимізованих умов досягнуто 112 мг/л індиго при 86 % конверсії індолу, з можливістю виділення барвника безпосередньо з середовища. Цей підхід використовує CO<sub>2</sub>, світло та воду, що робить його особливо привабливим для сталого виробництва в умовах України (фотобіореактори) [16].

Таким чином, мікробний синтез індиго перебуває на етапі переходу від лабораторних досліджень до пілотного та малого комерційного виробництва. Основні переваги - екологічність, відновлюваність сировини та сумісність з існуючими текстильними технологіями. Головні виклики - досягнення промислових титрів (понад 10–20 г/л), зниження собівартості та масштабування. Для вітчизняного підприємства найбільш реальним варіантом видається використання оптимізованих штамів *E. coli* або ціанобактерій (*Synechocystis*) у фотобіореакторах/ферментерах з інтеграцією процесів виділення та фарбування, що дозволить зменшити залежність від імпортного синтетичного барвника та відповідати вимогам сталого розвитку.

На сьогодні в Україні відсутнє промислове виробництво індиго будь-якого походження - барвник повністю імпортується. З огляду на новизну технології (використання ціанобактерій для світлозалежного синтезу індиго вперше детально описано лише у 2025 році), найбільш доцільним варіантом є створення нового виробництва у форматі українського біотехнологічного

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		11

стартапу або пілотного майданчика на базі існуючого підприємства.

Оптимальними майданчиками для реалізації можуть стати: підприємства фармацевтичної та біотехнологічної галузі; діючі ферментаційні виробництва (наприклад, заводи з виробництва пробіотиків, ферментів або амінокислот); створення окремого стартапу з залученням грантів (програми Horizon Europe, Ukrainian Startup Fund, гранти Мінекономіки на «зелені» технології та імпортозаміщення).

Такий підхід дозволить не лише забезпечити внутрішній ринок екологічно чистим барвником, а й експортувати технологію та продукцію до країн ЄС, де попит на біо-барвники стрімко зростає. На початковому етапі доцільно організувати пілотне виробництво потужністю 5–10 тонн на рік з подальшим масштабуванням до промислового рівня.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

## 2 ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, СИРОВИНИ, МАТЕРІАЛІВ, НАПІВПРОДУКТІВ

### 2.1 Характеристика готового продукту

Готовим продуктом технологічного процесу є біоіндиго мікробного синтезу (біологічний пігмент індиго), отриманий за допомогою рекомбінантного штаму ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803, що експресує флавін-вмісну монооксигеназу (mFMO). Оскільки на момент розробки технології в Україні відсутній затверджений нормативно-технічний документ саме на біоіндиго мікробного походження, пропонується розробити та затвердити технічні умови ТУ У 20.1-XXXX:202X «Пігмент індиго біологічний. Технічні умови» (або відповідний ДСТУ на основі гармонізації з європейськими стандартами EN ISO для барвників). Виробником у перспективі може стати нове або модернізоване українське підприємство біотехнологічного профілю.

Продукт являє собою дрібнодисперсний порошок темно-синього кольору з металевим блиском, практично нерозчинний у воді, спирті та більшості органічних розчинників у нейтральному середовищі, але розчинний у лужних відновлювальних середовищах з утворенням жовто-зеленого лейкоіндиго. Кількісний і якісний склад кінцевої продукції (нормативні показники, що підлягають контролю після очищення та сушіння) наведено в таблиці 2.1 (орієнтовні значення на основі даних лабораторних зразків та аналогів комерційного індиго).

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

## Основні показники якості біоіндиго мікробного синтезу

Показник	Норма	Метод контролю
Масова частка індиго, % (не менше)	92–95	Спектрофотометрія ( $\lambda = 610$ нм)
Масова частка вологи, % (не більше)	5,0	Ваговий метод (105 °С)
Зольність, % (не більше)	1,0	Прожарювання при 800 °С
рН водної витяжки	6,5–8,0	Потенціометричний
Залишок після просіювання через сито 0,25 мм, % (не більше)	2,0	Ситовий аналіз
Мікробіологічна чистота (КУО/г)	Відсутність патогенів	ДСТУ ISO 7218

Діючою речовиною продукту є індиго (індиготин) - органічна сполука з хімічною формулою  $C_{16}H_{10}N_2O_2$  (систематична назва: 2-(1,3-дігідро-3-оксо-2Н-індол-2-іліден)-1,2-дигідро-3Н-індол-3-он).

Біологічним агентом виробництва виступає рекомбінантний штам ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803, модифікований шляхом введення гена mFMO з *Methylophaga aminisulfidivorans*.

Основне призначення продукту - використання як натурального біобарвника для фарбування текстильних матеріалів (бавовна, денім, вовна, шовк) за технологією кубового фарбування. Біоіндиго забезпечує стійке синє забарвлення з характерним «вимиванням» при пранні, аналогічне класичному синтетичному індиго, але з суттєво нижчим екологічним слідом (відсутність токсичних проміжних продуктів синтезу, зниження споживання води та енергії). Продукт може також застосовуватися у виробництві фарб, чорнил, косметичних засобів та як індикатор у хімічному аналізі.

Зберігання та транспортування біоіндиго здійснюють у герметичній упаковці (крафт-паперові мішки з поліетиленовим вкладишем або пластикові барабани по 25–50 кг), захищеній від вологи та прямих сонячних променів. Рекомендовані умови: температура не вище +25 °С, відносна вологість повітря не більше 60 %, термін зберігання - не менше 24 місяців з дати виготовлення

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						14
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

за дотримання зазначених умов. Продукт не є пожежонебезпечним і не потребує спеціальних умов перевезення (може транспортуватися звичайним автотранспортом або залізницею в закритих вагонах/контейнерах).

## 2.2 Характеристика сировини

### 2.2.1 Середовища для вирощування біологічного агента

Біологічним агентом у технології є рекомбінантний штам ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803, що експресує флавін-вмісну монооксигеназу (mFMO) з *Methylophaga aminisulfidivorans*. Штам вирощується у фотобіореакторах за фотоавтотрофних умов з використанням мінерального середовища BG-11 (стандартне середовище для культивування прісноводних ціанобактерій) або його модифікацій.

Основне середовище - BG-11 (склад на 1 л дистильованої води):

- $\text{NaNO}_3$  1,5 г
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,04 г
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,075 г
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,036 г
- Лимонна кислота 0,006 г
- Фери-амоній цитрат 0,006 г
- $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,001 г
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,02 г
- Мікроелементи А5 (1 мл):  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2,86 г/л;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1,81 г/л;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,22 г/л;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,39 г/л;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,08 г/л;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,05 г/л.

pH середовища доводять до 7,1–8,0. У виробничих умовах (за даними лабораторного протоколу Loprete et al., 2025) до середовища додають буфер TES (10 мМ, pH 8,0) для стабілізації pH під час інтенсивного росту.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

Середовище для біотрансформації - модифіковане BG-11 з додаванням субстрату індолу (0,2–1,0 мМ). Для зменшення токсичності індолу та полегшення виділення індиго може використовуватися двофазна система з додаванням органічної фази (наприклад, діізонафталат - DINP).

Інокуляційне середовище - стандартне BG-11 (без модифікацій).

Витрати середовищ на пілотне виробництво (5–10 т біоіндиго на рік). Припустимо оптимізований титр продукту 1,0–2,0 г/л (реалістично для початкового етапу стартапу з урахуванням масштабування та оптимізації процесу). Для виробництва 5 т/рік (5000 кг) необхідний загальний об'єм культури близько 2500–5000 м<sup>3</sup> на рік (залежно від титру та кількості циклів - 8–12 циклів на рік тривалістю 25–40 діб кожен).

Витрати середовища (приблизно 1,5–2 об'єми культури з урахуванням інокуляту та втрат):

- BG-11 (основне + інокуляційне): 4000–8000 м<sup>3</sup>/рік
- Індол (субстрат): 150–300 кг/рік (залежно від конверсії 80–86 %)
- Мікроелементи та солі: пропорційно до об'єму середовища

Вартість сировини для середовищ на пілотному етапі оцінюється у 150–300 тис. грн/рік (при цінах 2026 року на хімікати ч.д.а.). При масштабуванні до 50–100 т/рік витрати на середовища зростуть пропорційно, але питома вартість знизиться за рахунок закупівель великими партіями та оптимізації рецептур (наприклад, використання технічної води та локальних джерел CO<sub>2</sub>).

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16



Найменування	Показники НТД, обов'язкові для перевірки	Примітка
Сирий екстракт індиго	Вміст індиго $\geq 70\%$	Проміжний продукт перед очищенням та сушінням

Усі компоненти середовищ BG-11 та індол закупаються у постачальників з відповідними сертифікатами якості. Для пілотного виробництва стартапу середовища готуються безпосередньо на майданчику з використанням води високого ступеня очищення (дистильованої або деіонізованої). При масштабуванні до промислового рівня планується перехід на технічну воду з додатковою очисткою та локальне виробництво CO<sub>2</sub> для насичення середовища.

### 2.3 Характеристика біологічного об'єкту

Біологічним агентом технологічного процесу виробництва пігменту індиго є рекомбінантний штам ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803, модифікований шляхом експресії гена флавін-вмісної монооксигенази (mFMO) з *Methylophaga aminisulfidivorans*. Цей штам безпосередньо здійснює біотрансформацію індолу в індиго за світлозалежним механізмом.

Систематичне положення. Домен *Bacteria*, тип *Cyanobacteria*, клас *Cyanophyceae*, ряд *Synechococcales*, родина *Synechococcaceae*, рід *Synechocystis*, вид *Synechocystis* sp. (штам PCC 6803 - модельний лабораторний штам, повністю секвенований геном).

Морфолого-цитологічні ознаки. Клітини штаму *Synechocystis* sp. PCC 6803 є одноклітинними, сферичними або злегка овальними, діаметром 1,5–3,0 мкм (рис. 2.1). Клітинна стінка грамнегативного типу, складається з пептидоглікану та зовнішньої мембрани. У цитоплазмі розташовані тилакоїдні мембрани, на яких розміщені фікобілісоми - надмолекулярні комплекси, що

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

містять фікоціанін і алофікоціанін. Основним фотосинтетичним пігментом є хлорофіл а. Клітини не утворюють гетероцист, спор або акінет і розмножуються бінарним поділом.

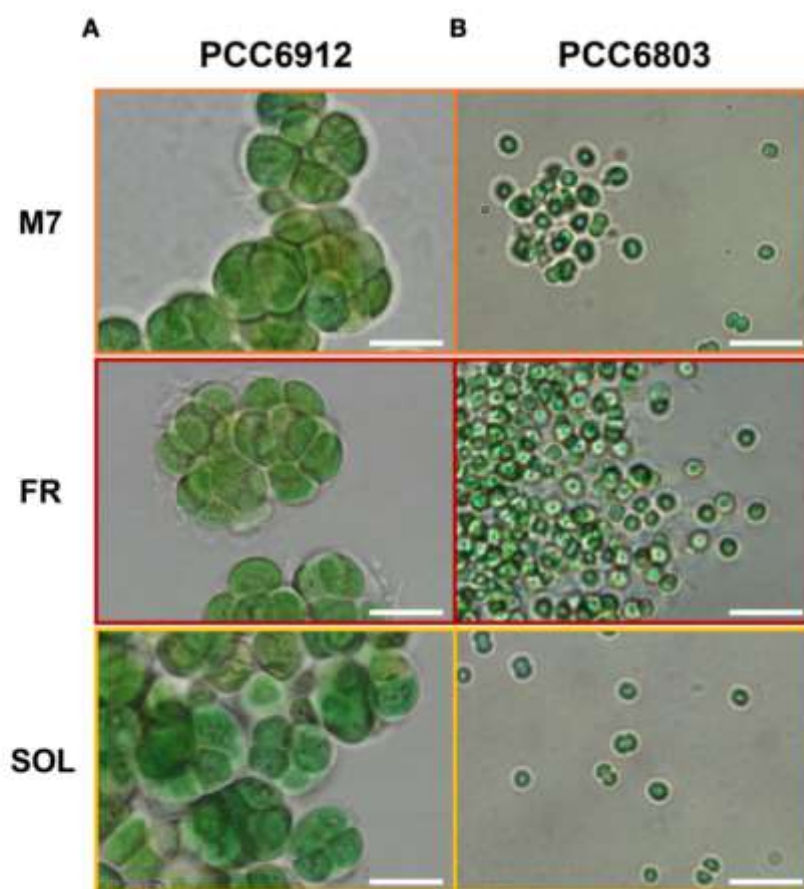


Рис. 2.1 – Клітини *Synechocystis* sp.

