

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

**«До захисту в ЕК»**  
Директор інституту(декан факультету)  
Наталія ГРЕГІРЧАК  
(ім'я та прізвище)

«\_\_» \_\_ червня \_\_ 2025 \_\_ р.

**«До захисту допущено»**  
Завідувач кафедри  
Віктор СТАБНІКОВ  
(ім'я та прізвище)

«\_\_» \_\_ червня \_\_ 2025 \_\_ р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна

на тему: Одержання рибофлавіну культивуванням *Bacillus subtilis*

Виконав: здобувач IV курсу, групи 1

БУШАК Дарія Андріївна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник УДИМОВИЧ Віктор Миколайович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент ЗАБРОДСЬКА Юліана

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач \_\_\_\_\_

(підпис)

**Київ – 2025 р.**

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і

мікробіоло-

гії

**Віктор СТАБНИКОВ**

“01” березня 2025 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

БУШАК Дарії Андріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання рибофлавіну культивуванням *Bacillus subtilis*  
керівник роботи УДИМОВИЧ Віктор Миколайович, ст. викладач,

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 27 березня 2025 року №188-  
кс

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Bacillus subtilis*, цільовий продукт:  
рибофлавін, об'єм ферментера 1,6 м<sup>3</sup>, коефіцієнт заповнення  
0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗ-  
ДІЛ 1. Характеристика рибофлавіну. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та ха-  
рактеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунту-  
вання рибофлавіну. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5.  
Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва рибофлавіну. РОЗ-  
ДІЛ 6. Специфікація обладнання виробництва рибофлавіну. РОЗДІЛ 7. Опис  
технологічної схеми виробництва рибофлавіну. РОЗДІЛ 8. Основні етапи ви-  
ділення та очищення рибофлавіну РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва рибофла-  
віну.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва рибофлавіну – 1 аркуш формату А1. Апара-  
турна схема виробництв рибофлавіну – 1 аркуш формату  
А1.

## 6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада Консультанта	Підпис, дата	
		завдання ви- дав	завдання прийняв

## 7. Дата видачі завдання 01 березня 2025 року

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика рибофлавіну	01.03.2025- 05.03.2025	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біо- ологічного агента	06.03.2025- 12.03.2025	
3	Техніко-економічне обґрунтування рибо- флавіну	13.03.2025- 24.03.2025	
4	Біосинтез цільового продукту	25.03.2025- 27.03.2025	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва рибофлавіну	28.03.2025- 11.04.2025	
6	Специфікація обладнання виробни рибо- флавіну	12.04.2025- 19.04.2025	
7	Опис технологічної схеми біосинтезу рибо- флавіну	20.04.2025- 04.05.2025	
8	Основні етапи виділення та очищення рибо- флавіну	05.05.2025- 19.05.2025	
9	Контроль виробництва рибофлавіну	20.05.2025- 24.05.2025	
10	Оформлення пояснювальної записки	25.05.2025- 26.05.2025	
11	Виконання графічної частини проекту	27.05.2025- 28.05.25	

**Здобувач**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Дарія БУШАК**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

**Керівник роботи**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Віктор УДИМОВИЧ**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічної та апаратурної схем біосинтезу рибофлавіну з використанням бактерій *Bacillus subtilis*, які синтезують вітамін у концентрації 16,36 г/л. Рибофлавін впливає на клітинне дихання, вуглеводний, білковий і жировий обмін, функцію зору (процеси обміну у рогівці та сітчатці ока), печінки, серцево-судинної і нервової системи, бере участь в утворенні антитіл, еритроцитів, регуляції репродуктивної функції людини.

Розрахована потужність виробництва становить 4987 кг (103 898 л культуральної рідини) вітаміну за рік. Технологічна схема біосинтезу рибофлавіну включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка титрувальних агентів, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 1,6 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,6). Технологія отримання даного водорозчинного вітаміну передбачає використання культивування глибинним періодичним способом.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури (55 найменувань), технологічної (формат А1) та апаратурної (формат А1) схем. Загальний обсяг роботи – 95 сторінок, 18 таблиць, 12 рисунків.

**Ключові слова:** рибофлавін, *Bacillus subtilis*, біосинтез, технологічна схема, апаратурна схема.

## ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological scheme and manufacturing flow chart for riboflavin biosynthesis by *Bacillus subtilis*, at a concentration of 16.36 g/ml. Riboflavin affects cellular respiration, carbohydrate, protein and fat metabolism, vision function (metabolic processes in the cornea and retina), liver, cardiovascular and nervous systems, participates in the formation of antibodies, red blood cells, and the regulation of human reproductive function.

The estimated capacity of biotechnological manufacture is 4987 kg of riboflavin per year. The technological scheme of riboflavin biosynthesis includes preparation of sterile aeration air, preparation of HCl solution and sterile NaOH solution for pH control, preparation and sterilization of seed and fermentation media and technological process (three stages of growing seed material (for flask culture, in inoculators) and fermentation in a fermenter 1.6 m<sup>3</sup> with a filling factor of 0.6.

The qualification work consists of an introduction, eight sections, references (54 items), technological scheme (A1 format) and manufacturing flow chart (A1 format). The total volume of the work is 97 pages, 18 tables, 11 figures.

Keywords: riboflavin *Bacillus subtilis*, biosynthesis, lactose-free products, technological scheme, manufacturing flow chart.

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ .....	3
ЗМІСТ .....	5
ВСТУП .....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА РИБОФЛАВІНУ .....	9
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	15
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування штаму <i>B. subtilis</i> RH44 – продуцента рибофлавіну .....	21
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного... 24	
2.3.1 Морфолого-культуральні ознаки.....	24
2.3.2 Фізіолого-біохімічні ознаки .....	24
2.4. Таксономічний статус біологічного агента .....	25
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	26
РИБОФЛАВІНУ .....	26
3.1. Потреба у виробництві рибофлавіну.....	26
3.2. Обрахунок загальної потужності виробництва рибофлавіну .....	28
3.3. Розрахунок загальної кількості циклів проєктованого виробництва рибофлавіну та об'єму виробничого ферментера.....	29
3.4. Розрахунок кількості необхідних етапів для підготовки посівного матеріалу .....	30
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ .....	33
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ .....	37
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	37
5.1.1 Вибір умов і способу культивування <i>Bacillus subtilis</i> .....	37
5.2. Вибір типу ферментера.....	40
5.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів .....	42
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів .....	42
5.3.2 Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва рибофлавіну .....	45
5.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	51

5.5.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	52
5.5.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в посівних апаратах 20 л та 160 л.....	53
5.5.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері 1,6 м <sup>3</sup> .....	55
5.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника .....	56
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ .....	59
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ. ....	63
РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ РИБОФЛАВІНУ .....	72
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА .....	76
9.1. Мікробіологічний контроль .....	76
9.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури.....	77
9.3 Визначення концентрації цільового продукту (рибофлавіну) .....	78
9.4 Визначення концентрації джерела вуглецевого і азотного живлення у поживному середовищі.....	79
9.5 Визначення концентрації біомаси .....	81
9.6. Карта постадійного контролю .....	83
Перелік літератури: .....	88
ДОДАТКИ.....	94

## ВСТУП

Рибофлавін, вітамін В<sub>2</sub>, 6,7-Диметил-9-(D-1-рибітил)-ізоалоксазин (лат. flavus — жовтий) є важливим водорозчинним вітаміном групи В. Потреба людей у рибофлавіні пов'язана із тим, що цей вітамін не синтезується в організмі людини і необхідно постійне стабільне надходження вітаміну із їжею або добавками, оскільки рибофлавін є ключовим елементом у клітинному метаболізмі, є коферментом у окислювально-відновлюваних реакціях, бере участь в утворюванні клітин крові та АТФ. При недостатчі (авітамінозі) В<sub>2</sub> у людей розвиваються загальна м'язова слабкість і слабкість серцевого м'яза, дегенеративні зміни з боку нервової системи, анемії, виразкові коліти тощо. Джерелами природнього надходження вітаміну В<sub>2</sub> в організм людини є: молоко та молочні продукти, дріжджі, хліб (з борошна грубого помолу), насіння злаків, яйця, м'ясо, свіжі овочі й фрукти, а також у малих кількостях синтезується мікрофлорою кишечника. Проте дуже часто через різні фактори або хвороби, рибофлавіну, що надходить із їжею, не достатньо для задоволення потреб організму і тоді його необхідно споживати додатково, шляхом прийому лікарських засобів або дієтичних добавок [1-6].

На теперішній час найбільш рентабельним шляхом виробництва рибофлавіну у промислових масштабах є використання біотехнологічних способів отримання вітаміну В<sub>2</sub>. Для отримання біологічних шляхом високих концентрацій рибофлавіну можуть бути використані, як правило гриби *Eremothecium ashbyii* та *Ashbya gossypii*, дріжджі *Candida flaveri* та бактерії *Bacillus subtilis*. В останні роки виробництво рибофлавіну за допомогою культивування *B. subtilis* викликало підвищений інтерес дослідників, оскільки передові молекулярно-генетичні методи та технології генної інженерії дають можливості для відносно простих маніпуляцій із цими видами бактерій. Серії рекомбінантних штамів *B. subtilis* для надлишкової продукції рибофлавіну показують високі виходи

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.40 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Бушак Д.А.				<b>ВСТУП</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							7	96 7
Керівник	Удимович В.М.							
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							
					<b>Кафедра БТМ</b>			

синтезованого вітаміну В<sub>2</sub> [1, 2]. Зокрема використання штаму *B. subtilis* RH44 дає змогу синтезувати рибофлавін у кількості 16,36 г/л [1].