Культуральні ознаки. Штам росте фотоавтотрофно на мінеральному середовищі BG-11 (або його модифікаціях) за температури 25–30 °С та освітленості 50–150 мкмоль фотонів·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>. Культура має характерне синьо-зелене забарвлення завдяки високому вмісту фікоціаніну. У рідкому середовищі утворює гомогенну суспензію, на агаризованому середовищі - дрібні, круглі, блакитно-зелені колонії з рівними краями. Штам є модельним і добре піддається генетичним маніпуляціям.

Фізіолого-біохімічні ознаки дикого типу. *Synechocystis* sp. PCC 6803 є облігатним фотоавтотрофом, здатним фіксувати атмосферний CO<sub>2</sub> та виділяти

кисень. Метаболізм базується на циклі Кальвіна–Бенсона. Штам може використовувати обмежену кількість органічних сполук (глюкоза, фруктоза) за умови наявності світла (міксотрофія). Він чутливий до високих концентрацій солей та органічних токсикантів, однак демонструє високу толерантність до помірних рівнів стресу. Геном штаму повністю секвенований і становить приблизно 3,57 Мбп з відомою функцією більшості генів.

Характеристика рекомбінантного штаму та генетичні зміни, що забезпечують високий вихід індиго. Для виробництва індиго вихідний штам *Synechocystis* sp. PCC 6803 був генетично модифікований шляхом стабільної трансформації плазмідом рSuperP\_FMO, що несе ген mFMO під контролем сильного конститутивного промотора P<sub>src560</sub> та термінатора T<sub>trbc</sub>. Трансформацію проводили методом фосфатного голодування з подальшою селекцією на відповідних антибіотиках. Отриманий рекомбінантний штам (позначений як Syn\_FMO) стабільно експресує фермент mFMO, який каталізує окислення індолу до індоксилу в присутності молекулярного кисню та NADPH. Індоксил спонтанно димеризується в індиго.

Ключові зміни та оптимізації, що дозволили досягти високого виходу продукту:

- Високий рівень експресії mFMO - використання сильного промотора P<sub>src560</sub> забезпечує достатню кількість ферменту для ефективної біотрансформації.
- Оптимізація умов біотрансформації - штам демонструє толерантність до індолу до 1,0 мМ (при вищих концентраціях ріст пригнічується). Оптимальна концентрація субстрату - 1,0 мМ при оптичній густині культури OD<sub>730</sub> = 4,0 та освітленості 100–150 мкмоль фотонів·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>.
- Світлозалежність процесу - синтез індиго повністю залежить від фотосинтетичної активності клітин (вироблення кисню та NADPH). У темряві продукція відсутня навіть за наявності глюкози.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		20

- Фізіологічні адаптації - у рекомбінантному штамі спостерігається підвищене накопичення полі- $\beta$ -гідроксибутирату (PHB), що, ймовірно, сприяє внутрішньоклітинному депонуванню індиго та знижує його токсичність.

- Високий вихід та конверсія - за оптимізованих лабораторних умов досягнуто титру індиго 112 мг/л при конверсії індолу 86 %. Індиго накопичується переважно в середовищі у вигляді темних частинок або плівок і може бути виділене за допомогою простих методів (фільтрування або екстракція органічними розчинниками).

Рекомбінантний штам зберігає основні фізіологічні властивості вихідного *Synechocystis* sp. PCC 6803 (фотоавтотрофність, толерантність до світла), але набуває нової функціональної здатності - ефективного перетворення екзогенного індолу в комерційно цінний пігмент індиго. Це дозволяє реалізувати повністю біологічний, світлозалежний процес синтезу без застосування токсичних хімічних окисників, що є ключовою перевагою для сталого виробництва.

Штам є генетично модифікованим організмом (ГМО), тому його передача регулюється як матеріалом з інтелектуальною власністю, так і нормами біобезпеки. Придбати штам для використання український стартап може або звернувшись до авторів штаму (Loprete G. et al. (2025) у журналі *Microbial Biotechnology*, Автори: Giovanni Loprete, Elisabetta Bergantino та колеги (University of Padova, Італія) з проханням надати штам для дослідницьких і пілотних цілей з укладанням Material Transfer Agreement (MTA) - стандартний договір про передачу біологічного матеріалу. MTA регулює умови передачі штаму: для яких цілей можна використовувати, чи можна передавати третім особам, хто володіє правами на результати досліджень тощо. Для академічних і стартапів на ранньому етапі MTA зазвичай безкоштовний або за символічну плату. При подальшому масштабуванні виробництва може знадобитися додаткова ліцензійна угода або

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		21

патентна ліцензія.

З 16 вересня 2026 року в Україні діє новий Закон України № 3339-IX від 23.08.2023 «Про державне регулювання генетично-інженерної діяльності та державний контроль за розміщенням на ринку генетично модифікованих організмів і продукції», який обумовлює певні вимоги до використання таких організмів. До державної реєстрації ГМО забороняється промислове виробництво та введення в обіг продукції, отриманої з ГМО. Для пілотного виробництва в замкненій системі (закриті фотобіореактори) процедура значно простіша, ніж для відкритого випуску. Якщо штам використовується тільки всередині підприємства і продукція (індиго) не містить живих клітин - це суттєво спрощує регуляцію.

Для українського стартапу найоптимальніший шлях на початковому етапі: укласти МТА з авторами статті (University of Padova), зареєструвати діяльність з ГМО через співпрацю з науковим партнером, працювати в режимі науково-дослідного / пілотного виробництва в замкненій системі, паралельно готувати пакет документів для державної реєстрації ГМО та отримання дозволу на промислове виробництво.

## 2.4 Біосинтез цільового продукту

Біосинтез пігменту індиго у розроблюваній технології реалізується через цільову біотрансформацію екзогенного субстрату - індолу - рекомбінантним штамом ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803, що експресує флавін-вмісну монооксигеназу (mFMO). На відміну від класичного мікробного синтезу індиго з глюкози через шлях триптофану (як у рекомбінантних штаммах *Escherichia coli*) (рис. 2.2), у даному випадку використовується двостадійний підхід: спочатку відбувається фотоавтотрофне вирощування біомаси, а потім - світлозалежна біотрансформація доданого індолу безпосередньо в клітинах.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

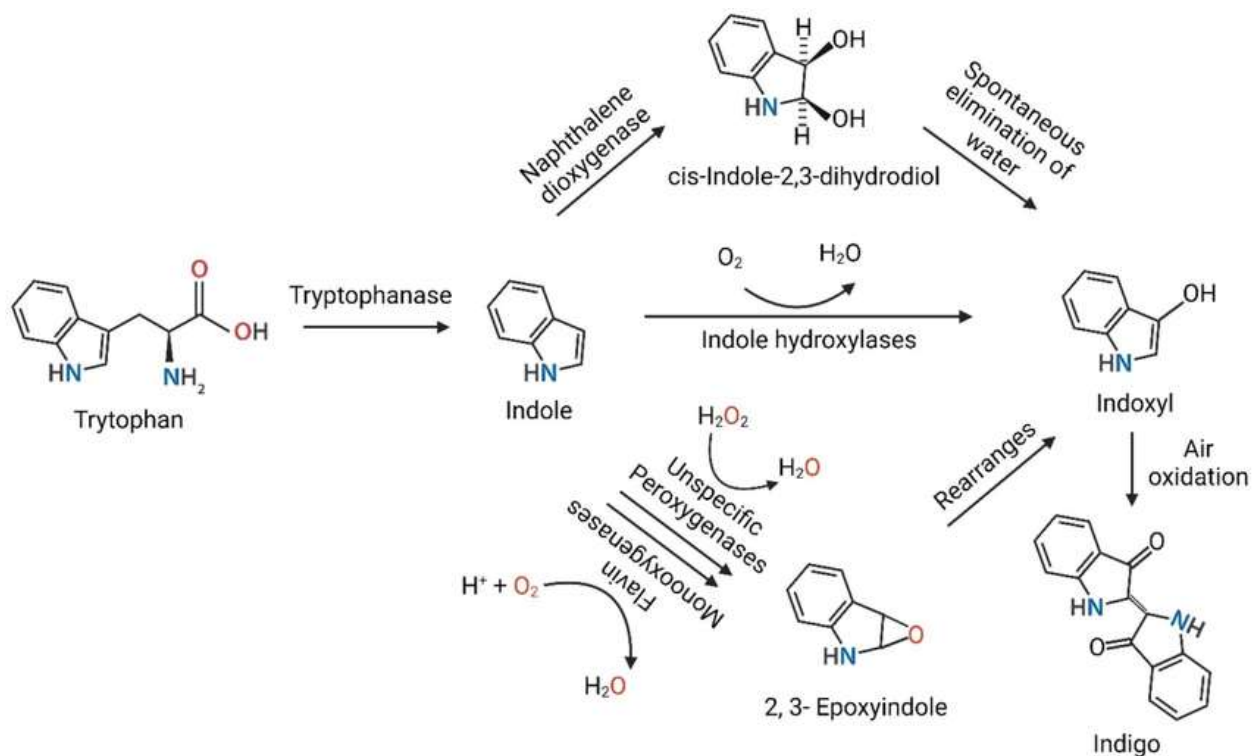


Рис. 2.2 - Різні ферментативні шляхи, що беруть участь у виробництві індиго у мікроорганізмів. Джерело [20]

Біохімічний шлях біотрансформації індолу в індиго. Основна реакція біотрансформації каталізується введеним ферментом mFMO (Methylorhaga aminisulfidivorans flavin-containing monooxygenase).

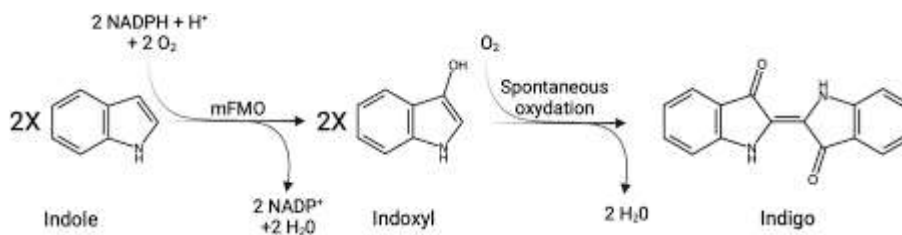
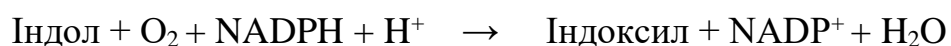


Рис. 2.3 - Схематичне зображення каскадних реакцій, що призводять до продукування біоіндиго рекомбінантним *Synechocystis*, що експресує mFMO. Джерело [16].

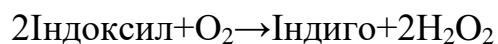
Механізм процесу включає такі етапи:

1. Окислення індолу (каталітична стадія):

mFMO



2. Спонтанна димеризація (неферментативна стадія):



Таким чином, індиго утворюється в результаті окислювальної димеризації індоксилу, який є нестабільним проміжним продуктом. Процес повністю залежить від наявності молекулярного кисню та відновленого нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (NADPH), що генеруються в клітині під час фотосинтезу.

Роль фотосинтезу та енергетичного метаболізму. Оскільки *Synechocystis* sp. PCC 6803 є фотоавтотрофним організмом, NADPH і кисень, необхідні для роботи mFMO, утворюються безпосередньо в процесі фотосинтезу:

1. Світлова фаза фотосинтезу забезпечує відновлення  $\text{NADP}^+$  до NADPH у фотосистемі I та виділення  $\text{O}_2$  у фотосистемі II.

2. Темнова фаза (цикл Кальвіна) забезпечує фіксацію  $\text{CO}_2$  та синтез органічних сполук, необхідних для росту клітин.

У рекомбінантному штамі частина енергії та відновних еквівалентів спрямовується на підтримку експресії та функціонування чужорідного ферменту mFMO. Це створює додаткове навантаження на клітинний метаболізм, однак штам зберігає здатність до активного росту за оптимальних умов освітлення.

Умови проведення процесу біотрансформації. Процес біотрансформації проводиться в фотобіореакторах за такими основними параметрами:

1. Освітленість.  $100\text{--}150 \text{ мкмоль фотонів} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  (оптимальний діапазон для максимальної конверсії);
2. Температура.  $28\text{--}30 \text{ }^\circ\text{C}$ ;
3. рН.  $7,8\text{--}8,2$  (підтримується буфером TES або  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ );
4. Концентрація індолу.  $0,5\text{--}1,0 \text{ мМ}$  (вищі концентрації токсичні для клітин);
5. Аерація та перемішування. забезпечують розчинення  $\text{CO}_2$  та  $\text{O}_2$ , а також

									Арк.
									24
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.06.00 000 ПЗ				

рівномірний розподіл субстрату;

- б. Тривалість біотрансформації. 24–48 годин (залежить від щільності культури та концентрації індолу).

Для зниження токсичної дії індолу та полегшення виділення продукту може застосовуватися двофазна система з додаванням водонерозчинної органічної фази (наприклад, дізонанілфталат - DINP).

Особливості промислової реалізації. У природних умовах ціанобактерії не синтезують індиго. Промислова реалізація процесу стала можливою лише завдяки генетичній модифікації штаму - введенню гена mFMO під сильним конститутивним промотором. Це дозволило роз'єднати ріст біомаси та цільову біотрансформацію, а також значно підвищити вихід продукту порівняно з нативними мікроорганізмами.

На відміну від гетеротрофних систем (наприклад, на основі *E. coli*), використання ціанобактерій дає можливість проводити процес з використанням CO<sub>2</sub> як основного джерела вуглецю та сонячного світла як джерела енергії, що суттєво знижує собівартість та екологічний слід виробництва.

Побічні реакції та їх вплив на процес. При зміні параметрів процесу можливі такі небажані шляхи метаболізму:

1. Утворення індрубіну - при надмірному накопиченні індоксилу або зміні редокс-умов може відбуватися альтернативна димеризація з утворенням індрубіну (червоного пігменту). Це знижує вихід цільового індиго та погіршує якість барвника.
2. Токсична дія індолу - при концентраціях понад 1,0–1,2 мМ індол пригнічує ріст і фотосинтетичну активність клітин, що призводить до зниження продуктивності процесу.
3. Фотоокислення індиго - за надмірної освітленості або тривалого перебування продукту в реакторі можливе часткове руйнування вже утвореного індиго.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

4. Накопичення полі- $\beta$ -гідроксибутирату (PHB) - як стресова відповідь клітин на токсичність індолу. Хоча PHB не впливає безпосередньо на вихід індиго, його надмірне накопичення може знижувати загальну продуктивність біомаси.
5. Для мінімізації побічних реакцій у промислових умовах застосовують контрольоване дозування індолу, підтримання оптимального редокс-потенціалу та використання двофазних систем екстракції.

Таким чином, біосинтез індиго у рекомбінантному штамі *Synechocystis* sp. PCC 6803 є прикладом ефективної інтеграції природного фотосинтетичного метаболізму ціанобактерій з цілеспрямовано введеною ферментативною активністю, що дозволяє реалізувати сталий та екологічно безпечний процес виробництва пігменту.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		26

## 3 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

### 3.1 Розрахунок матеріального балансу

Оскільки в кваліфікаційній роботі передбачається проектування принципово нового виробництва біоіндиго мікробним синтезом у форматі українського біотехнологічного стартапу, матеріальний баланс виконано на основі даних спеціальної літератури, результатів лабораторних досліджень (Loprete et al., 2025) та аналогічних біотехнологічних процесів мікробного синтезу вторинних метаболітів.

Для біотехнологічних виробництв, де біологічний агент виступає продуцентом цільового продукту (а не входить до складу готового препарату), виконується продуктовий розрахунок з подальшим складанням матеріального балансу. Розрахунок проведено на 1 м<sup>3</sup> культуральної рідини в кінці стадії біосинтезу з урахуванням втрат. Отримані дані потім масштабуються на пілотне виробництво потужністю 5 т біоіндиго на рік.

#### 1. Кількість культуральної рідини з урахуванням втрат

Приймаємо втрати культуральної рідини на стадії біосинтезу 10 % (винос газами, відбори проб, залишки в обладнанні).

Кількість культуральної рідини з урахуванням втрат:

$$G1 = 1 \times 1,1 = 1,1 \text{ м}^3$$

#### 2. Витрати компонентів на приготування поживного середовища

Для вирощування рекомбінантного штаму *Synechocystis* sp. PCC 6803 використовується модифіковане середовище BG-11. Загальна витрата компонентів середовища на 1,1 м<sup>3</sup> становить приблизно 2,8–3,2 кг (залежно від точного складу). Вміст абсолютно сухих речовин у середовищі - близько 2,1–2,4 кг.

#### 3. Кількість посівного матеріалу

Приймаємо кількість посівного матеріалу 5 % від об'єму G<sub>1</sub>:

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		27

$$G4 = 1,1 \times 0,05 = 0,055 \text{ м}^3$$

З урахуванням 5 % втрат при вирощуванні посівного матеріалу:

$$G5 = 0,055 \times 0,95 = 0,052 \text{ м}^3$$

4. Кількість середовища, що надходить у ферментер

Загальна кількість середовища на початку біосинтезу:

$$G8 = G1 + G5 = 1,1 + 0,052 = 1,152 \text{ м}^3$$

5. Кількість культуральної рідини після біосинтезу

З урахуванням 10 % втрат на стадії біосинтезу:

$$G10 = 1,152 \times 0,9 = 1,037 \text{ м}^3$$

Втрати культуральної рідини:

$$G11 = 1,152 \times 0,1 = 0,115 \text{ м}^3$$

6. Вміст цільового продукту

Приймаємо титр індиго в культуральній рідині після біосинтезу 1,0 г/л (реалістичний показник для пілотного етапу з урахуванням оптимізації процесу). Загальна кількість індиго:

$$A2 = 1,0 \times 1037 = 1037 \text{ г} = 1,037 \text{ кг}$$

Обґрунтування вибору методів виділення та очищення. Для вітчизняного стартапу на пілотному етапі (5–10 т/рік) пріоритетними критеріями при виборі методів виділення та очищення біоіндиго є: низька капітальна вартість обладнання; простота технології та можливість обслуговування персоналом середньої кваліфікації; мінімальне використання органічних розчинників; висока екологічність процесу; можливість подальшого масштабування без суттєвої перебудови виробництва.

З урахуванням цих вимог найефективнішою схемою для стартапу є комбінований метод:

Центрифугування (або фільтрування) → промивання осаду → сушіння

Ця схема дозволяє досягти виходу готового продукту на рівні 75–82 % від загальної кількості індиго, що утворився в культуральній рідині, при відносно низьких витратах.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		28

## 7. Відділення біомаси та індиго (центрифугування)

Після завершення біотрансформації культуральну рідину направляють на дискову центрифугу (або стрічковий фільтр-прес на початковому етапі).

Втрати на стадії: 8–12 % (в основному з фільтратом/центрифугатом).

Вихід індиго в осад: 88–92 %.

Вологість осаду після центрифугування: 75–82 %.

Розрахунок (на 1 м<sup>3</sup> культуральної рідини):

Кількість культуральної рідини, що надходить на центрифугування:  
1,037 м<sup>3</sup>

Кількість вологого осаду (G<sub>18</sub>): = 92–98 кг

Кількість абсолютно сухих речовин в осаді: = 18–20 кг (з них індиго = 0,92–0,95 кг)

## 8. Промивання осаду

Осад промивають водою (або слабким розчином луку для видалення залишків середовища) при гідромодулі 1:0,8–1:1 для видалення водорозчинних домішок (залишки середовища, солі, метаболіти).

Втрати індиго на стадії промивання: 3–5 %.

Кількість промивної води: 80–100 л на 1 м<sup>3</sup> початкової культуральної рідини.

Після промивання вологість осаду знижується до 70–75 %.

## 9. Сушка

Для старту рекомендується вакуумна сушарка або розпилувальна сушарка (на пізніших етапах масштабування).

Параметри сушіння: температура: 50–60 °С (щоб уникнути термічної деструкції індиго), тиск: 0,05–0,1 бар (вакуумна сушарка), кінцева вологість продукту: ≤ 5 %

Втрати на стадії сушіння:

Механічні втрати + винос з сушильним агентом: 8–10 %

Втрати від часткової інактивації/окислення: 3–5 %

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

Після сушіння отримують сирий біоіндиго у вигляді темно-синього порошку з вмістом основної речовини 85–90 %.

#### Стадія 10. Стандартизація та фасування (за потреби)

Якщо потрібно довести вміст індиго до  $\geq 92$  %, проводять суху стандартизацію інертним наповнювачем (сульфат натрію або крохмаль). Однак для більшості застосувань (текстильне фарбування) достатньо продукту з вмістом 85–90 %.

Втрати на стадії стандартизації та фасування: 2–3 %

На основі продуктового розрахунку складено матеріальний баланс технологічного процесу. Постадійний матеріальний баланс наведено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

#### Постадійний матеріальний баланс (розрахунок на 1 м<sup>3</sup> культуральної рідини після біосинтезу)

Стадія	Найменування	Витрачено, кг/м <sup>3</sup>	Отримано, кг/м <sup>3</sup>	Вміст індиго, г/л	Примітка
Біосинтез	Поживне середовище + посівний матеріал	1,152			
Біосинтез	Культуральна рідина (після біотрансформації)		1,037	1,00	Втрати 10 % (винос газами + проби)
Відділення твердої фази	Центрифугування (осад + центрифугат)	1,037			
Відділення твердої фази	Вологий осад (біомаса + індиго)		95,0		Вологість осаду = 80 %
Відділення твердої фази	Центрифугат (фільтрат)		942,0	0,08	Втрати індиго з центрифугатом = 7–8 %
Промивання осаду	Промивна вода	90,0			Гідромодуль 1:0,95
Промивання осаду	Промитий осад		92,5		Втрати індиго при промиванні = 3–4 %
Сушіння	Вологий промитий осад	92,5			

Стадія	Найменування	Витрачено, кг/м <sup>3</sup>	Отримано, кг/м <sup>3</sup>	Вміст індиго, г/л	Примітка
Сушіння	Сухий індиго (сирий продукт)		0,82		Вологість $\leq 5$ %. Втрати при сушінні 11–12 %
Стандартизація (за потреби)	Сухий індиго + наповнювач	0,82			За потреби підвищення чистоти
Стандартизація (за потреби)	Стандартизований біоіндиго		0,79		Вміст основної речовини $\geq 92$ %. Втрати 2–3 %
Фасування	Готовий продукт (біоіндиго)		0,77		Втрати при фасуванні $\approx 2$ %

Втрати на кожній стадії:

Біосинтез: 10 %

Центрифугування: 7–8 %

Промивання: 3–4 %

Сушіння: 11–12 %

Стандартизація + фасування: 4–5 %

Загальний вихід готового біоіндиго (вміст основної речовини  $\geq 92$  %) становить = 74–76 % від кількості індиго, що утворився під час біотрансформації.

Загальний матеріальний баланс серії у табл. 3.2 адаптований під пілотне виробництво біоіндиго у форматі стартапу (на 1000 кг готового біоіндиго).

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		31

Таблиця 3.2

## Загальний матеріальний баланс серії

(на 1000 кг готового біоіндиго з вмістом основної речовини  $\geq 92$ )

Найменування	Вміст основної речовини, %	Витрачено та отримано	Маса, кг	Об'єм, л	Кількість, штук	Загальна	Основної речовини	Примітка
Витрачено:								
А. Сировини:								
Індол (субстрат)	99,5	Витрачено	1350					Основний субстрат біотрансформації
NaNO <sub>3</sub>	99,0	Витрачено	1 950					Компонент середовища BG-11
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	98,0	Витрачено	52					Компонент середовища BG-11
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	99,0	Витрачено	98					Компонент середовища BG-11
Інші солі та мікроелементи (сумарно)		Витрачено	420					Компоненти середовища BG-11
Б. Матеріалів:								
Вода технічна (на приготування середовища та промивання)		Витрачено	145000	145000				Включаючи промивну воду
В. Напівпродуктів:								
Посівний матеріал (культура штаму)		Витрачено	58000	58000				5 % від об'єму середовища
Всього витрачено:			206928	203000				
Отримано:								
А. Напівпродуктів:								
Культуральна рідина після біосинтезу		Отримано	130000	130000				З урахуванням втрат 10 %
Б. Готового продукту:								
Біоіндиго (стандартизований порошок)	92,5	Отримано	1000			1000	925	Готовий продукт
В. Відходів, у тому числі:								
Волога біомаса ціанобактерій (після центрифугування)		Отримано	118000					Основний відхід виробництва

					162.01.06.00 000 ПЗ				Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					32

Найменування	Вміст основної речовини, %	Витрачено та отримано	Маса, кг	Об'єм, л	Кількість, штук	Загальна	Основної речовини	Примітка
Г. Втрат, у тому числі:								
Втрати індиго (механічні + інактивація)		Отримано	240				240	Втрати на всіх стадіях
Втрати культуральної рідини (винос газами, проби)		Отримано	13000	13000				10 % на стадії біосинтезу
Механічні втрати на стадіях виділення та сушіння		Отримано	688					
Всього отримано:			132928	143000				

Загальний матеріальний баланс показує, що для отримання 1 тони готового біоіндиго необхідно переробити близько 130 м<sup>3</sup> культуральної рідини. Основними напрямками оптимізації матеріального балансу на наступних етапах є зменшення втрат на стадіях виділення та сушіння, а також зниження витрат індолу за рахунок підвищення конверсії.