Тому на основі дослідження описаного у роботі [1] запропоновано проєкт біотехнологічного виробництва рибофлавіну у промислових масштабах, із наведенням технологічної і апаратурної схем, із описом стадій очистки і дезінфекції процесу виробництва рибофлавіну, а також представлено технологію очистки активного фармацевтичного інгредієнту (АФІ). Крім аналізу ринку доступних миючих і дезінфікуючих засобів і вибору найбільш оптимальних на нашу думку засобів, було також розраховано об'єми і площі виробничого обладнання і приміщення, на базі яких ведеться промислове виробництво і які потребують на періодичне очищення і дезінфекцію. Окремо наведено орієнтовні вартості обраних миючих і дезінфікуючих засобів. Робота демонструє опис технології виділення і очистки АФІ рибофлавін (6 стадійний процес) із культуральної рідини *B. subtilis*, що дає змогу отримати субстанцію із чистотою на рівні 96-98 %.

Таким чином, **новизною кваліфікаційної роботи** є демонстрація комплексної технології промислового біосинтезу рибофлавіну штамом *B. subtilis* RH44 для забезпечення ринку України максимально доступною кількістю дешевої сировини для задоволення потреб фармацевтичної промисловості і медичної галузі, що є одним із прикладів пошуку технології покращення і вдосконалення біотехнологічного виробництва рибофлавіну, як ключового напрямку розвитку біотехнології і фармацевтики в цілому.

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА РИБОФЛАВІНУ

Рибофлавін — представляє собою жовту трициклічну молекулу, що фосфорилується у біологічних організмах (системах). Молекулярна формула  $C_{17}H_{20}N_4O_6$ . Молярна маса 376,36 г/моль [3]. У FAD ізоалоксазинова та аденінова системи є майже копланарними та розташуються одна біля одної. Оскільки флавіни є світлочутливими молекулами, то вони зазнають фотохімічної деградації бічного ланцюга рибітилу, і як наслідок до утворення таких продуктів, як люміфлавін та люміхром. Зважаючи на це, рибофлавін має зберігатися в темному місці або при приглушеному червоному світлі [3].

Рибофлавін це сполука 7,8-диметил-10-(1'-d-рибітил)ізоалоксазину, що утворена із заміщеного ізоалоксазинового ядра з d-рибітильним бічним ланцюгом і відновлюваними атомами азоту в ядрі [3].

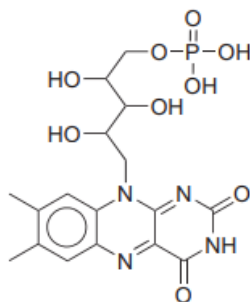
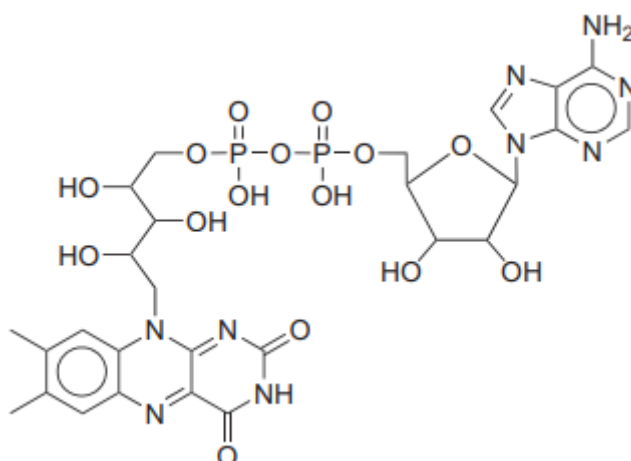


Рис. 1.1. Формула флавінмононуклеотиду [4]



					<b>НУХТ БТЕК 04.01.40 КР ПЗ</b>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Бушак Д. А.			Літ.	Арк.	Акрушіє
Консульт.						9	96
Керівник		Удимович В.М.			<b>Кафедра БТМ<sup>9</sup></b>		
Н. Контр.							
Зав. каф.		Стабніков В.П.					
					<b>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА РИБОФЛАВІНУ</b>		

Рис. 1.2. Формула флавінаденіндинуклеотиду [4].

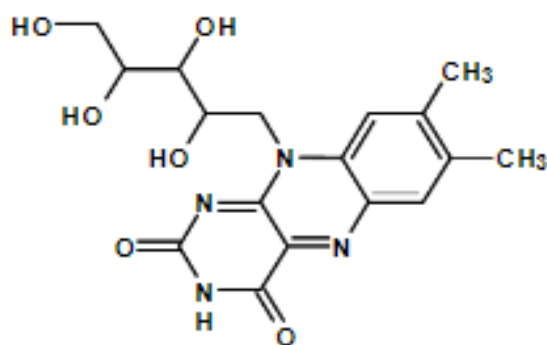


Рис. 1.3. Хімічна структура рибофлавіну [4].

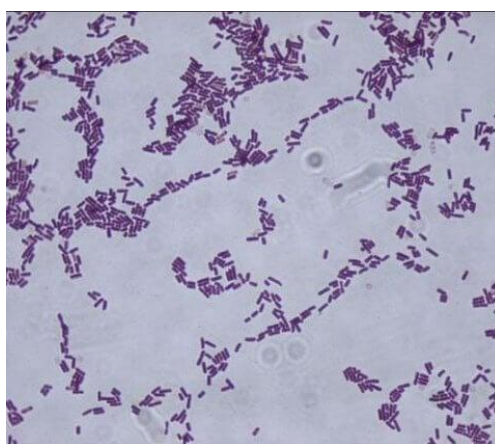


Рис. 1.4. *Bacillus subtilis* [3].

### 1.1 Фізико-хімічні властивості

Розчинність рибофлавіну у воді становить 10-13 мг/дл, проте ця сполука нерозчинна в таких органічних речовинах як ефір, хлороформ і ацетон. Рибофлавін екстрагують хлороформом як люміфлавін тільки після фотохімічного розщеплення бічного ланцюга рибіту. Світіння флавінів спостерігають при  $<370$  нм і  $<450$  нм з флуоресценцією при 520 нм.

Рибофлавін є хімічно активним за рахунок активних груп у N-1, N-5 та C-4 ізоалоксазинового ядра. Метильна група в положенні C-8 відповідає за утворення ковалентного зв'язку з ферментами. Флавінові коферменти володіють окислювально-відновними кофакторами унікальної дії, що дозволяють вступати в одно- або 2-х електронні валентноокислювально-відновні реакції, виступаючи

місцями перемикання між 2-ма донорами електронів (наприклад, НАД(Н), сукцинатом) та облігатними акцепторами одного електрона (наприклад, залізо-сірчані білки, гемові білки). Це можливо за рахунок відновлення із залученням проміжного аніон-радикалу через 2-о етапну послідовність. Аніон-радикал може вступати у реакцію із молекулярним киснем, флавіни служать кофакторами у двоелектронному відновленні  $O_2$  до  $H_2O$  та у активації і розщепленні  $O_2$  у монооксигеназних перетвореннях. Рибофлавін за рахунок окисно-відновних реакцій змінює своєюмолекулярну форму, трансформуючись від плоского окисленого стану до складеного відновленого. Різниця у спорідненостях зв'язаного апопротеїну для кожного із станів, впливає на окисно-відновний потенціал зв'язаного флавіну.

Такі сполуки як діетилрибофлавін, дихлоррибофлавін, препарати фенотіазину і рибітилового бічного ланцюга (d-галактофлавін, 7-етилрибофлавін, d-арабофлавін,) є антагоністами рибофлавіну і за рахунок аналогів ізоалоксазинового кільця вступають у взаємодію із коферментами флавіну (адриаміцин, тетрациклін), або борної кислоти, що зв'язують рибофлавін напряду [3].

Вітамін рибофлавін ( $B_2$ ) в організмі функціонує у формі 2-х коферментів – флавінаденіндинуклеотиду (FAD) та флавінмононуклеотиду (FMN).

## **1.2 Фармакокінетика і фармакодинаміка**

Після потрапляння в організм, рибофлавін встмоктується через шлунково-кишковий тракт, рівномірно роподіляючись у малих кількостях у всіх тканинах, відіграючи важливу роль у метаболізмі кетонових тіл, вуглеводів, білків і жирів.

Через низьку розчинність вітаміну у воді і легковиводимість із організму із сечею, при пероральному вживанні рибофлавін не є токсичним. Рибофлавін часто додають до корисних для здоров'я напоїв у якості популярної добавки. Крім того, одним із медичних показів до використання рибофлавіну є терапія мігрені.

Препарати крові разом із рибофлавіном і УФ-опроміненням знижуються активність реплікації патогенних мікроорганізмів. Використання рибофлавіну є досить ефективним під час терапії ядерної катаракти [3].

В якості коферментів рибофлавін є складовою окиснювально-відновних ферментів [3].

### 1.3 Функції рибофлавіну

Флавінові ферменти відповідають за синтез піридоксину (вітаміну B<sub>6</sub>), прискорюючи трансформацію в його активну форму в організмі, окиснюють жирні кислоти і альдегіди, руйнують чужорідні D-ізомери – продукти життєдіяльності бактерій, здатні зберігати відновленому стані глутатіон та гемоглобін.