### 3.2 Розрахунок і вибір технологічного обладнання

#### 3.2.1 Розрахунок фотобіореактора для пілотного виробництва біоіндиго

##### 1. Вихідні дані для розрахунку

Для розрахунку фотобіореактора прийнято такі параметри (на основі лабораторних даних та літератури - Loprete G. et al. (2025), Troschl et al. (2018), Elghazy et al. (2024), Acién Fernández et al. (2013) та Posten (2009)):

- Річна продуктивність пілотного виробництва: 5 тонн готового біоіндиго на рік.
- Титр індиго в культуральній рідині: 1,0 г/л (реалістичний показник для пілотного етапу з урахуванням оптимізації).
- Тривалість одного циклу (ріст + біотрансформація): 12 діб.
- Кількість циклів на рік: 25 (з урахуванням часу на підготовку, стерилізацію

								Арк.
								33
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.06.00 000 ПЗ			

та очищення реактора).

- Втрати культуральної рідини на стадії біосинтезу: 10 %.
- Тип реактора: трубчастий фотобіореактор - найбільш поширений і добре вивчений для *Synechocystis* sp. PCC 6803.

2. Розрахунок необхідного об'єму фотобіореактора

2.1. Річна потреба в культуральній рідині:

$$V_{\text{рік}} = 5000 \text{ кг} / 1 \text{ г/л} = 5000000 \text{ л} = 5000 \text{ м}^3$$

2.2. Об'єм культуральної рідини на один цикл з урахуванням втрат 10 %:

$$V_{\text{цикл}} = 5000 / 25 \times 1,1 = 220 \text{ м}^3$$

Для забезпечення продуктивності 5 т/рік необхідний робочий об'єм фотобіореактора = 220–250 м<sup>3</sup>.

3. Вибір типу та конструкції фотобіореактора

Для пілотного виробництва стартапу рекомендовано трубчастий фотобіореактор PBR з такими характеристиками:

- Діаметр труб: 0,05–0,06 м (оптимально для *Synechocystis*)
- Довжина однієї петлі: 50–80 м
- Кількість труб в одному модулі: 20–40
- Швидкість циркуляції: 0,3–0,5 м/с (для запобігання осіданню клітин)

Трубчасті PBR добре вивчені для *Synechocystis* sp. PCC 6803, забезпечують хороше освітлення та контроль газообміну, мають прийнятну капітальну вартість на пілотному етапі, легше масштабувати порівняно з плоскими панельними реакторами [7, 28, 30].

4. Розрахунок площі освітлюваної поверхні

Для трубчастого фотобіореактора площа освітлюваної поверхні розраховується за формулою:

$$A = V \times 4 / D$$

де:

V - об'єм реактора, м<sup>3</sup>

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		34

D - діаметр труби, м.

Приймаємо D = 0,05 м):

$$A = 220 \times 4 / 0,05 = 17600 \text{ м}^2$$

Питома площа освітлення:

$$A / V = 17600 / 220 = 80 \text{ м}^2 / \text{м}^3$$

Це значення відповідає рекомендованим параметрам для трубчастих PBR (70–100 м<sup>2</sup>/м<sup>3</sup>).

#### 5. Розрахунок необхідної інтенсивності освітлення

Для досягнення титру 1,0 г/л індиго рекомендована інтенсивність освітлення: 100–150 ммоль фотон м<sup>-2</sup>·м<sup>-1</sup> (на поверхні труби) [16].

При використанні штучного освітлення (LED) загальна потужність освітлення на 220 м<sup>3</sup> реактора становитиме приблизно 180–220 кВт (залежить від типу ламп та ККД).

Технічні характеристики рекомендованого фотобіореактора:

Параметр	Значення	Примітка
Тип реактора	Трубчастий	
Робочий об'єм	220–250 м <sup>3</sup>	На цикл
Діаметр труб	50–60 мм	Оптимально
Загальна площа освітлення	17 600 м <sup>2</sup>	
Інтенсивність освітлення	100–150 ммоль фотон м <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup>	
Кількість модулів	4–6	Залежно від компонування
Продуктивність	5 т біоіндиго/рік	Пілотний масштаб

Для пілотного виробництва біоіндиго потужністю 5 т/рік доцільно встановити трубчастий фотобіореактор загальним робочим об'ємом 220–250 м<sup>3</sup> (4–6 модулів). Така конструкція забезпечує достатню продуктивність при прийнятних капітальних витратах і відносно простому обслуговуванні.

При масштабуванні до 20–50 т/рік рекомендується переходити на модульну систему з кількома незалежними трубчастими реакторами або розглядати плоскі панельні фотобіореактори з внутрішнім освітленням.

### 3.2.2 Загальна характеристика обладнання процесу виробництва індиго мікробним синтезом

Для реалізації пілотного виробництва біоіндиго мікробним синтезом із використанням рекомбінантного штаму *Synechocystis* sp. PCC 6803 у форматі українського біотехнологічного стартапу (продуктивність 5–10 т готового продукту на рік) обрано обладнання, що відповідає критеріям економічної доцільності, можливості масштабування та відносної простоти експлуатації. Вибір обладнання базується на особливостях фотоавтотрофного процесу, необхідності забезпечення стерильності та контролю ключових параметрів (освітленість, рН, температура, концентрація індолу).

#### Стадія 1. Приготування та стерилізація поживного середовища

На цій стадії готується модифіковане середовище BG-11 з додаванням індолу як субстрату для біотрансформації. Для пілотного виробництва доцільно використовувати ємності з мішалкою об'ємом 5–10 м<sup>3</sup> (з урахуванням запасу). Стерилізацію середовища найраціональніше проводити методом in-line стерилізації (безперервна стерилізація при проходженні через теплообмінник), що зменшує тривалість циклу та енерговитрати порівняно з автоклавуванням великих об'ємів.

Основне обладнання: ємність для приготування середовища з мішалкою та системою підігріву (об'єм 8–10 м<sup>3</sup>), пластинчастий теплообмінник для стерилізації, стерильний фільтр (0,2 мкм) для доочищення повітря/CO<sub>2</sub>, насоси (перистальтичні або мембранні) для точного дозування компонентів

Такий підхід дозволяє забезпечити високу продуктивність і знижує ризик контамінації. Подібні рішення широко застосовуються у великих фотобіореакторних установках (Acién Fernández et al., 2013).

#### Стадія 2. Вирощування посівного матеріалу (інокулят)

Для забезпечення стабільного засіву основного фотобіореактора необхідна система послідовного нарощування інокуляту. Рекомендується трирівнева система: лабораторний рівень (колби та малі фотобіореактори

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		36

об'ємом 5–20 л), пілотний інокулятор (фотобіореактор об'ємом 500 л), основний інокулятор (фотобіореактор об'ємом 10 м<sup>3</sup>)

Основне обладнання: система малих фотобіореакторів з LED-освітленням (лабораторний рівень), пілотний трубчастий або колбовий фотобіореактор (об'єм 500 л), основний інокулятор - трубчастий фотобіореактор об'ємом 10 м<sup>3</sup> з системою циркуляції та аерації.

Використання послідовного нарощування інокуляту дозволяє скоротити час основного циклу та підвищити продуктивність. Подібні каскадні системи широко застосовуються у промисловому культивуванні мікробіодоростей (Richmond, 2004; Posten, 2009).

### Стадія 3. Біосинтез (вирощування та біотрансформація)

На основі попередніх розрахунків для продуктивності 5 т/рік рекомендовано встановити трубчастий фотобіореактор загальним робочим об'ємом 220–250 м<sup>3</sup> (рекомендовано 4–6 незалежних модулів по 40–50 м<sup>3</sup> кожен). Така модульна конструкція забезпечує гнучкість виробництва та можливість поетапного запуску.

Основне обладнання стадії: трубчастий фотобіореактор (загальний об'єм 220–250 м<sup>3</sup>), система LED-освітлення (потужність 180–220 кВт), система циркуляції (насоси) та аерації (компресор + система подачі CO<sub>2</sub>), система автоматичного контролю та регулювання параметрів (рН, температура, освітленість, рівень розчиненого кисню), система подачі індолу (дозуючі насоси з можливістю режиму підживлення).

Трубчасті фотобіореактори обрано через оптимальне співвідношення площі освітлення до об'єму та відносно просту конструкцію, що важливо для старту.

### Стадія 4. Відділення біомаси та індиго

Після завершення біотрансформації необхідно відділити тверду фазу (біомасу + індиго). Для пілотного виробництва найбільш доцільним є використання дискової центрифуги або стрічкового вакуум-фільтра (дискова

									162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						37

центрифуга (продуктивність 5–10 м<sup>3</sup>/год, або стрічковий вакуум-фільтр (як дешевша альтернатива на початковому етапі), промивальний реактор з мішалкою (для промивання осаду).

Центрифугування забезпечує більш ефективне відділення та менші втрати продукту порівняно з фільтруванням. Подібні рішення застосовуються при виділенні мікробної біомаси та продуктів метаболізму (Shuler & Kargi, 2002).

#### Стадія 5. Сушіння та стандартизація

Для отримання сухого порошку біоіндиго рекомендовано використовувати вакуумну сушарку (конусну або поличкову). Цей тип сушарки дозволяє проводити процес при зниженій температурі (50–60 °С), що зменшує ризик термічної деструкції пігменту. Основне обладнання: вакуумна сушарка (об'єм 500–1000 л), млин (при необхідності подрібнення), змішувач для стандартизації (якщо проводиться суха стандартизація).

Вакуумна сушарка обрана через нижчу температуру процесу та менші енергетичні витрати порівняно з розпилювальною сушаркою, що важливо на пілотному етапі.

#### Стадія 6. Фасування та пакування

Готовий продукт фасують у крафт-пакети з поліетиленовим вкладишем або пластикові барабани. Обладнання: фасувальна машина, пакувальний стіл, маркувальний пристрій.

Для забезпечення стабільної роботи всього виробництва необхідні такі допоміжні системи:

- Система CIP/SIP (очищення та стерилізація на місці) для підтримання асептичних умов.
- Система підготовки води (зворотний осмос + УФ-стерилізація).
- Система подачі та очищення повітря/CO<sub>2</sub>.
- Система автоматичного управління (SCADA) для контролю всіх

										Арк.
										38
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.06.00 000 ПЗ					

параметрів процесу.

- Система утилізації відходів (біомаса ціанобактерій).

Для пілотного виробництва стартапу рекомендовано використовувати модульний принцип комплектації обладнання. Це дозволяє: поетапно нарощувати потужності, зменшити початкові капітальні витрати, проводити валідацію процесу поетапно.

Основним обладнанням, що визначає продуктивність, є трубчастий фотобіореактор. Решта обладнання (центрифуга, сушарка, ємності) підбирається з урахуванням об'єму реактора та тривалості циклів.

Запропонований комплект обладнання дозволяє реалізувати повний технологічний цикл виробництва біоіндиго на пілотному рівні з прийнятними капітальними та операційними витратами. При переході до промислового масштабу (більше 50 т/рік) доцільно розглянути заміну частини обладнання на більш продуктивні аналоги (наприклад, перехід на кілька великих трубчастих модулів або впровадження плоских панельних фотобіореакторів).

### 3.3 Опис технологічного процесу

Технологічний процес виробництва пігменту індиго мікробним синтезом із використанням рекомбінантного штаму ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803 є періодичним і складається з послідовності взаємопов'язаних стадій, що забезпечують отримання готового продукту - сухого порошку біоіндиго з вмістом основної речовини не менше 92 %. Процес реалізується в умовах пілотного виробництва українського біотехнологічного стартапу потужністю 5 т готового продукту на рік. Весь технологічний цикл від приготування середовища до фасування готового продукту триває приблизно 16 діб.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		39

### Стадія 1. Приготування та стерилізація поживного середовища

Процес починається з приготування модифікованого середовища BG-11 у ємності з мішалкою (позиція Е-1, об'єм 10 м<sup>3</sup>). До ємності послідовно завантажують розраховані кількості компонентів середовища (NaNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, мікроелементи та інші солі) згідно з матеріальним балансом. Після розчинення компонентів середовище підігрівають і направляють на безперервну стерилізацію через пластинчастий теплообмінник (позиція ТО-1). Стерилізацію проводять при температурі 121–125 °С протягом 20–30 секунд. Охолоджене стерильне середовище надходить у ємність для зберігання (позиція Е-2). Загальна кількість приготованого середовища на один цикл становить 1,1 м<sup>3</sup> з урахуванням втрат. На цій стадії контролюють рН (7,8–8,2) та температуру. Відходи на стадії відсутні.