Рибофлавін регулює клітинне дихання, вуглеводний, білковий і жировий обмін, процеси обміну у рогівці та сітчатці ока, що регулюють зір. Підтримує функції серцево-судинної і нервової системи і печінки, репродуктивної функції, приймає участь в синтезі антитіл, еритроцитів, регуляції. Зважаючи на це, рибофлавін є найбільш дефіцитним, тому необхідно регулярно відновлювати його рівень в організмі при добовій дозі в середньому 1,3-1,8 мг.

Недостатня кількість вітаміну призводить до затримки росту у дітей (рахіту), периферичної невропатії кінцівок, запалення слизової оболонки порожнини рота (стоматиту), гласиту, себорейного дерматиту, болі в очах, катаракти, кон'юнктивіту і кератиту, порушення функцій центральної нервової системи (іпохондрія, істерія). Крім того, дефіцит рибофлавіну спостерігається запаленні щитовидної залози, діабеті, алкоголізмі, шлунково-кишкових розладах, цирозі печінки і хронічному стресі.

Для того, що забезпечити добову норму вітаміну в організмі, часто недостатньо натуральних харчових продуктів, тому використовують харчову добавку E-101. Ця добавка додається з метою вітамінізації під час виробництва таких типів харчових продуктів як: зерноборошняних, кондитерських, молочних, сухих швидкокорозчинних напоїв, дієтичного та дитячого харчування і гомогенних вітамінних сумішей. Є 3 типи цієї добавки: 1) E 101 – чистий рибофлавін; 2) E 101 – мононатрієва сіль рибофлавін 5-фосфат, що добре розчинна у воді; 3) E 101 – бактеріальний рибофлавін [3].

#### **1.4 Токсичність рибофлавіну**

Рибофлавін практично нетоксичний, проте внаслідок впливу УФ або денного світла здатен продукувати активні форми кисню (АФК), які підвищують ризик пошкодження тканин протягом фототерапії (під час лікування різних форм раку), особливо в наслідок присутності  $\text{Cu}^{2+}$  (гіпербілірубінемії). Під час взаємодії ізоалоксазинового кільця із світлом можуть виникати побічні кілтинні ефекти, що призводять утворення потенційно токсичних пероксидів або інших АФК, і як наслідок функціонування нетипового метаболіту триптофану. Дослідження показали [5], що аддукт триптофан-рибофлавін проявляє гепато- та цитотоксичний вплив і порушує цілісність білків кришталика та сітківки, які постійно піддаються впливу світла

#### **1.5 Лікарські препарати, що містять рибофлавін і методи визначення та виділення**

На сьогоднішній день найбільш широкорозповсюдженим методом визначення рибофлавіну є високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) з підвищеною чутливістю. Крім того, рибофлавін часто екстрагують в 0,1 н розчині соляної кислоти 30 хв або на водяній бані протягом 1–2 год. Метод кислотної екстракції полягає у здатності флавінів звільняються від зв'язку з білками, а FAD і FMN при цьому трансформуються на вільний рибофлавін. У продуктах, багатих на рибофлавін і білком, кислотна екстракція супроводжується ферментативним гідролізом з метою повного вивільнення флавінів. Процес виділення та кількісного визначення має виконуватися при приглушеному освітленні та з використанням темного непрозорого посуду.

Для аналізу рибофлавіну у біологічних зразках (плазма/сироватка), для екстракції краще обрати 5–10% трихлороцтову кислоту, що дозволяє денатурувати слабо зв'язаних молекул із білками, при цьому зберігаючи фосфорильовані форми незмінними [6].

**ЛЗ що містять у своєму складі рибофлавін**

<b>Назва ЛЗ</b>	<b>Концентраці рибофлавіну,мг</b>	<b>Виробник</b>
Гексавіт	2,0	«Технолог»
Ундевіт	2,0	
Ревіт	1,0	«Біостимулятор», «Технолог», Київський вітамінний завод
Рибофлавін моно- нуклеотид	1% розчин для ін'єкцій	
Пексвітал	1,8	Хіміпекс
Юнівіт	0,3	Київський вітамінний завод [7].
Комплевіт	15,0	

## РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

### 2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Рибофлавін (вітаміном В<sub>2</sub>) є однією із ключових речовин для нормального розвитку, відтворення, лактації та фізичного благополуччя. Рибофлавін є попередником кількох кофакторів, таких як флавінаденіндинуклеотид і флавін-мононуклеотид, які беруть участь у різноманітних біохімічних реакціях. Вищі тварини, включаючи людину, не мають внутрішньої системи для виробництва рибофлавіну, і вони в основному отримують рибофлавін з харчових джерел [8].

Менш ніж за 15 років виробництво рибофлавіну перейшло від хімічного синтезу до ексклюзивного біотехнологічного синтезу [9]. Серед мікроорганізмів вчені виділяють кілька груп найбільш активних продуцентів рибофлавіну: бактерії *Clostridium sp.*, *Bacillus sp.*, *B. subtilis*, *Corynebacterium sp.*, дріжджі родів *Saccharomyces sp.*, *Candida sp.*, *Candida famata* а також гриби *Eremothecium sp.*, *Ashbya sp.* [10 – 14]. *A. gossypii* і *B. subtilis* мають два спільних важливих попередника для біосинтезу рибофлавіну: рибулозо-5-фосфат, що отримують із пентозо-фосфатного шляху і гуанозинтрифосфат, який утворюється в результаті біосинтезу пуринів [9].

Таблиця 2.1 демонструє особливості культивування різних штамів мікроорганізмів під час біосинтезу вітаміну В<sub>2</sub>. Найбільшу кількість синтезованого рибофлавіну (26,8 г/л) протягом 90 год культивування демонструє *Bacillus subtilis* КССМ 10445 [1]. *B. subtilis* RH44 за 48 год культивування продукує 16,36 г/л [9], а *B. subtilis* RF1 за аналогічний період часу – 9,40 г/л рибофлавіну [10]. *Ashbya gossypii* AgOXA50 за 192 год вирощування синтезує 5,20 г/л вітаміну [11]. Найменшу кількість В<sub>2</sub> синтезує *Lactobacillus fermentum* KTLF1 за 24 год вирощування [12].

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.40 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Бушак Д. А.				<b>РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</b>	Лім.	Арк.	Акрушів
Консульт.							15	96
Керівник	Удимович В.М.					15		
Н. Контр.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

На наступному етапі вибору продуцента, розрахуємо вартість поживних середовищ для культивування обраних продуцентів рибофлавіну (табл. 2.2).

Таблиця 2.1

## Особливості одержання рибофлавіну різними продуцентами

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація рибофлавіну, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	Компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Bacillus subtilis</i> KCCM 10445	Глюкоза дріжджі сухі кукурудзяний настій (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> еритроміцин C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	620,00 46,70 31,70 2,00 0,50 17,50 7,50 5,00 10,00	90	26,8	pH 7,2–7,4, t° = 37°C	Lee K.H., Park Y. H., Han J. K., Park J. H., Lee K. H., Choi H., MICROORGANISM FOR PRODUCING RIBOFLAVIN AND METHOD FOR PRODUCING RIBOFLAVIN USING THE SAME. 2007. <a href="https://patentimages.storage.googleapis.com/07/0d/b1/59b41f7702da89/US7166456.pdf">https://patentimages.storage.googleapis.com/07/0d/b1/59b41f7702da89/US7166456.pdf</a>
<i>B. subtilis</i> RH44	Глюкоза Дріждж. екстракт K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	80,0 5,00 1,00 1,00 1,00	48	16,36	pH 7,2, t° = 41°C	Wu Q-L., Chen T., Gan Y., Chen X., Zhao X.-M. Optimization of riboflavin production by recombinant <i>Bacillus subtilis</i> RH44 using statistical designs. <i>Biotechnological products and process engineering</i> . 2007, 76:783–794. DOI: 10.1007/s00253-007-1049-y

Закінчення табл. 2.1

<i>B. subtilis</i> RF1	Глюкоза Дріждж. екстракт (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	600,00 10,00 6,00 5,00 0,50	48	9,40	pH 6,9, t° = 40°C, частота обертів 180 об/хв	Man Z.-W. , Rao Z.-M., Cheng Y.-P., Yang T.-W., Zhang X., Xu M.-J., Xu Z.-H. Enhanced riboflavin production by recombinant <i>Bacillus subtilis</i> RF1 through the optimization of agitation speed. <i>World J Microbiol Biotechnol.</i> 2014, 2:661-667. DOI: 10.1007/s11274-013-1492-0
<i>Ashbya. gossypii</i> AgOXA50	Кукуруд. настій ди- кого типу желатин KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> гліцин Co <sup>2+</sup> Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup> ріпакова олія	60,00 30,00 1,50 1,50 0,000002 0,000005 0,000010 0,000001 50,00	192	5,20	pH 6,8, t° = 28°C, частота обертів 600 об/хв	Sugimoto T., Morimoto A., Nariyama M., Kato T., Park E. Y. Isolation of an oxalate-resistant <i>Ashbya gossypii</i> strain and its improved riboflavin production. <i>J Ind Microbiol Biotechnol.</i> 2010, 37:57–64. DOI: 10.1007/s10295-009-0647-3
<i>Lactobacillus fermentum</i> KTLF1	Глюкоза пептон екстракт яловичини дріждж. екстракт твін-80 CH <sub>3</sub> COONa C <sub>6</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O MnSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	20,00 10,00 10,00 5,00 1,00 5,00 2,00 2,00 0,20 0,05	24	2,36	pH 6,5, t° = 37°C	Thakur K., Tomar S. K., De S. Lactic acid bacteria as a cell factory for riboflavin production. <i>Microbial Biotechnology</i> , 2015 DOI: 10.1111/1751-7915.12335

**Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів  
рибофлавіну**

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Bacillus subtilis</i> KCCM 10445	Глюкоза	620,00	100,00	62	<u>2</u>
	дріжджі сухі	46,70	300,00	14,01	<u>2</u>
	Екс. кукурудзяний	31,70	78,00	2,4726	<u>2</u>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,00	60,00	0,12	<u>2</u>
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,50	324,00	0,162	<u>3</u>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,50	180,00	3,15	<u>2</u>
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,50	210,00	1,575	<u>2</u>
	еритроміцин	5,00	2700	13,5	<u>2</u>
	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	10,00	1652,00	16,52	<u>5</u>
<b>Вартість 1 л середовища – 113,50 грн</b>					
<i>B. subtilis</i> RH44	Глюкоза	80,00	100,00	8	<u>2</u>
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,00	210,00	0,21	<u>2</u>
	Дріжд. екстракт	5,00	2620,00	13,1	<u>1</u>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00	180,00	0,18	<u>2</u>
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,00	324,00	0,324	<u>3</u>
	<b>Вартість 1 л середовища – 21,84 грн</b>				
<i>B. subtilis</i> RF1	Глюкоза	600,00	100,00	60	<u>2</u>
	Дріжд. екстракт	10,00	2620,00	26,2	<u>1</u>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,00	89,00	0,534	<u>2</u>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,00	180,00	0,9	<u>2</u>
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,50	324,00	0,162	<u>3</u>
<b>Вартість 1 л середовища – 87,79 грн</b>					
<i>Ashbya. gossypii</i> AgOXA50	Екс. кукурудзяний	60,00	78,00	4,68	<u>2</u>
	желатин	30,00	567,00	0	<u>2</u>
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,50	210,00	17,01	<u>2</u>
	гліцин	1,50	490,00	0,315	<u>4</u>
	Co <sup>2+</sup>	0,000002	-	-	-
	Mn <sup>2+</sup>	0,000005	-	-	-
	Zn <sup>2+</sup>	0,000010	-	-	-
	Mg <sup>2+</sup>	0,000001	-	-	-
	ріпакова олія	50,00	78,00	3,90	<u>2</u>
<b>Вартість 1 л середовища – 22,74 грн</b>					

<i>Lactobacillus fermentum</i> KTLF1	Глюкоза	20,00	100,00	2	<u>2</u>
	пептон	10,00	1600,00	16	<u>2</u>
	екстракт яловичини	10,00	7296,00	72,96	<u>6</u>
	дріждж. екстракт	5,00	2620,00	13,1	<u>1</u>
	твін-80	1,00	330,00	0,33	<u>2</u>
	CH <sub>3</sub> COONa	5,00	90,00	0,45	<u>2</u>
	C <sub>6</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	2,00	450,00	0,9	<u>2</u>
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,00	210,00	0,42	<u>2</u>
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,20	324,00	0,0648	<u>3</u>
	MnSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,05	1988,00	0,0994	<u>3</u>
<b>Вартість 1 л середовища – 106,22 грн</b>					

**Примітка.** \* – Ціни наведено станом на березень 2024 р.

**1** – <http://agar.com.ua/>, **2** – <https://prom.ua/ua>, **3** – <https://fresh.co.ua/>, **4** – [profit.com.ua](http://profit.com.ua), **5** – <https://flagma.ua/>, **6** – <http://lab-mir.com/>

Виходячи із даних табл. 2.2, найбільш економічно вигідним поживним середовищем вартістю 21,84 грн, є середовище для культивування *B. subtilis* RH44. Найдорожчим поживним середовищем, вартістю 113,50 грн, є середовище для вирощування *B. subtilis* KCCM 10445.

Таблиця 2.3

### Умовна вартість 1 г рибофлавіну, синтезованого на різних поживних середовищах

Біологічний агент	Концентрація рибофлавіну, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного рибофлавіну за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Bacillus subtilis</i> KCCM 10445	26,80	90	0,29	113,50	4,23
<i>B. subtilis</i> RH44	16,36	48	0,34	21,84	1,33
<i>B. subtilis</i> RF1	9,40	48	0,19	87,79	9,33
<i>Ashbya. gossypii</i> AgOXA50	5,20	192	0,027	22,74	4,37
<i>Lactobacillus fermentum</i> KTLF1	2,36	24	0,098	106,22	45,01

На фінальному етапі вибору найефективнішого біологічного агента вираховуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3). Як видно із даних у *табл. 2.3*, найменшу кількість рибофлавіну за 1 год продукує *Ashbya. gossypii* AgOXA50 – 0,027 г/год, а найбільшу (0,34 г/год) *B. subtilis* RH44. Умовна вартість цільового продукту у *B. subtilis* RH44 найнижча і становить 1,33 грн/г. У інших 4-х продуцентів умовна вартість цільового продукту, вища за *B. subtilis* RH44 як мінімуму у 3,2 рази (для *B. subtilis* КССМ 10445 ) і як максимум у 34 рази (для *Lactobacillus fermentum* KTLF1).

Отже, враховуючи всю вище зазначену інформацію, найбільш оптимальним продуцентом є *B. subtilis* RH44.

## **2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування штаму *B. subtilis* RH44 – продуцента рибофлавіну**

Тривалість культивування 48 год, концентрація рибофлавіну в культуральній рідині становить 16,36 г/л [1].

### ***Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення***

*Потреби для синтезу рибофлавіну.* Як джерело вуглецю для одержання рибофлавіну використовуються глюкоза. Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 16,36 г рибофлавіну. Молекулярна маса рибофлавіну становить 376,36. Отже, у 376,36 г рибофлавіну ( $C_{17}H_{20}N_4O_6$ ) міститься 204 г Карбону, а в 16,36 г рибофлавіну  $(16,36 \times 204,0) / 376,36 = 8,86$  г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах сахарози міститься 8,86 г Карбону. Молекулярна маса глюкози ( $C_6H_{12}O_6$ ) – 180,15. У 180,15 г глюкози міститься 72 г Карбону, а 8,86 г Карбону міститься у  $(8,86 \times 180,15) / 72 = 22,23$  г глюкози. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на глюкозі близько 40% субстрату окислюється до  $CO_2$  для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме  $(22,23 \times 0,4) + 22,23 = 31,12$  г/л.

### ***Потреби для синтезу біомаси.***

Кількість глюкози необхідної для синтезу біомаси =  $80,00 - 31,12 = 49,88$  г. Оскільки під час вирощування продуценту на глюкозі близько 40 % субстрату ви-

користується на «холосте окиснення» для одержання енергії, тому щоб синтезувати необхідну кількість біомаси у середовище необхідно внести  $x \cdot 0,4 + x = 49,88$ ;  $x = 35,62$  г глюкози. У такій кількості глюкози міститься  $35,62 \cdot 72 / 180,15 = 14,24$  г Карбону. У біомасі міститься 50 % Вуглецю, тому 14,24 г такого елемента міститься у  $14,24 \cdot 2 = 28,48$  г біомаси.

### ***Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення***

*Потреби для синтезу біомаси.* Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 28,48 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 2,84 г.

Продуцент рибофлавіну може асимілювати як джерело азотного живлення органічний Нітроген. Такий тип азоту містить 43 % білків, а до складу таких білків входить близько 16 % Нітрогену.

Для одержання рибофлавіну в промислових умовах використовується середовище, яке містить як джерело органічного Нітрогену дріжджовий екстракт. Оскільки у 100 г білка міститься 16 г азоту, тоді 2,84 г Нітрогену у  $(100 \cdot 2,84) / 16 = 17,75$  г білку. В перерахунку на дріжджовий екстракт отримуємо 41,28 г/л.

*Потреби для синтезу рибофлавіну.* Оскільки Нітроген входить до складу не тільки біомаси, а й рибофлавіну, то потрібно розрахувати вміст дріжджового екстракту у середовищі, необхідного для одержання 16,36 г/л рибофлавіну.

Молекулярна маса рибофлавіну ( $C_{17}H_{20}N_4O_6$ ) становить 376,36. У 376,36 г рибофлавіну міститься 64 г Нітрогену, тоді у 16,36 г рибофлавіну міститься 2,78 г Нітрогену. Далі розрахуємо, в якій кількості дріжджового екстракту (в якому міститься 43 % білків, а до складу таких білків входить близько 16 % Нітрогену) міститься ця кількість Нітрогену.

У 100 г білку міститься 16 г азоту, тоді 2,78 г Нітрогену міститься у  $(2,78 \times 100) / 16 = 17,4$  г білку, що у перерахунку на дріжджовий екстракт складає 40,46 г.

Отже сумарно поживне середовище для росту продуцента і біосинтезу рибофлавіну має містити  $41,28 + 40,46 = 81,74$  г дріжджового екстракту.

### ***Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі***

Для одержання рибофлавіну в промислових умовах використовується середовище, яке містить як джерело мінерального Фосфору гідроортофосфат калію –  $K_2HPO_4$  та дигідроортофосфат калію  $KH_2PO_4$ , які вносяться у середовище у концентрації 1,0 та 1,0 г/л.

Вміст Фосфору у  $K_2HPO_4$  становить  $(31/174) \cdot 100 = 17,8 \%$ , а у  $KH_2PO_4$  –  $(31/136) \cdot 100 = 22,8 \%$ . Отже, у  $KH_2PO_4$  міститься у  $22,8/17,8=1,28$  рази більше Фосфору, ніж у  $K_2HPO_4$ .

Прийmemo вміст Фосфору (P) у  $K_2HPO_4$  за 1 (одиницю), тоді вміст P у  $KH_2PO_4$  буде 1,28. Отже, можемо записати  $2,28 \times x = 2,84$ , звідки  $x \approx 1,25$ .

Таким чином, вміст P у вигляді  $K_2HPO_4$  становить 1,25 г/л, а у вигляді  $KH_2PO_4$  –  $1,25 \times 1,28 \approx 1,59$  г/л. Відповідно, концентрація цих солей у середовищі становить  $(174 \times 1,25) / 31 = 7,01$  г/л та  $(136 \times 1,59) / 31 = 6,97$  г/л.

Отже, середовище для культивування продуцента рибофлавіну містить 7,01 г/л  $K_2HPO_4$  та 6,97 г/л  $KH_2PO_4$ .

### ***Інші компоненти середовища***

Джерелами таких необхідних для росту бактерій елементів, як Сульфур є сіль сульфату магнію ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , яка не можуть лімітувати ріст продуцента рибофлавіну (як і інших мікроорганізмів), оскільки зазвичай вноситься у середовище у надлишку.

Скоригований після перевірного розрахунку склад поживного середовища для біосинтезу рибофлавіну штамом *B. subtilis RH44* наведено у *табл. 2.4*.

*Таблиця 2.4*

#### **Склад поживного середовища для культивування продуцента рибофлавіну**

<b>Компоненти поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>
Глюкоза	31,12
$K_2HPO_4$	7,01
$KH_2PO_4$	6,97
Дріжджовий екстракт	81,74

## 2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного

### 2.3.1 Морфолого-культуральні ознаки

*Bacillus subtilis* - граммпозитивна бактерія, яка утворює термостійкі спори, і не є патогенною [1]. Клітини мають паличкоподібну форму, заокруглені кінці та розміри 0,7-0,8 мкм × 2,0-3,0 мкм. Клітини розташовані переважно поодинокі або парно і рідко коли утворюють ланцюги. Клітини рухливі з перитрихальними джгутиками [12].

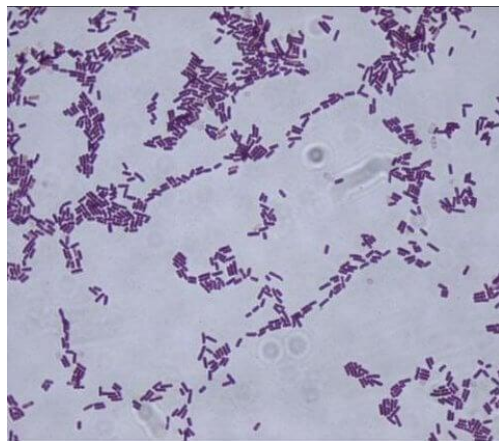


Рис. 2.1 Морфологічні ознаки *B. subtilis* [12]

При вирощуванні на поживному агаризованому середовищі утворюють круглі шорсткі колонії, непрозорі, нечітко-білого або злегка жовтого забарвлення з нерівними краями [13]. Розмір колоній коливається в межах 2-3 мм у діаметрі. Колонії мають різні нерівні краї, від хвилястих до фімбріальних. Колір колоній переважно білий, але може коливатися від кремового до коричневого. На кров'яному агаризованому середовищі утворюють колонії сірого або білого кольору розміром 3-4 мм [12].

### 2.3.2 Фізіолого-біохімічні ознаки

Клітини *B. subtilis* є факультативними анаеробами. Ріст *B. subtilis* може відбуватися на мінімальному мінеральному поживному середовищі з глюкозою та амонійною сіллю як єдиними джерелами вуглецю та азоту відповідно [12]. Клітини *B. subtilis* здатні використовувати органічні кислоти як джерела вуглецю та енергії [19].

Для росту *B. subtilis* оптимальна температура становить 28-30°C, мінімальна температура 5-20°C, максимальна температура 45-55°C. Клітини *B. subtilis* здатні рости у діапазоні рН від 5,5 до 8,5 [12]. Більшість штамів *B. subtilis* не є капсульованими, проте деякі штами утворюють капсули, які за хімічним складом є поліглютаміною кислотою або полісахаридами [12].

Клітинна стінка клітин *B. subtilis* складається з одиниць пептидоглікану з мезодіамінопімеліною кислотою. Клітинна мембрана складається з подвійного ліпідного шару та білкових структур, які відповідають за плинність мембрани.

Геном *B. subtilis* має довжину 4214810 п.о.[12].

#### **2.4. Таксономічний статус біологічного агента**

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Bacillus subtilis* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [14].

Царство: *Bacteria*

Тип: *Firmicutes*

Порядок: *Bacillales*

Підпорядок: *Bacillaceae*

Сімейство: *Bacillaceae*

Рід: *Bacillus*

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

### РИБОФЛАВІНУ

#### 3.1. Потреба у виробництві рибофлавіну

Рибофлавін, вітамін В<sub>2</sub>, 6,7-Диметил-9-(D-1-рибітил)-ізоалоксазин (лат. flavus — жовтий) — метильоване похідне трициклічної сполуки ізоалоксазину і спирту рибітолу [15].

Для отримання біологічних шляхом високих концентрацій рибофлавіну можуть бути використані, як правило гриби *Eremothecium ashbyii* та *Ashbya gossypii*, дріжджі *Candida flaveri* та бактерії *Bacillus subtilis*. В останні роки виробництво рибофлавіну *B. subtilis* викликало підвищений інтерес дослідників, оскільки передові молекулярно-генетичні методи та технології генної інженерії дають можливість для відносно простих маніпуляцій із цими видами бактерій. Серії рекомбінантних штамів *B. subtilis* для надлишкової продукції рибофлавіну показують високі виходи синтезованого вітаміну В<sub>2</sub> [16, 17, 18].

Потреба у рибофлавіні пов'язана із тим, що цей вітамін не синтезується в організмі людини і необхідно постійне стабільне надходження вітаміну із їжею або добавками, оскільки рибофлавін є ключовим елементом у клітинному метаболізмі, є коферментом у окислювально-відновлюваних реакціях, бере участь в утворюванні клітин крові та АТФ. Є важливою сполукою для ссавців, рослин і мікроорганізмів, оскільки він є попередником флавінмононуклеотиду (FMN) і флавінаденіндинуклеотиду (FAD), які необхідні як акцептори електронів для оксидоредуктаз. Вітамін В<sub>2</sub> регулює здоровий ріст шкіри та волосся, за що отримав назву «вітамін краси». Крім того, рибофлавін необхідний вагітним, для нормального розвитку плоду [15-18].

Згідно з Державним реєстром лікарських засобів [19], на ринку України вітамін В<sub>2</sub> представлений лікарськими засобами (драже, сиропи, р-ни для ін'єкцій)

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.40 КР ПЗ</b>				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.	Бушак Д. А.				<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУН- ТУВАННЯ</b>				
Консульт.				Літ.				Арк.	Акрушів
Керівник	Удимович В.М.							26	96
Н. Контр.				<b>Кафедра БТМ 26</b>					
Зав. каф.	Стабніков В.П.								

у вигляді комплексів вітамінів, зазвичай у комбінації із вітаміном А і С, а також вітамінами групи В, що беруть участь у суміжних із рибо-флавіном процесах в організмі. Концентрація рибофлавіну серед лікарських засобів коливається у межах від 0,8 мг до 8 мг. Найбільш поширеною лікарською формою і дозуванням вітаміну В<sub>2</sub> є тверда лікарська форма у вигляді драже, у дозі 1 мг. Варто зауважити, що пероральний спосіб доставки ЛЗ є найбільш простим і не потребує спеціальних навичок і обладнання. Крім того, виробництва ЛЗ у вигляді твердої лікарської форми, є більш простим, у порівнянні із організацією виробництва рідких стерильних ЛЗ, зокрема за рахунок організації та підтримки менш стерильних класів чистоти виробництва. Отже будемо виробляти ЛЗ у вигляді драже або таблеток.

Препарати на основі вітаміну В<sub>2</sub> застосовуються як профілактичний і лікувальний засіб при станах, що супроводжуються підвищеною потребою організму у вітамінах: підвищене фізичне та нервово-психічне навантаження, особливо у несприятливих умовах навколишнього середовища; період одужання після перенесених захворювань; для підвищення загальної резистентності організму до інфекційних захворювань. Щоб більш широко обрахувати потребу у вітаміні В<sub>2</sub>, умовно приймемо, що він необхідний всім жителям країни з метою профілактики дефіциту рибофлавіну, а не лише тим, кому він призначений для лікування [19].

Дорослим з метою профілактики призначати по 1 драже 2 рази на добу. Дітям віком від 3 до 10 років з метою профілактики призначати по 2 драже на добу, від 11 до 14 років – 3 драже на добу. Дітям віком до 3 років застосування лікарського засобу протипоказане. Тривалість застосування встановлює лікар індивідуально: вона може становити 1–2 місяці [19]. Тому обираємо середнє значення – 1,5 місяці.