### Стадія 2. Вирощування посівного матеріалу

Стерильне середовище з ємності Е-2 частково використовують для вирощування посівного матеріалу. Процес здійснюють у два етапи: спочатку в лабораторних умовах (фотобіореактори об'ємом 20 л), а потім у пілотному інокуляторі - трубчастому фотобіореакторі (позиція ФБР-І, об'єм 500 л) з системою LED-освітлення. Засів проводять з попередньої культури за асептичних умов. Вирощування здійснюють при освітленості 80–100 ммоль фотон м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>, температурі 28–30 °С та постійному перемішуванні. Тривалість вирощування посівного матеріалу становить 5–7 діб. Готовий посівний матеріал (приблизно 5 % від об'єму основного реактора) перекачують у основний фотобіореактор. Втрати на цій стадії не перевищують 5 %.

### Стадія 3. Підготовка основного фотобіореактора

Перед початком основного циклу трубчастий фотобіореактор (позиція ФБР-2, загальний робочий об'єм 250 м<sup>3</sup>, розділений на 4–6 модулів) піддають очищенню та стерилізації за допомогою системи CIP/SIP. Реактор промивають водою, обробляють лужним та кислотним розчинами, а потім стерилізують паром або хімічними засобами. Після цього реактор заповнюють стерильним

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		40

поживним середовищем з ємності Е-2.

#### Стадія 4. Засів та біосинтез (вирощування та біотрансформація)

У підготовлений фотобіореактор ФБР-2 вносять посівний матеріал зі стадії 2. Процес біосинтезу проводять у два етапи: спочатку вирощують біомасу до необхідної оптичної густини ( $OD_{730} = 4,0$ ), а потім додають індол для біотрансформації. Біотрансформацію здійснюють при освітленості 100–150 ммоль фотон·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>, температурі 28–30 °С, рН 7,8–8,2 та постійній циркуляції культуральної рідини. Індол подають дозовано з підживленням за допомогою перистальтичних насосів для запобігання токсичній дії на клітини. Тривалість стадії біосинтезу становить 10–12 діб. У результаті отримують культуральну рідину об'ємом близько 1,037 м<sup>3</sup> з вмістом індиго приблизно 1,0 г/л. Втрати культуральної рідини на цій стадії становлять близько 10 % (винос з відпрацьованими газами та відбори проб). Відходи на стадії відсутні.

#### Стадія 5. Відділення біомаси та індиго

Культуральну рідину з фотобіореактора ФБР-2 перекачують на дискову центрифугу (позиція ЦФ-1). На цій стадії відбувається відділення твердої фази (біомаси ціанобактерій разом з накопиченим індиго) від рідкої фази. Отриманий вологий осад направляють на подальшу обробку, а центрифугат (фільтрат) збирають для утилізації. Втрати індиго з центрифугатом становлять 7–8 %. Процес центрифугування є періодичним і триває 4–6 годин.

#### Стадія 6. Промивання осаду

Вологий осад з центрифуги ЦФ-1 завантажують у промивальний реактор з мішалкою (позиція РП-1). Осад промивають технічною водою при гідромодулі 1:0,9–1:1 для видалення залишків поживного середовища та водорозчинних домішок. Після промивання осад знову центрифугують. На цій стадії втрати індиго становлять 3–4 %. Промивна вода після використання направляється на очищення.

#### Стадія 7. Сушіння

Промитий осад завантажують у вакуумну сушарку (позиція СУ-1).

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		41

Сушіння проводять при температурі 50–60 °С і залишковому тиску 0,05–0,1 бар до досягнення вологості продукту не більше 5 %. Такий режим дозволяє зберегти якість пігменту та уникнути його термічної деструкції. Тривалість сушіння становить 12–18 годин. Втрати продукту на стадії сушіння становлять 11–12 % (механічні втрати та винос з сушильним агентом). Отриманий сухий індиго (сирий продукт) має вміст основної речовини 85–90 %.

#### Стадія 8. Стандартизація (за потреби) та фасування

За необхідності підвищення вмісту основної речовини до 92 % і вище сухий індиго змішують з інертним наповнювачем у змішувачі (позиція ЗМ-1). Стандартизований продукт фасують у крафт-пакети з поліетиленовим вкладишем або пластикові барабани по 25–50 кг за допомогою фасувальної машини (позиція ФМ-1). Втрати на стадії фасування становлять 2–3 %. Готовий продукт маркують і направляють на склад готової продукції для подальшого відвантаження.

Технологічний процес є періодичним з чітко вираженими циклами. Основними контрольованими параметрами є освітленість (100–150 ммоль фотон·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>), температура (28–30 °С), рН (7,8–8,2) та концентрація індолу. Контроль та регулювання параметрів здійснюються автоматично за допомогою системи SCADA (Supervisory Control and Data Acquisition, система автоматизованого диспетчерського контролю та збору даних). Відходами виробництва є волога біомаса ціанобактерій після центрифугування та промивна вода. Побічні продукти на даному етапі відсутні. Весь процес організовано з дотриманням вимог біобезпеки при роботі з генетично модифікованим організмом.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		42

### 3.4 Схеми виробництва

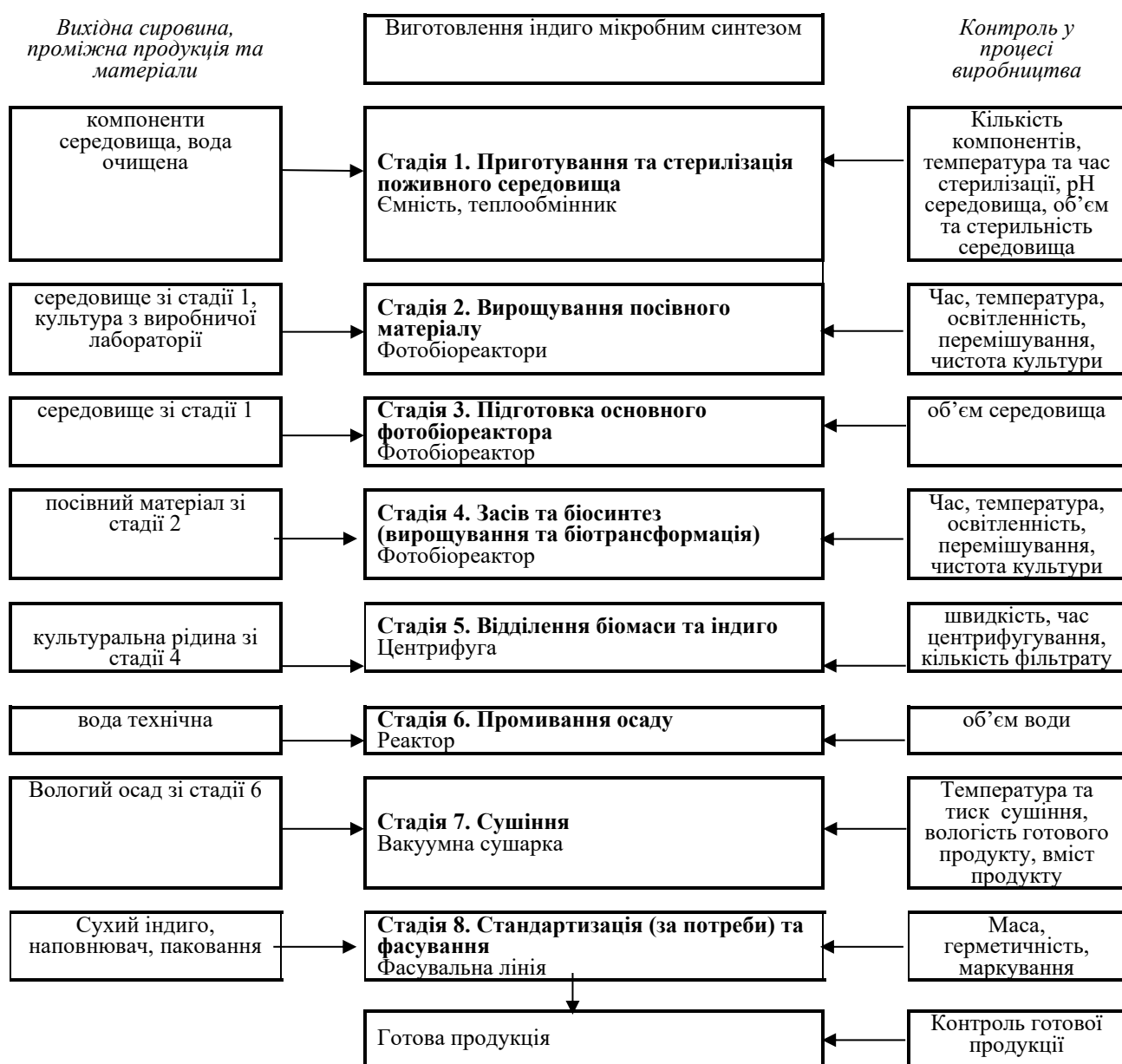


Рис. 3.1 – Технологічна схема виробництва індиго мікробним синтезом

Апаратурна схема наведена на рис. 3.2, креслення апаратурної схеми у додатку.



Таблиця 3.3

## Специфікація основного технологічного обладнання

Стадія процесу	Найменування обладнання	Технічна характеристика	Кількість	Призначення
Приготування середовища	Реактор-змішувач	$V_{ном} = 2000$ л, матеріал AISI 316L, сорочка нагріву/охолодження, якірна мішалка (60–120 об/хв), система CIP/SIP	1 шт.	Приготування та розчинення компонентів модифікованого середовища BG-11
Стерилізація середовища	Пластинчастий теплообмінник (in-line стерилізатор)	Продуктивність до 2000 л/год, температура стерилізації 121–125 °C, час витримки 20–30 с	1 шт.	Безперервна стерилізація поживного середовища
Вирощування посівного матеріалу (I етап)	Лабораторний фотобіореактор	$V_{ном} = 10–20$ л, LED-освітлення, контроль температури, pH та освітленості	2 шт.	Нарощування посівного матеріалу в лабораторних умовах
Вирощування посівного матеріалу (II етап)	Пілотний інокулятор (трубчастий фотобіореактор)	$V_{ном} = 500$ л, LED-освітлення, система циркуляції, автоматичне регулювання pH та температури	1 шт.	Підготовка промислового інокуляту
Біосинтез (основна стадія)	Трубчастий фотобіореактор	Загальний робочий об'єм 250 м <sup>3</sup> (4–6 модулів по 40–50 м <sup>3</sup> ), діаметр труб 50–60 мм, LED-освітлення, система аерації CO <sub>2</sub> , тензометричне зважування	1 комплект	Вирощування біомаси та біотрансформація індолу в індіго
Відділення біомаси	Дискова центрифуга	Продуктивність 3000–5000 л/год, фактор розділення до 10 000 g, матеріал контакту AISI 316L	1 шт.	Відділення клітинної біомаси та накопиченого індіго від культуральної рідини
Промивання осаду	Промивальний реактор з мішалкою	$V_{ном} = 500$ л, якірна мішалка, сорочка охолодження	1 шт.	Промивання осаду для видалення залишків середовища
Сушіння	Вакуумна	$V_{ном} = 300–500$ л,	1 шт.	Отримання

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

162.01.06.00 000 ПЗ

Арк.

45

	сушарка (конусна або поличкова)	робочий тиск до 0,05 бар, температура сушіння 50–60 °С		сухого порошку біоіндиго (вологість ≤ 5 %)
Стандартизація	Змішувач порошків («П'яний бочонок»)	Vном = 200 л, герметичне виконання, швидкість обертання 10–30 об/хв	1 шт.	Змішування сухого індиго з наповнювачем (за потреби)
Фасування	Фасувально- пакувальна лінія (напів автомат)	Продуктивність до 200 кг/год, точність дозування ±1 %, можливість роботи з крафт-пакетами та барабанами	1 комплект	Фасування та пакування готового біоіндиго

### 3.5 Контроль виробництва

Відповідно до принципів системи НАССР (ДСТУ ISO 22000:2019), контроль якості має охоплювати всі етапи технологічного процесу - від надходження сировини до випуску готової продукції. Контроль якості не обмежується лише лабораторними випробуваннями, а включає організацію, документування та прийняття рішень, що гарантують відповідність продукції встановленим вимогам.

У виробництві біоіндиго мікробним синтезом із використанням рекомбінантного штаму *Synechocystis* sp. PCC 6803 особливо важливим є контроль критичних параметрів, оскільки процес є біотехнологічним і чутливим до відхилень умов культивування. На підставі аналізу технологічного процесу було виділено критичні стадії та операції, на яких можливе виникнення ризиків для якості готового продукту. Для кожної критичної точки визначено критичні параметри, критерії прийнятності та методи контролю.