Таблиця 3.1

**Вихідні дані для розрахунку потреби в вітаміні В<sub>2</sub> (1 драже містить 1 мг рибофлавіну) для курсу профілактики дефіциту**

Група пацієнтів	Доза препарату на добу, таблеток	Вміст рибофлавіну в дозі препарату на добу, мг	Тривалість прийому, діб	Кількість рибофлавіну на 1 людину, г	Кількість хворих на 2024 р, млн осіб	Загальна кількість рибофлавіну на всіх хворих, кг
1	2	3	4	5	6	7
Дорослі	2	1	45	0,9	31,824850	57284,73
Підлітки	1	1	45	0,45	1,872050	842,422
Діти 3-10 років	2	2	45	0,9	1,872050	1684,845
Діти 11-14 років	3	3	45	1,35	1,872050	2527,267
<b>Разом</b>						62399,264

Станом на 2024 рік в Україні офіційно зареєстровано 37,441 млн жителів. На доросле населення припадає 85 % – 31 824 850 млн жителів, а молодь складає приблизно 15 % від всієї популяції – 5,616 150 млн. Припустимо, що діти 3-10, 11-14 років і підлітки умовно представлені у рівних пропорціях по 5% кожні. Отже, згідно з даними в таблиці 1.1, потреба в рибофлавіні для профілактики дефіциту становить 62339,264 кг.

### 3.2. Обрахунок загальної потужності виробництва рибофлавіну

Згідно з Державним реєстром лікарських засобів [18], в Україні зареєстровано 28 ЛЗ із рибофлавіном у складі, серед них 9 ЛЗ закордонних виробників і 19 ЛЗ вітчизняних виробників. Більшість ЛЗ із рибофлавіном є вітчизняного виробництва.

Враховуючи, цей факт, пропонуємо виробляти рибофлавін для задоволення 2,7 % від загальної потреби, оскільки існує досить висока конкуренція:

$$62339,264 \text{ кг} \times 0,027 = 1683 \text{ кг}$$

Розрахувавши потребу у рибофлавіні на рік, слід визначити, скільки культуральної рідини можна отримати під час культивування *B. subtilis* RH44, який синтезує 16,36 г/л рибофлавіну протягом 48 год [1]. Отже, об'єм культуральної рідини становитиме:

$$\frac{1683000}{16,37} = 102\,873 \text{ л}$$

Далі розраховуємо загальні втрати під час етапів виділення рибофлавіну із культуральної рідини які складають 10 %:

$$102873 \text{ л} / (1 - 0,1) = 114\,303 \text{ л}$$

### **3.3. Розрахунок загальної кількості циклів проектованого виробництва рибофлавіну та об'єму виробничого ферментера**

Далі розрахуємо, який об'єм культуральної рідини можна отримати за цикл біосинтезу. Згідно із цими даними розрахуємо кількість необхідних етапів підготовки посівного матеріалу. Прийmemo, що кількість робочих трудоднів ( $T_{рд}$ ) = 100, тоді кількість культуральної рідини на добу ( $V_d$ ) становитиме:

$$V_d = C / T_{рд} = 114\,303 / 328 = 348 \text{ л}$$

Об'єм культуральної рідини за цикл ( $V_{щ}$ ) буде становити:

$$V_{щ} = \frac{K_1 * V_d * T_{цф}}{24} = \frac{1,1 * 348 * 56}{24} = 894 \text{ л/цикл}$$

де  $T_{цф}$  – загальний цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (48 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год).  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій  $K_1 = 1,1 - 1,5$ .

Розрахований об'єм культуральної рідини (894 л) можна одержати у ферментері, геометричний об'єм якого складатиме:

$$V_{Г} = \frac{V_{щ}}{K_{зап}} = \frac{894}{0,6} = 1490 \text{ л}$$

Найближчим за об'ємом є стандартний ферментер на  $1,5 \text{ м}^3$  ( $V_{ф}$ ).

### 3.4. Розрахунок кількості необхідних етапів для підготовки посівного матеріалу

Отже, за виробничий цикл можна одержати  $V_{\text{пц}} = 894$  л культуральної рідини. Також слід врахувати, що при одержанні культуральної рідини, можливими є її втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ( $E_{\text{ф}}$ ), які складають 10%.

Отже, розрахуємо кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед процесом ферментації:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{роб1}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 894 / (1 - 0,1) = 993 \text{ л}$$

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом

$$V_{\text{роб.1}} = 993 \text{ л.}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{\text{зап}} = 0,6-0,65$  розраховують можливий геометричний об'єм ферментера ( $V_{\text{ф}}$ ), що становить

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{зап}} = 993 / 0,6 = 1655 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{сф}} = 1600$  л, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{з1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 993 / 1600 = 0,62.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

Встановлена доза для посівного матеріалу складає від 5 до 10 % від об'єму поживного середовища. Приймаємо такий показник  $X_{\text{пм1}} = 10\%$ . Тому, із врахуванням дози посівного матеріалу  $X_{\text{пм1}}$  робочий об'єм ферментера  $V_{\text{роб1}}$  складе:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{пс1}} + V_{\text{пс1}} \cdot X_{\text{пм1}}$$

Звідси, об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс1}}$  буде:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 993 / (1 + 0,1) = 903 \text{ л,}$$

тоді об'єм посівного матеріалу  $V_{\text{пм1}}$  складе

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 993 - 903 = 90 \text{ л}$$

Враховуючи втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря в розмірі 10 – 15%, об'єм посівного матеріалу та поживного середовища у посівному апараті буде таким:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 90 / (1 - 0,1) = 100 \text{ л.}$$

Оскільки попередньо було обрано дозу посівного матеріалу у розмірі 10%, то у посівному апараті об'єм поживного середовища становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 100 / (1 + 0,1) = 91 \text{ л,}$$

де  $X_{\text{па}} = 0,1$  – встановлена доза інокуляту для посівного апарату.

Далі слід розрахувати об'єм посівного матеріалу для посівного апарату, який становить  $V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 100 - 91 = 9 \text{ л.}$

Інокулят об'ємом  $V_{\text{роб.2}} = 100 \text{ л}$  можна отримати протягом вирощування штаму у посівному апараті з геометричним об'ємом  $V_{\text{ін2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 100 / 0,6 = 167 \text{ л.}$  Для цього обираємо найближчий за розміром стандартний посівний апарат  $V_{\text{сна}} = 0,16 \text{ м}^3$ . Перерахований коефіцієнт заповнення складатиме:

$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сін}} = 100 / 160 = 0,62$ . Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів (0,55-0,65).

Посівний матеріал об'ємом 9 л можна отримати шляхом вирощування в інокуляторі із врахуванням подальших втрат у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10 – 15%).

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 9 / (1 - 0,1) = 10 \text{ л.}$$

Додавання посівного матеріалу у кількості 10% від об'єму поживного середовища є стандартною практикою для забезпечення належного засіву. Тоді об'єм поживного середовища, для вирощування бактерій в інокуляторі буде складати:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 10 / (1 + 0,1) = 9 \text{ л,}$$

де  $X_{\text{ін}} = 0,1$  – встановлена доза інокуляту для посівного апарату.

Об'єм посівного матеріалу для інокулятора становить  $V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 10 - 9 = 1 \text{ л.}$

Відповідну кількість посівного матеріалу  $V_{\text{роб.3}} = 10 \text{ л}$  можна отримати під час культивування бактеріального штаму в інокуляторі з геометричним об'ємом  $V_{\text{ін3}} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап}} = 10 / 0,6 = 17 \text{ л.}$  Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{\text{сін}} = 20 \text{ л}$  та уточнюємо попередньо встановлений коефіцієнт заповнення.

$K_{\text{зап3}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сін}} = 10 / 20 = 0,5$ . Одержане значення перебуває у межах, прийнятих для ферментерів.

Посівний матеріал об'ємом  $V_{\text{пм4}} = 1$  л можна одержати культивуванням штаму у колбах на качалці. Для цього застосовують качалочні колби об'ємом  $V_{\text{колб}} = 750$  мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{\text{зк}} = 0,2$ .

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм3}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 1000 / (750 \cdot 0,2) = 6, \text{ отже, } 7 \text{ колб.}$$

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідно 7 качалочних колби.

Можна зробити висновок, що процес одержання посівного матеріалу для проведення виробничого біосинтезу рибофлавіну у ферментері об'ємом  $1,6 \text{ м}^3$  за коефіцієнту заповнення 0,6 буде проходити у 3 етапи. Узагальнена інформація щодо кількості стадій виробництва рибофлавіну наведена у табл. 1.2.

Таблиця 3.2

**Кількість стадій та апаратів, необхідна підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу рибофлавіну**

№ стадії	Геометричний об'єм обраного апарату, $V_{\text{г}}$ , л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$ , частка	Робочий об'єм апарата, $V_{\text{роб}}$ , л	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$ , л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$ , л
1	2	3	4	5	6
1	1600	0,6	993	903	90
2	160	0,6	100	91	9
3	20	0,5	10	9	1
5	0,75×7 колб	0,2	–	1	-

Отже, за результатами наведених розрахунків, можна зробити висновок, що для біосинтезу рибофлавіну *B. subtilis* RH44 потрібно встановити один ферментер об'ємом  $1,6 \text{ м}^3$ , один посівний апарат об'ємом  $0,16 \text{ м}^3$  та один інокулятор об'ємом 20 л.

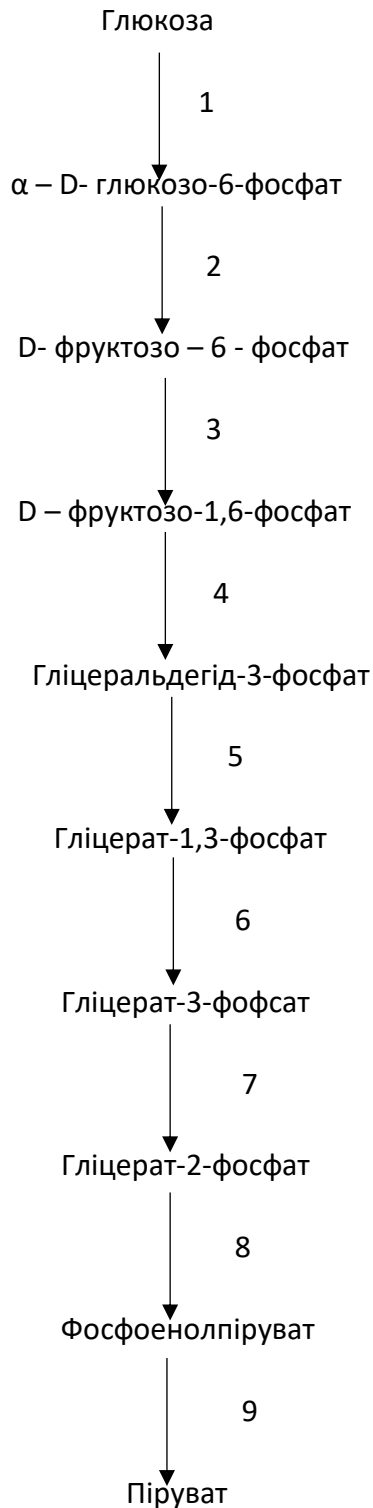
## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

*Bacillus subtilis* RH44 як джерело вуглецю може використовувати глюкозу. За умов росту на даному субстраті у мікроорганізмі функціонує гліколіз. Так як схеми метаболізму глюкози *Bacillus subtilis* RH44 не наведено на Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, беремо схему для *Bacillus subtilis* XF-1.

Тому катаболізм ростового субстрату буде розпочинатись з гліколізу (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), що представлений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes для *Bacillus subtilis* [20].

Насамперед глюкоза за участю гексокінази (КФ:2.7.1.1) трансформується на глюкозу-6-фосфат, де остання за дії глюкозо-6-фосфатізомерази (КФ:5.3.1.9) перетворюється на  $\beta$ -D-фруктозу 6-фосфат. Фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11) перетворює  $\beta$ -D-фруктози 6-фосфат у  $\beta$ -D-фруктозу 1,6-фосфат. Фруктозодифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13) ферментативно діє на  $\beta$ -D-фруктозу 1,6-фосфат щоб відбулось перетворення її на гліцеральдегід 3-фосфат та діоксіацетонфосфат, що під дією тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід 3-фосфат. Гліцеральдегід 3-фосфат, під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) перетворюється на гліцерат 1,3-фосфат, який у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у гліцерат 3-фосфат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на гліцерат 3-фосфат індукує його перетворення на гліцерат 2-фосфат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) гліцерат 2-фосфат переходить у фосфоенолпіруват. Остання стадія є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.40 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бушак Д. А.			<b>РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							33	96
Керівник		Удимович В.М.				<b>Кафедра БТМ</b> 33		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						



*Рис 4.1.* Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Меейргофа-Парнаса

**Ферменти:** 1 – глюкокіназа (КФ 2.7.1.2), 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9), 3 – 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11), 4 – фруктозо-біфосфатнаальдолаза (КФ 4.1.2.13), 5 – гліцераальдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12), 6 – 3-фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3), 7 – фосфогліцератмутаза 1(КФ 5.4.2.11), 8 – енолаза (КФ 4.2.1.11), 9 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

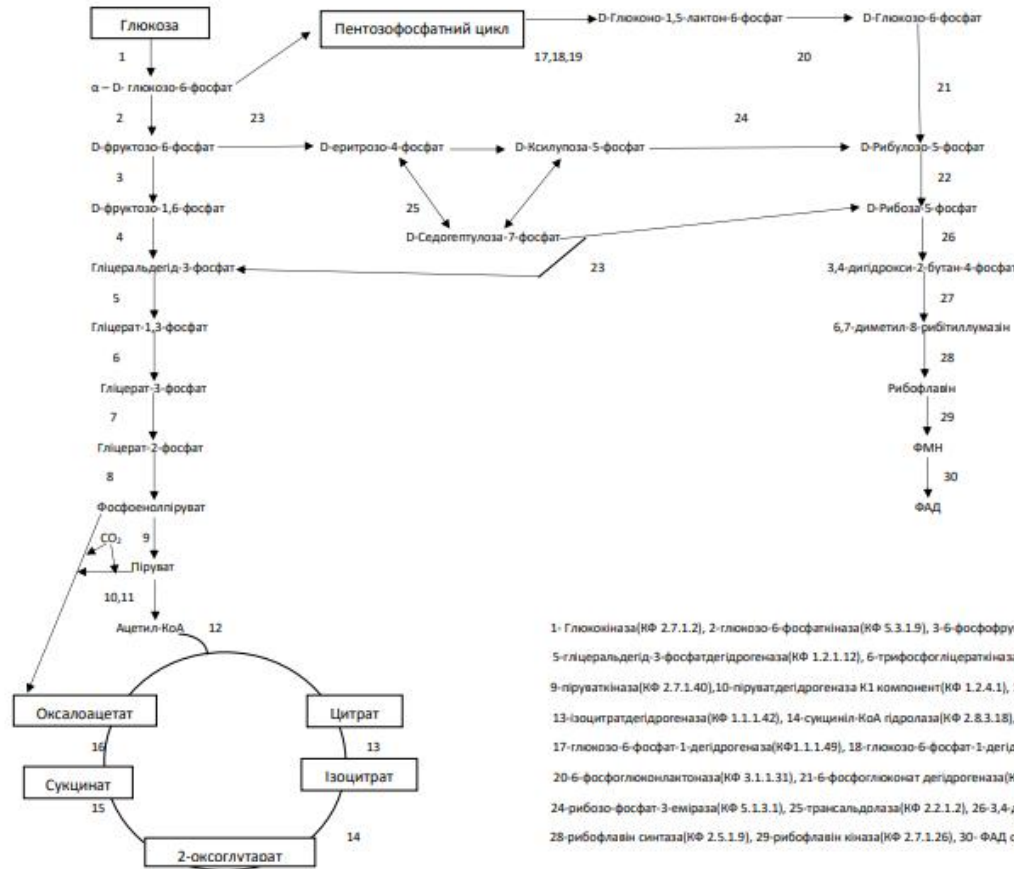
### **Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт**

Під час росту *Bacillus subtilis* на глюкозі в результаті її катаболізму утворюється ацетил-КоА. Далі ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Рибофлавін являє собою сполуку 7,8-диметил-10-(1'-d-рибітил)ізоалоксазин, яка складається із заміщеного ізоалоксазинового ядра з d-рибітильним бічним ланцюгом і відновлюваних атомів азоту в ядрі. А в організмі безпосередньо вітамін рибофлавін (В2) проявляє свою дію у формі двох коферментів, флавін-мононуклеотиду (FMN) і флавінаденіндинуклеотиду (FAD), які відіграють важливу роль у метаболізмі.

Попередниками вітаміну є еритрозо-4-фосфат та ксилозо-5-фосфат, що утворюються під дією транскетолази (КФ 2.2.1.1). Попередники, які конденсуються в подальшому залучаються седогептулозою-7-фосфат, що утворюється під дією ферменту трансальдолази (КФ 2.2.1.2), в результаті чого утворюється проміжна сполука D-рибулозо-5-фосфат, що утворилась під дією ферменту 6-фосфоглюконат дегідрогенази (КФ 1.1.1.44). Остання перетворюється на D-рибоза-5-фосфат під дією 3,4-дегідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтаза(КФ 4.199.12). За цим 6,7-диметил-8-рибітиллумазін перетворюється безпосередньо на рибофлавін під дією ферменту рибофлавіну синтази (КФ 2.5.1.9). Наведений вітамін може взаємодіяти з високоенергетичними фосфатами, переважно з АТФ, з утворенням рибофлавін-5'-фосфату (ФМН) під дією рибофлавін кінази (КФ 2.7.1.26). При взаємодії ФМН з АТФ утворюється флавінаденіндинуклеотид (ФАД) під дією ферменту ФАД синтази (КФ 2.7.7.2).