									Арк.
									46
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.06.00 000 ПЗ				

## Контроль критичних стадій і проміжної продукції

№	Критичні точки (критичні стадії, операції)	Критичні параметри і критичні характеристики якості	Одиниця виміру	Критерій прийнятності	Метод контролю
1	Приготування та стерилізація поживного середовища	Температура стерилізації	°C	121–125	Автоматичний (SCADA)
		Час витримки	с	20–30	
		рН середовища після стерилізації	од. рН	7,8–8,2	Потенціометричний
2	Вирощування посівного матеріалу	Оптична густина (OD <sub>730</sub> )	од.	0,8–1,5	Спектрофотометрія
		Морфологія клітин	-	Типова для штаму	Мікроскопія
		Відсутність контамінації	-	Відсутня	Мікробіологічний посів
3	Біосинтез у фотобіореакторі	Освітленість	ммоль фотон·м <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup>	100–150	Люксметр / PAR-сенсор
		Температура	°C	28–30	
		рН	од. рН	7,8–8,2	Термопара
		Концентрація індолу (під час подачі)	ммМ	0,2–1,0	Потенціометричний Спектрофотометрія
4	Біотрансформація (додавання індолу)	Швидкість подачі індолу	г/год	Не більше 0,5	Дозуючий насос (SCADA) Спектрофотометрія
		Концентрація індолу в середовищі	ммМ	≤ 1,0	
5	Відділення біомаси (центрифугування)	Швидкість обертання центрифуги	об/хв %	Згідно з паспортом обладнання	Автоматичний контроль

№	Критичні точки (критичні стадії, операції)	Критичні параметри і критичні характеристики якості	Одиниця виміру	Критерій прийнятності	Метод контролю
6	Сушіння	Вологість осаду		$\leq 82$	Ваговий метод
		Температура сушіння	°C		Термопара
		Залишковий тиск	мбар	50–60	Вакуумметр
		Кінцева вологість продукту	%	$\leq 0,1 \leq 5,0$	Ваговий метод (105 °C)
7	Мікробіологічна чистота процесу	Мікробіологічна чистота середовища після стерилізації	КУО/мл	$< 10$	Мікробіологічний посів на поживні середовища
		Мікробіологічна чистота культуральної рідини	КУО/мл	$< 100$ (крім цільового штаму)	

Найбільш критичною стадією процесу є біосинтез у фотобіореакторі (п. 3 таблиці), оскільки саме на цій стадії відбувається утворення цільового продукту. Відхилення освітленості, температури або рН можуть суттєво знизити вихід індиго або призвести до накопичення побічних продуктів (наприклад, індрубіну).

Важливою також є стадія додавання індолу (п. 4). Индол є токсичним для клітин при концентраціях понад 1,0–1,2 мМ, тому його подача повинна бути строго контрольованою та дозованою.

Стадія сушіння (п. 6) є критичною з точки зору збереження якості пігменту. Підвищення температури понад 60 °C може призвести до часткового руйнування структури індиго та погіршення його фарбувальних властивостей.

Мікробіологічний контроль (п. 7) є обов'язковим на всіх етапах, оскільки процес проводиться з використанням живого біологічного агента. Особлива увага приділяється стерильності середовища та відсутності сторонньої мікрофлори в культуральній рідині.

Основними параметрами, що підлягають постійному контролю під час біосинтезу, є оптична густина культури, вміст індиго, рН, температура, освітленість та концентрація індолу. Методики визначення основних параметрів процесу:

- Оптична густина ( $OD_{730}$ ) - спектрофотометричний метод (спектрофотометр UV-Vis).
- Вміст індиго - спектрофотометричний метод при довжині хвилі 610–620 нм після екстракції в органічний розчинник (наприклад, DMSO або диметилформамід).
- рН - потенціометричний метод (рН-метр з комбінованим електродом).
- Освітленість - вимірювання фотосинтетично активної радіації (PAR) за допомогою квантового сенсора.
- Мікробіологічна чистота - посів на поживні середовища (агар Мюллера-Хінтона, середовище Сабуро) з подальшим підрахунком колоній.
- Вологість продукту - ваговий метод (сушіння при 105 °С до постійної маси).

Оптична густина ( $OD_{730}$ ) культури визначається спектрофотометричним методом. Пробу культуральної рідини розводять стерильним середовищем BG-11 до оптичної густини в діапазоні 0,1–0,8 і вимірюють при довжині хвилі 730 нм на спектрофотометрі. Отримане значення множать на коефіцієнт розведення. Метод є експресним і дозволяє оперативно оцінювати ріст біомаси.

Вміст індиго в культуральній рідині визначають спектрофотометрично після екстракції. До проби культуральної рідини додають диметилсульфоксид

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

(DMSO) або диметилформамід у співвідношенні 1:1, ретельно перемішують і центрифугують. Оптичну густину надосадової рідини вимірюють при довжині хвилі 610–620 нм. Концентрацію індиго розраховують за калібрувальним графіком, побудованим за стандартними розчинами індиго. Метод дозволяє визначати як загальний вміст індиго, так і його концентрацію в рідкій фазі.

pH культуральної рідини контролюють потенціометричним методом за допомогою pH-метра з комбінованим скляним електродом. Вимірювання проводять безпосередньо в реакторі або в відібраній пробі. Для автоматичного підтримання заданого значення pH (7,8–8,2) використовується система автоматичного титрування розчином лугу.

Освітленість (фотосинтетично активна радіація, PAR) вимірюють за допомогою квантового сенсора (PAR-сенсор), який встановлюють на поверхні фотобіореактора. Контроль освітленості є критично важливим, оскільки саме від неї залежить швидкість біотрансформації індолу в індиго.

Концентрацію індолу в середовищі визначають спектрофотометрично при довжині хвилі 270 нм після відповідного розведення проби. Метод дозволяє оперативно коригувати швидкість подачі субстрату в реактор.

Контроль за всіма критичними параметрами здійснюється автоматично за допомогою системи SCADA, яка забезпечує реєстрацію даних, формування тривожних сигналів при відхиленні від заданих меж та архівування інформації. Це дозволяє оперативно реагувати на відхилення та забезпечувати стабільну якість готового біоіндиго.

Контроль якості напівпродуктів та готового біоіндиго включає фізико-хімічні, органолептичні та мікробіологічні показники.

Напівпродукт - культуральна рідина контролюють за такими показниками: оптична густина, вміст індиго, pH, відсутність сторонньої мікрофлори. Мікробіологічний контроль проводять методом посіву на поживні середовища (агар Мюллера-Хінтона та середовище Сабуро) з подальшим підрахунком колоній після інкубації.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		50

Вологий осад після центрифугування контролюють за вологістю (ваговий метод при 105 °С) та вмістом індиго (спектрофотометрія після екстракції).

Готовий продукт - сухий порошок біоіндиго підлягає більш жорсткому контролю. Визначають: зовнішній вигляд - візуально (темно-синій порошок з металевим блиском); вологість - ваговий метод (сушіння при 105 °с до постійної маси, не більше 5 %); вміст основної речовини (індиго) - спектрофотометричний метод після повного розчинення наважки в концентрованій сірчаній кислоті з подальшим розведенням і вимірюванням при 610 нм. вміст індиго повинен бути не менше 92 %; мікробіологічна чистота - відповідно до вимог для нестерильних лікарських засобів або технічних продуктів (загальна кількість аеробних мікроорганізмів, відсутність патогенних мікроорганізмів).

Валідація технологічного процесу є обов'язковою процедурою, що підтверджує здатність процесу стабільно виробляти продукцію необхідної якості. Для пілотного виробництва біоіндиго проводиться процесна валідація (Process Validation), яка включає три етапи: валідацію дизайну процесу, валідацію процесу на пілотному рівні та валідацію на комерційному рівні (при масштабуванні).

На етапі пілотного виробництва здійснюють валідацію за трьома послідовними серіями. Для кожної серії фіксують усі критичні параметри процесу (освітленість, температуру, рН, швидкість подачі індолу, тривалість стадій) та показники якості напівпродуктів і готового продукту. Отримані дані порівнюють з установленими критеріями прийнятності.

Валідація методів аналізу проводиться відповідно до вимог ICH Q2(R1) та Настанови МОЗ України. Для кожного аналітичного методу (спектрофотометричне визначення індиго, визначення вологості, мікробіологічні методи) підтверджують специфічність, лінійність, точність, прецизійність, межу виявлення та кількісного визначення.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

Валідація очищення (Cleaning Validation) проводиться для підтвердження ефективності процедур миття та стерилізації обладнання. Визначають залишкові кількості індиго, компонентів середовища та мікроорганізмів після проведення CIP/SIP-процедур. Для цього використовують методи візуального контролю, хімічного аналізу змивів та мікробіологічного контролю.

Валідація обладнання включає кваліфікацію монтажу (IQ), кваліфікацію функціонування (OQ) та кваліфікацію експлуатації (PQ). Особлива увага приділяється фотобіореактору - перевіряють рівномірність освітлення, герметичність системи, точність роботи датчиків і систем регулювання.

Таким чином, комплексний підхід до визначення параметрів процесу, контролю якості та валідації дозволяє забезпечити стабільне виробництво біоіндиго з гарантованою якістю, що відповідає сучасним вимогам біотехнологічного виробництва.

### 3.6 Екологічні аспекти виробництва

Виробництво пігменту індиго мікробним синтезом із використанням рекомбінантного штаму ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803 є екологічно орієнтованою технологією, що базується на принципах сталого розвитку та «зеленої» хімії. На відміну від традиційного хімічного синтезу індиго, який супроводжується утворенням токсичних відходів та значним споживанням води й енергії, запропонований біотехнологічний процес характеризується значно нижчим екологічним навантаженням. Водночас будь-яке промислове виробництво, навіть біотехнологічне, супроводжується утворенням певної кількості відходів, тому аналіз екологічних аспектів є необхідним етапом розробки технології.

У технологічному процесі виробництва біоіндиго утворюються три основні види відходів: тверді, рідкі та газоподібні.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		52

Тверді відходи представлені переважно вологою біомасою ціанобактерій, що залишається після центрифугування культуральної рідини. На пілотному виробництві потужністю 5 т біоіндиго на рік обсяг цієї біомаси становить приблизно 110–120 тонн на рік (з урахуванням вологості 80–82 %). Біомаса містить клітини *Synechocystis* sp. PCC 6803, залишкові кількості поживних речовин та незначну кількість накопиченого індиго. Цей відхід є біологічно розкладним і не містить високотоксичних сполук.

Рідкі відходи включають центрифугат (рідку фазу після відділення біомаси), промивну воду після промивання осаду та змиви з обладнання, що утворюються під час процедур CIP/SIP. Загальний обсяг стічних вод на один виробничий цикл може досягати 140–160 м<sup>3</sup>. Стічні води характеризуються помірним вмістом органічних речовин, солей та залишків індиго. Вони не містять висококонцентрованих токсикантів, однак потребують очищення перед скиданням у каналізацію або повторним використанням.

Газоповітряні викиди утворюються переважно на стадії біосинтезу у фотобіореакторі та під час сушіння продукту. Відпрацьовані гази з фотобіореактора містять надлишок кисню, вуглекислий газ, а також незначні кількості летких органічних сполук. На стадії сушіння можливе утворення пилу біоіндиго та водяної пари. Обсяг газових викидів є відносно невеликим завдяки замкненому характеру процесу в трубчастих фотобіореакторах.

Для мінімізації негативного впливу на навколишнє середовище передбачено комплекс заходів щодо поводження з відходами.

Тверду біомасу ціанобактерій доцільно використовувати як вторинну сировину. Вона може бути перероблена на органічне добриво після компостування або використана як субстрат для виробництва біогазу в анаеробних умовах. Дослідження показують, що біомаса *Synechocystis* sp. містить значну кількість білків, вуглеводів та ліпідів, що робить її перспективною сировиною для отримання біопалива або кормових добавок. Альтернативним варіантом є використання біомаси для виробництва

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		53

полігидроксибутирату (PHB) - біорозкладного біопластику.

Стічні води підлягають локальному очищенню на виробництві. Основними методами очищення є механічне (відстоювання, фільтрування), біологічне (використання активного мулу або мікроводоростей) та, за необхідності, фізико-хімічне (коагуляція, сорбція). Після очищення вода може бути частково повернута у виробничий цикл (наприклад, для промивання обладнання) або скинута в міську каналізаційну мережу після досягнення нормативних показників. Застосування систем замкнутого водообігу дозволяє суттєво зменшити загальне водоспоживання.

Газоповітряні викиди очищують за допомогою рукавних фільтрів (для уловлювання пилу індиго) та біофільтрів або скрубєрів (для поглинання вуглекислого газу та летких сполук). Відпрацьований газ з фотобіореактора, що містить підвищену концентрацію кисню, може бути частково рецикльований у систему аерації.

Запропонована технологія має низку екологічних переваг порівняно з традиційним хімічним синтезом індиго. Використання ціанобактерій дозволяє здійснювати фіксацію атмосферного CO<sub>2</sub> безпосередньо в процесі біосинтезу, що сприяє зменшенню вуглецевого сліду виробництва. Відсутність необхідності застосування токсичних органічних розчинників та сильних окисників на основних стадіях процесу значно знижує ризик забруднення навколишнього середовища.

Для подальшого підвищення екологічної ефективності виробництва рекомендується впровадити принципи циркулярної економіки. Зокрема, біомасу ціанобактерій доцільно розглядати не як відхід, а як цінну вторинну сировину для суміжних виробництв - органічних добрив, біопалива або біопластиків. Це дозволить не лише зменшити обсяг відходів, а й створити додаткові джерела доходу для підприємства.

Таким чином, розроблена технологія виробництва біоіндиго характеризується помірним рівнем утворення відходів та наявністю реальних

									Арк.
									54
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.06.00 000 ПЗ				

можливостей для їхньої утилізації та переробки. Впровадження комплексної системи поводження з відходами, що включає їхнє очищення, рециклінг та використання як вторинної сировини, дозволить забезпечити відповідність виробництва сучасним вимогам екологічної безпеки та сталого розвитку [16, 28-30].

					<i>162.01.06.00 000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		55

## ВИСНОВОК

У кваліфікаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та розв'язання практичного завдання щодо організації промислового виробництва дієтичної добавки на основі *Akkermansia muciniphila*. Результати роботи дозволяють зробити наступні висновки:

1. За результатами аналізу літературних джерел встановлено, що *A. muciniphila* є унікальним представником мікробіоти, який відіграє ключову роль у підтримці цілісності кишкового бар'єру та метаболічного здоров'я людини. Визначено, що основною складністю її промислового використання є статус суворого анаероба, що потребує спеціалізованого обладнання та суворого контролю газового складу середовища.

2. Встановлено, що позитивний вплив бактерії на організм господаря зумовлений дією специфічних метаболітів, зокрема коротколанцюгових жирних кислот, похідних індолу, білків зовнішньої мембрани та секреторних білків. Ці сполуки активують сигнальні шляхи, що знижують системне запалення та підвищують чутливість тканин до інсуліну, що обґрунтовує доцільність створення препаратів на основі *A. muciniphila*.

3. Обґрунтовано параметри культивування: для забезпечення максимального виходу біомаси визначено оптимальну температуру (37°C) та рівень рН (7,0–7,8). Склад живильного середовища оптимізовано шляхом виключення муцину та включення специфічних субстратів (глюкози, пептону та дріжджового екстракту), збагачених вітамінно-мінеральним комплексом для підтримки росту анаеробного штаму.

4. На основі розрахунків матеріального балансу для пілотної серії готового продукту визначено кількісні характеристики витрат сировини. Встановлено, що загальний вихід продукту з урахуванням технологічних втрат на етапах сепарації та ліофілізації відповідає проектним нормам, що підтверджує доцільність запропонованої схеми.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		56

5. Розроблено технологічну та апаратурну схеми виробництва. Вибране основне обладнання відповідає сучасним вимогам фармацевтичної галузі та стандартам GMP.

6. Визначено критичні точки контролю (ККТ), серед яких основними є: герметичність системи на стадії ферментації, залишкова вологість біомаси після ліофілізації (не більше 3%) та титр життєздатних клітин у готовому продукті (не менше  $10^9$  КУО/г) тощо. Це гарантує стабільну якість та біологічну активність дієтичної добавки.

7. Здійснено екологічну оцінку реалізації технології виробництва дієтичної добавки на базі вітчизняного підприємства ТОВ «БІОЛІК ФАРМА».

Таким чином, поставлена мета роботи досягнута, а розроблена технологічна схема може бути використана для практичного впровадження виробництва пробіотиків нового покоління в Україні.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		57

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. A microbial factory for bio-indigo synthesis: demonstration of sustainable denim dying / M. Planchestainer et al. *Green Chemistry*. 2025. Vol. 27(22). P. 6430–6436. DOI: 10.1039/D5GC01293G.
2. A novel flavin-containing monooxygenase from *Methylophaga* sp. strain SK1 and its indigo synthesis in *Escherichia coli* / H. S. Choi et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003. Vol. 306. P. 930–936. DOI: 10.1016/s0006-291x(03)01087-8.
3. Application of metabolic engineering to improve both the production and the use of biotech indigo / A. Berry et al. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002. Vol. 28. P. 127–133. DOI: 10.1038/sj.jim.7000228.
4. Bio-indigo production in two different fermentation systems using recombinant *Escherichia coli* cells harboring a flavin-containing monooxygenase gene (*fmo*) / G. H. Han et al. *Process Biochemistry*. 2011. Vol. 46(2). P. 417–423. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.10.015.
5. Biosynthesis of indigo in *Escherichia coli* expressing self-sufficient CYP102A from *Streptomyces cattleya* / H. J. Kim et al. *Dyes and Pigments*. 2017. Vol. 140. P. 29–36. DOI: 10.1016/j.dyepig.2017.01.029.
6. Biotransformation of indole by whole cells of recombinant biphenyl dioxygenase and biphenyl-2,3-dihydrodiol-2,3-dehydrogenase / Y. Qu et al. *Biochemical Engineering Journal*. 2013. Vol. 72. P. 54–60. DOI: 10.1016/j.bej.2012.12.021.
7. Chanquia S. N., Vernet G., Kara S. Photobioreactors for cultivation and synthesis: Specifications, challenges, and perspectives. *Eng Life Sci*. 2021. 27. 22(12). 712–724. DOI: 10.1002/elsc.202100070.
8. Characterization of a flavin-containing monooxygenase from *Corynebacterium glutamicum* and its application to production of indigo and

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		58

indirubin / S. P. America et al. *Biotechnology Letters*. 2015. Vol. 37. P. 1643–1650. DOI: 10.1007/s10529-015-1824-2.

9. Citizens of Humanity Joins Forces with Pili to Launch Bio Indigo Denim. URL: <https://wwd.com/sourcing-journal/sj-denim/citizens-of-humanity-agolde-pili-launch-bio-indigo-denim-net-a-porter-1238844849/>

10. Construction of metabolic operons catalyzing the de novo biosynthesis of indigo in *Escherichia coli* / D. Murdock et al. *Bio/Technology*. 1993. Vol. 11. P. 381–386. DOI: 10.1038/nbt0393-381.

11. Gormezano Kasuto I. Cyanobacteria as Cell Factories for the Sustainable Production of Indigo from CO<sub>2</sub> /. Master's thesis, University of Groningen. 2024. URL: <https://fse.studenttheses.ub.rug.nl/33229/1/WBBY901-052024IrisGormezano.pdf> (Date of access: 15.01.2026).

12. Ecofriendly one-pot biosynthesis of indigo derivative dyes using CYP102G4 and PrnA halogenase / S. Namgung et al. *Dyes and Pigments*. 2019. Vol. 162. P. 80–88. DOI: 10.1016/j.dyepig.2018.10.009.

13. Enhanced production of bio-indigo in engineered *Escherichia coli*, reinforced by cyclopropane-fatty acid-acyl-phospholipid synthase from psychrophilic *Pseudomonas* sp. B14-6 / S. Ham et al. *Journal of Biotechnology*. 2023. Vol. 366. P. 1–9. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2023.02.008.

14. Enhancement of Indigo Production by a Metabolically Engineered *Escherichia coli* MG1655 Using Membrane Engineering and Two-Stage Cultivation / H. Hu et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2025. Vol. 73(16). P. 9782–9792. DOI: 10.1021/acs.jafc.5c01400.

15. Engineering artificial biosynthetic pathway enables simultaneous production and in-situ bio-dyeing of indigoids for textiles / Q. Na et al. *Nature Communications*. 2025. Vol. 17(1). P. 1171. DOI: 10.1038/s41467-025-67935-7.

16. Greening the Production of Indigo Blue Exploiting Light and a Recombinant *Synechocystis* sp. PCC6803 Strain Expressing the Enzyme mFMO /

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		59

G. Loprete et al. *Microbial Biotechnology*. 2025. Vol. 18(5). P. e70146. DOI: [10.1111/1751-7915.70146](https://doi.org/10.1111/1751-7915.70146).

17. Hsu T. M. Biochemical Protecting Groups for a Sustainable Indigo Dyeing Method / PhD thesis, University of California, Berkeley. 2019. URL: <https://escholarship.org/content/qt1p95k0jr/qt1p95k0jr.pdf> (Date of access: 15.01.2026).

18. Influence and optimization of growth substrates on indigo formation by a novel isolate *Acinetobacter* sp. PP-2 / Y. Qu et al. *Bioresource Technology*. 2010. Vol. 101. P. 4527–4532. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.033.

19. Indigo production by naphthalene-degrading bacteria / B. Bhushan et al. *Letters in Applied Microbiology*. 2000. Vol. 31. P. 5–9. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2000.00754.x.

20. Indigo production goes green: a review on opportunities and challenges of fermentative production / N. Chandel et al. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2024. 40:62. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03871-2>

21. Is Natural Indigo More Sustainable than Synthetic? Let's Settle the Matter: Is Natural Plant-Based Indigo Dye More Sustainable Than Synthetic Indigo? URL: <https://kingpinsshow.com/is-natural-plant-based-indigo-dye-more-sustainable-than-synthetic-indigo/>

22. Karim I., Pornpakakul S. Comparative Cradle-to-Gate LCA of BioIndigo Production Processes – Conventional Fermentation vs Enzymatic: Environmental Sustainability and Economic Benchmarking. *Pol. J. Environ. Stud.* DOI: 10.15244/pjoes/205817

23. Linke J. A., Rayat A., Ward J. M. Production of indigo by recombinant bacteria. *Bioresources and Bioprocessing*. 2023. Vol. 10. P. 20. DOI: 10.1186/s40643-023-00626-7.

24. Lončar N., van Beek H. L., Fraaije M. W. Structure-Based Redesign of a Self-Sufficient Flavin-Containing Monooxygenase towards Indigo Production. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20(24). P. 6148. DOI: 10.3390/ijms20246148.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		60

25. Metabolic engineering of light-driven cytochrome P450 dependent pathways in *Synechocystis* sp. PCC 6803 / A. Włodarczyk et al. *Metabolic Engineering*. 2016. Vol. 33. P. 1–11.

26. Metabolic Engineering of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for Production of the Plant Diterpenoid Manoyl Oxide / E. Englund et al. *ACS Synthetic Biology*. 2015. Vol. 4. P. 1270–1278. DOI: 10.1021/acssynbio.5b00070

27. Optimization of bio-indigo production by recombinant *E. coli* harboring *fmo* gene / G. H. Han et al. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008. Vol. 42(7). P. 617–623.

28. Pilot-scale production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate with *Synechocystis* sp. PCC 6803 / Troschl C. et al. *Bioresource Technology*. 2018. Vol. 34. 116-125.

29. Photobioreactors for the production of microalgae / Acién Fernández F.G. et al. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2013. 12 (2). DOI:10.1007/s11157-012-9307-6.

30. Posten C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng. Life Sci.* 2009. 9 (3). 165 – 177. DOI:10.1002/elsc.200900003.

31. Roussou S. Metabolic engineering of *Synechocystis* PCC 6803 for acetate production / PhD thesis, Uppsala University. 2026. URL: <https://uu.diva-portal.org/smash/get/diva2:2052292/FULLTEXT01.pdf> (Date of access: 15.01.2026).

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

## **ДОДАТКИ**



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

# ГРАМОТА

нагороджується

## Серветник Дмитро

у секційному засіданні студентського наукового  
товариства кафедри  
біотехнології

VI Всеукраїнська науково-практична конференція з  
міжнародною участю

**«YOUTH PHARMACY SCIENCE»**

Ректор закладу  
вищої освіти



*(Signature)*  
Олександр КУХТЕНКО

10-11 грудня 2025 р. м. Харків



## ПЕРЕВАГИ ВИРОБНИЦТВА ПІГМЕНТІВ МІКРОБНИМ СИНТЕЗОМ

Серветник Д.О.

Науковий керівник: Калюжная О.С.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна  
kalyuzhnayao.s@gmail.com

**Вступ.** Виробництво пігментів мікробним синтезом є актуальною альтернативою традиційним методам отримання барвників з рослин, тварин чи хімічного синтезу, особливо в контексті глобальних проблем екологічної стійкості, здоров'я та економіки. Пігменти, такі як каротиноїди, продигіозини, фікоціаніни, меланіни, індиго синтезуються бактеріями, грибами, дріжджами, водоростями, рослинами як вторинні метаболіти під впливом стресових умов. На відміну від хімічних барвників, які генерують токсичні відходи, мікробний синтез використовує відновлювані ресурси, забезпечуючи біодеградубельні продукти з додатковими біоактивними властивостями (антиоксидантними, антимікробними, протипухлинними). Дослідження демонструють їхню роль у фармацевтиці (наприклад, продигіозин індукуює апоптоз у ракових клітинах HerG2), харчовій промисловості (натуральні барвники з антиоксидантним ефектом для подовження терміну придатності), косметичі (UV-захист) та текстильній промисловості (біо-індиго для фарбування деніму без токсичних хімікатів). Ринок біотехнологічних барвників зростає з CAGR 6-8% до 2032 р., з акцентом на стійкість та зменшення хімікатів. У світі лідери – компанії з Європи та США, але в Україні потенціал для локального виробництва існує завдяки біотехнологічним потужностям.

**Мета дослідження.** Аналіз сучасних тенденцій та переваг виробництва пігментів, зокрема індиго, мікробним синтезом з акцентом на екологічні, економічні та технологічні аспекти, порівняно з хімічними методами та екстракцією з натуральних джерел, з подальшою розробкою рекомендацій для вітчизняних підприємств.

**Матеріали та методи.** Для виконання поставлених завдань використовували теоретичні методи скринінгу та аналізу літературних даних.

**Результати дослідження.** Виробництво пігментів мікробним синтезом має численні переваги над хімічним синтезом та екстракцією з натуральних джерел. Екологічні переваги включають біодеградубельність, відсутність токсичних відходів та зменшення впливу на біорізноманіття, оскільки мікроорганізми не вимагають руйнування екосистем, на відміну від рослинних чи тваринних джерел; наприклад, мікробні пігменти є вуглево-нейтральними та зменшують забруднення в текстильній промисловості, зокрема для індиго, де ціанобактерії (наприклад, *Synechocystis* sp.) використовують CO<sub>2</sub> як джерело вуглецю та світло як енергію, забезпечуючи вуглево-негативне виробництво без конкуренції з харчовими ресурсами. Економічні переваги полягають у низькій вартості (використання дешевих субстратів, як глюкоза чи відходи агропромисловості), високій продуктивності через генетичну маніпуляцію (наприклад, гіперекспресія генів crtE в *Corynebacterium glutamicum* для декапреноксантину чи експресія FMO в ціанобактеріях для індиго) та масштабуванні в біореакторах без сезонних обмежень, що забезпечує стабільну якість і кількість, на відміну від рослинних джерел. До технологічних переваг відноситься відпрацьованість культивування мікроорганізмів в контрольованих умовах (температура 20-40 °C, pH 6-8), з можливістю оптимізації шляхів (наприклад, MEP-шлях в *E. coli* для лікопену чи світло-керований біокаталіз в ціанобактеріях для індиго), що призводить до високої стабільності пігментів (стійкість до pH або температури) та додаткових біоактивних властивостей (антиоксидантні, антимікробні, протипухлинні).

Пігмент індиго є одним з найдавніших і найпоширеніших барвників, що використовується в текстильній промисловості для фарбування тканин, зокрема деніму. Традиційно індиго видобувається з рослини (наприклад, *Indigofera tinctoria*), але сучасне промислове виробництво базується на хімічному синтезі, який виробляє близько 80000 т на рік і передбачає використання токсичних речовин (анілін, формальдегід, ціанід водню, аміак), високих температур (180-300 °C) та генерує значні забруднення довкілля. Зростаюча глобальна криза екологічної стійкості та регуляторні вимоги стимулюють перехід до біотехнологічних методів виробництва. Мікробний синтез з використанням ціанобактерій є перспективним, оскільки дозволяє використовувати CO<sub>2</sub> як джерело вуглецю, світло як енергію, воду та солі, забезпечуючи економічність та екологічність виробництва. Ціанобактерії розглядаються як ідеальні «фабрики», оскільки вони є фотоавтотрофами – використовують вуглекислий газ як єдине джерело вуглецю, а сонячне світло як джерело енергії. Це значно здешевлює та спрощує їхнє вирощування порівняно з гетеротрофними бактеріями. Перспективними мікроорганізмами для мікробного синтезу індиго є генетично модифіковані ціанобактерії, наприклад штамп *Synechocystis sp. PCC6803*, який є модельним для фотосинтетичного виробництва. На відміну від традиційних бактерій, що є робочими конячками у біотехнологіях, таких як *E. coli*, ціанобактерії регенерують NADPH через фотосинтез, дозволяючи світло-керований біокаталіз без додавання цукрів та антибіотиків.

**Висновки.** Виробництво пігментів мікробним синтезом є перспективним завдяки екологічній стійкості, економічній вигоді та багатофункціональності, з потенціалом для зменшення залежності від синтетичних барвників, зокрема для індиго як екологічної альтернативи хімічному синтезу.

#### СУЧАСНІ БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ДО ПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА ВІТАМІНУ K2 МІКРОБІОЛОГІЧНИМ СИНТЕЗОМ

Сидоренко Д.Д.

Науковий керівник: Двінських Н.В.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

Study2021darina@gmail.com

**Вступ.** Вітамін K2 (менахіон) є важливою біологічною сполукою, що виконує ключові функції у підтриманні нормального стану кісткової, серцево-судинної та кровотворної систем. Завдяки здатності активувати білки, залежні від  $\gamma$ -карбоксилювання, він бере участь у регуляції транспорту кальцію, процесах згортання крові та метаболічних реакціях клітин. Особливий інтерес викликає форма МК-7 (менахіон-7), яка характеризується високою біодоступністю, тривалим періодом напіввиведення та вираженим фізіологічним ефектом. На сьогодні найбільш перспективним напрямом отримання МК-7 є мікробний синтез, що забезпечує високу чистоту продукту та економічну ефективність виробництва.

У зв'язку з потребою фармацевтичної промисловості у високоякісному вітаміні K2 розробка та оптимізація біотехнологічних методів виробництва набуває особливого значення. Біотехнологічні підходи потребують розробки та контролю фізико-хімічних параметрів ферментації, застосування високопродуктивних штамів-продуцентів, застосування метаболічної інженерії для підвищення виходу цільового продукту. Дослідження сучасних



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

# ГРАМОТА

нагороджується

**СЕРВЕТНИК Дмитро**

за участь у секційному засіданні студентського наукового  
товариства кафедри  
біотехнології

**XXXII МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ  
КОНФЕРЕНЦІЇ  
МОЛОДИХ ВЧЕНИХ ТА СТУДЕНТІВ  
«АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ СТВОРЕННЯ НОВИХ  
ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ»**

Ректор закладу  
вищої освіти



**Олександр КУХТЕНКО**

15 квітня 2026 р. м. Ужгород



Крім того, результати свідчать, що пептиди мають потенціал не лише у косметології, а й у дерматологічній практиці: вони можуть бути корисними у лікуванні хронічних дерматозів, регуляції бар'єрної функції шкіри та профілактиці фотостаріння. Це підтверджує їхню роль як фармакологічно обґрунтованих агентів із доведеною клінічною ефективністю.

Попри високу ефективність, пептиди мають певні обмеження: обмежене проникнення через шкіру; висока вартість виробництва; потреба у стабілізації в косметичних формулах.

Але водночас перспективи розвитку пов'язані з нанотехнологіями доставки; створенням нових біоактивних пептидів; персоналізованою косметологією.

**Висновки.** Пептиди є одним із найбільш перспективних напрямів у сучасній фармакології та клінічній косметології. Часто їх отримують біотехнологічними шляхами. Пептиди поєднують у собі властивості біологічно активних речовин із доведеною клінічною ефективністю та здатністю забезпечувати виражений косметичний результат. Сигнальні пептиди стимулюють синтез колагену й еластину, транспортні – підвищують biodostupnosc мікроелементів і сприяють регенерації, нейропептиди – модулюють нервову активність, зменшуючи мімічні зморшки, а інгібітори ферментів – уповільнюють руйнування дермального матриксу. Таким чином, пептиди формують міждисциплінарний міст між фармакологією, фармакотерапією та клінічною косметологією, відкриваючи перспективи для створення персоналізованих схем догляду, профілактики вікових змін і лікування дерматологічних патологій.

#### БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ДО ВИРОБНИЦТВА ПІГМЕНТУ ІНДИГО МІКРОБНИМ СИНТЕЗОМ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ ЦІАНОБАКТЕРІЙ

Серветник Д.О.

Науковий керівник: Калужная О.С.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

kalyuzhnayao.s@gmail.com

**Вступ.** Індиго є одним із найважливіших природних та синтетичних барвників, який широко застосовується в текстильній промисловості, особливо для фарбування деніму. Традиційне хімічне виробництво індиго базується на процесах, що використовують токсичні прекурсори (анілін, формальдегід), високі температури, сильні луги та генерують значну кількість токсичних відходів, що створює серйозне екологічне навантаження. У зв'язку з цим зростає інтерес до екологічно чистих біотехнологічних альтернатив – мікробного синтезу індиго. Більшість досліджень зосереджено на гетеротрофних бактеріях (*Escherichia coli*, *Pseudomonas*), проте перспективним є використання фотосинтетичних мікроорганізмів – ціанобактерій. Ціанобактерії здатні використовувати сонячне світло, CO<sub>2</sub> і воду як основні ресурси, що робить процес вуглецево-негативним і енергоефективним. Нещодавні роботи показали можливість інженерії модельної ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803 для світлозалежної біотрансформації індолу в індиго за допомогою гетерологічних ферментів, що відкриває шлях до по-справжньому «зеленого» виробництва барвника.

**Мета дослідження.** Метою роботи є аналіз сучасних біотехнологічних підходів до мікробного виробництва пігменту індиго з акцентом на використання генетично модифікованих ціанобактерій, обґрунтування переваг фотосинтетичної платформи та оцінка перспектив промислового застосування.

**Матеріали та методи.** Дослідження базується на аналізі наукової літератури щодо біосинтезу індіго. Розглядали традиційні хімічні методи, мікробний синтез у гетеротрофних бактеріях та сучасні підходи з використанням ціанобактерій. Особливу увагу приділяли інженерії *Synechocystis* sp. PCC 6803 шляхом стабільної експресії флавін-вмісної монооксигенази (mFMO) з *Methylophaga aminisulfidivorans*. Оцінювали параметри культивування: фототрофні умови, інтенсивність світла, концентрацію субстрату (індол), вихід індіго, конверсію субстрату та стабільність рекомбінантного штаму. Аналізували також метаболічні шляхи (окиснення індолу до індоксилу з подальшою димеризацією в індіго), масштабованість процесу та екологічні переваги порівняно з хімічним синтезом.

**Результати дослідження.** Традиційне хімічне виробництво індіго є енерго- та ресурсоемним і супроводжується утворенням шкідливих відходів. Мікробний синтез у гетеротрофних бактеріях дозволяє отримувати індіго з глюкози через шлях триптофану та індолу, проте вимагає дорогих органічних субстратів і аерації. Використання ціанобактерій вирішує ці проблеми завдяки фотосинтезу. У дослідженні з інженерним штамом *Synechocystis* sp. PCC 6803, що експресує mFMO, здійснено світлозалежну біотрансформацію індолу в індіго. Фермент використовує NADPH і молекулярний кисень (генерований фотосинтезом) для окиснення індолу до індоксилу, який спонтанно димеризується в індіго. Оптимізація умов (інтенсивність світла, концентрація індолу, час інкубації) дозволила досягти виходу 112 мг/л індіго з конверсією індолу до 86 %. Штам продемонстрував стабільність експресії гена та ефективне використання світлової енергії для регенерації кофакторів. Перевагами ціанобактеріальної платформи є зниження вуглецевого сліду, відсутність потреби в органічних джерелах вуглецю, простіша аерація (кисень виробляється *in situ*) та потенціал масштабування у фотобіореакторах. Обмеженнями залишаються токсичність індолу для клітин, відносно низький титр порівняно з оптимізованими *E. coli* системами та необхідність подальшої генетичної оптимізації для прямого біосинтезу з CO<sub>2</sub> без додавання індолу.

**Висновки.** Мікробний синтез індіго із використанням генетично модифікованих ціанобактерій, зокрема інженерного штаму *Synechocystis* sp. PCC 6803, що експресує флавін-вмісну монооксигеназу, є перспективним екологічно чистим підходом, який дозволяє отримувати біоіндіго за рахунок світлової енергії з високою конверсією субстрату та мінімальним вуглецевим слідом. Подальша оптимізація метаболічних шляхів, підвищення толерантності до індолу та масштабування у фотобіореакторах відкриває можливості для створення стійкого, «зеленого» виробництва індіго як альтернативи хімічному синтезу для текстильної промисловості.

#### АНАЛІЗ ФЕРМЕНТАЦІЇ ГІДРОЛІЗАТІВ СОСОВОГО БІЛКА МОЛОЧНОКИСЛИМИ БАКТЕРІЯМИ ТА ДРІЖДЖАМИ

Серветник Р.А.

Науковий керівник: Калюжная О.С.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

kaluzhnyaya.o.s@gmail.com

**Вступ.** Сосвий білок, зокрема концентрат і ізолят з знежиреного соєвого борошна, є цінним джерелом повноцінного білка з збалансованим амінокислотним складом і широко використовується як альтернатива тваринним білкам. Гідролізати соєвого білка отримують