Рис 4.2 Схема синтезу рибофлавіну *Bacillus subtilis*, починаючи з реакцій катаболізму ростового субстрату - глюкози



- 1- глюкокіназа(КФ 2.7.1.2), 2-глюкозо-6-фосфаткіназа(КФ 5.3.1.9), 3-6-фосфофруктокіназа(КФ 2.7.1.11), 4-фруктозо-6-іофосфатнаальдолаза(КФ 4.1.2.13),  
 5-глицеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа(КФ 1.2.1.12), 6-трифосфоглицераткіназа(КФ 2.7.2.3), 7-фосфоглицератмутаза-1(КФ 5.4.2.11), 8-енолаза(КФ 4.2.1.11),  
 9-піруваткіназа(КФ 2.7.1.40),10-піруватдегідрогеназа K1 компонент(КФ 1.2.4.1), 11-піруватдегідрогеназа K2 компонент(КФ 2.3.1.12),12-цитрат синтаза(КФ 2.3.3.1)  
 13-ізоцитратдегідрогеназа(КФ 1.1.1.42), 14-сущиніл-КоА гідроліза(КФ 2.8.3.18), 15-фумарат гідратаза клас II(КФ 4.2.1.2), 16-мальтгідрогеназа(КФ 1.1.5.4),  
 17-глюкозо-6-фосфат-1-дегідрогеназа(КФ1.1.1.49), 18-глюкозо-6-фосфат-1-дегідрогеназа(КФ 1.1.1.363), 19-НАД<sup>+</sup> залежна глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа(КФ 1.1.1.388),  
 20-6-фосфоглюконілантаза(КФ 3.1.1.131), 21-6-фосфоглюконат дегідрогеназа(КФ 1.1.1.44), 22-рибозо-5-фосфат ізомераза(КФ 5.3.1.6), 23-транскетоліаза(КФ 2.2.1.1),  
 24-рибозо-фосфат-3-еміраза(КФ 5.1.3.1), 25-трансальдолаза(КФ 2.2.1.2), 26-3,4-дегідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтаза(КФ 4.199.12), 27-6,7-диметил-8-рибітілмуріцин синтаза(КФ 2.5.1.78),  
 28-рибофлавін синтаза(КФ 2.5.1.9), 29-рибофлавін кіназа(КФ 2.7.1.26), 30- ФАД синтаза(КФ 2.7.7.2).

## РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

#### 5.1.1 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

*Bacillus subtilis* - грампозитивна непатогенна бактерія паличкоподібної форми, що утворює термостійкі спори. Раніше вважалося, що клітини *B. subtilis* є облигатним аеробом, але останні дослідження спростували це і довели, що цей мікроорганізм є факультативним анаеробом [21].

Для росту *B. subtilis* оптимальна температура 28-30° і рН від 6,8-7,2 [21].

Оскільки продуцент – факультативний анаероб, то клітини можуть рости у присутності кисню, а також за його відсутності переключаючись на бродіння.

Проте оскільки синтез рибофлавіну відбувається лише у аеробних умовах, то для біосинтезу вітаміну В<sub>2</sub> у *B. subtilis* має бути наявний кисень, за рахунок оснащення ферментера барботером. Культивування в ферментері має відбуватися в асептичних умовах, щоб знизити ризик контамінація культури, що фатально вплине на синтез продукту та його концентрацію в культуральній рідині. Ферментер має бути оснащений перемішувальним пристроєм для покращення аерації та масообмінних процесів [22, 23]. Оптимальна швидкістю обертання мішалки для *B. subtilis* становить 150 об/хв. Таку швидкість перемішування можна забезпечити лопатевою мішалкою [22, 23].

Оскільки безперервний спосіб культивування має ряд недоліків, таких як вимивання не повністю спожитого поживного середовища і теоретично можливу втрату цільового продукту, то для біосинтезу вітаміну В<sub>2</sub> застосовують періодичний спосіб культивування.

Глибинний спосіб культивування є найбільш поширеним методом, що використовується для накопичення біомаси та біологічно активних речовин і дозволяє найбільш ефективно забезпечити оптимальні умови для росту і біосинтезу цільового продукту. При глибинному способі культуру вирощують на

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.40 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бушак Д. А.			<b>РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b>	Літ.	Арк.	Акрушіє
Консульт.							37	987
Керівник		Удимович В.М.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

рідкому середовищі за перемішування та штучній аерації. Це дає перевагу, оскільки зменшує площу і покращує автоматизацію виробництва. Поживне середовище в таких умовах використовується більш раціонально і значно скорочується кількість відходів у вигляді нерозчинного осаду. Культури мікроорганізми розвиваються у всьому об'ємі середовища, а не тільки на його поверхні, як при поверхневому культивуванні [23]. Глибинне культивування протікає у біореакторах різної конструкції, що виготовляють в основному із нержавіючої сталі. Нам потрібен ферментер з об'ємом 2500 л, з перемішувальним пристроєм для покращення аерації [23] і барботером. Мішалка забезпечує високу інтенсивність перемішування для насичення киснем поживного середовища і забезпечує гомогенність фаз, що взаємодіють [23].

Наприклад можна використати ферментер Laboratory bioreactor SB2500-Z (рис. 3.2).



*Рис. 5.2 Laboratory bioreactor SB2500-Z [23].*

Біореактор має робочий об'єм від 500 до 2500 л. Для встановлення за потреби додаткових датчиків тиску, температури, рН, рівню кисню і відбору проб передбачено порти [24].

## 5.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Так як *Bacillus subtilis* факультативний анаероб, що може рости у присутності кисню, переключаючись на бродіння у випадку відсутності кисню, проте рибофлавін синтезує лише за наявності кисню. Таким чином, під час культивування продуценту для біосинтезу рибофлавіну має бути достатня кількість кисню, що безперервно подається через барботер [25, 26].

УФ опромінення є одним із найефективніших способів знезараження повітря, зокрема у мікробіологічних боксах. Для промислових масштабів найбільш економічно виправданим є очищення повітря за допомогою фільтрування через волокнисті і пористі матеріали, що дозволяє одержати повітря зі ступенем чистоти 99,9999 %. Пил і частки відфільтровуються через волокнистий матеріал під дією інерційного і дифузійного механізму осадження. Механізм інерційного осадження заснований на руху часток за інерцією у повітряному потоці, під час якого потік обтікає нитки волокна, відхиляючись від потоку повітря і застрягає на волокні. Дифузійне осадження засноване на броунівському русі, під час якого частки, що рухаються хаотично можуть затримуватись на поверхні волокон [25, 26].

Для ефективної підготовки очищеного повітря, застосовують фільтрувальний матеріал різної структури, бо як видно із інформації вище, процеси осадження мають різні фізичні механізми. Очищення за допомогою фільтрів складається із кількох етапів: 1) очищення на головних фільтрах – де фільтрувальним матеріалом є грубі волокна із ступенем видалення близько 98 % мікроорганізмів-контамінантів; 2) фільтрація крізь індивідуальні фільтри, де фільтрувальним матеріалом є надтонкі волокна або мембрани, що видаляють решту 2 % контамінантів. Фільтрувальні волокна мають володіти високою пилоємністю і здатністю довго функціонувати при невеликих перепадах тиску до і після фільтрів.

Для грубої очистки на головних фільтрах використовують грубе базальтоне волокно, нетканий фільтрувальний матеріал (тканину Камінської). Така тканина під час виробництва просичена гексахлорофеном [25, 26].

Для тонкого очищення повітря в фільтрах індивідуального напрямлення застосовують фільтри Петрянова, тканина в яких утворена з ультратонких полімерних волокон, що складається із тканини на марлевій підкладці. Також використовують базальтоне надволокно, що є сировиною для базальтового паперу і картону. Крім того, для тонкої очистки застосовують тверді пористі перемички з пластмас і металокераміки. Такі матеріали є стійкими до перепадів температур, просто конструктивно виготовленими і легко обслуговуваними, проте створюють великі перепади тиску. На сьогоднішній день широко застосовуються фільтри виготовлені із фторопласту і металокераміки у вигляді втулок ФЕП – елемента патронного типу.

Фільтри НЕРА це фільтри виготовлені із волокнистого матеріалу, що складений упакований у вигляді гармошки. Розмір волокон 0,65-6,5 мкм x 10-40 мкм, що утворені із паперу і скловолокна або фторопласту (Poly Tetra Fluor до 0,3 мкм, фторопластові — 0,04—0,06 мкм). Фторопластові фільтри миються і їх мити не має потреби. Рекомендовано для стерилізації повітря також мембрани фірми «Мілліпор» (США) з діаметром пор 0,45 мкм, що видаляють мікроорганізми за допомогою ефекта «сита». [25, 26].

**Технологічна схема стиснення й очищення повітря.** Система об'єднана з трьох послідовно з'єднаних підсистем: очищення від пилу і стиснення; утворення аерозолу із заданою температурою і вологістю; відділення аерозолу у фільтрах грубого і тонкого очищення [25, 26].

За допомогою турбокомпресора через забірну шахту на висоті 20-30 м, де концентрація мікроорганізмів стабільно на одному рівні, відбирають об'єми атмосферного повітря.

Далі повітря поступає на фільтри попередньої очистки, де видаляється грубі часочки пилу. Це потрібно для захисту компресорів від забруднення і зниження кількості контамінантів. Після видалення грубих частосок повітря стискають у турбокомпресорі до 0,35-0,5 Мпа, що приводить до підвищення температури повітря до 120-250 °С і збільшення вмісту вологи на одиницю об'єму [25, 26].

Під час охолодження атмосферного повітря відбувається конденсація вологи. Оскільки осідання вологи зокрема на фільтрах призводить до злипання волокон фільтрувального матеріалу і розмноження мікроорганізмів, то цього допустити не можна і для цього встановлюють краплевловлювачі, що допомагають видалити зайву вологу шляхом «переохолодження» повітря до 25-40 °С в теплообмінному апараті. Потім повітря нагрівають до 70-90 °С, щоб забезпечити нормальну фільтрацію теплого повітря на фільтрах другого і третього рівнів. Додатково підмішують повітря в залежності від значення відносної вологості, яке має бути не більше 40% [25, 26].

На фільтрах другого і третього рівнів очищення відбувається наступна фільтрація. На фільтрі другого рівня фільтрують повітря для усього виробничого обладнання цеху. Після цього колектором відфільтроване повітря подається на індивідуальні для кожного інокулятора і ферментеру фільтри третього рівня. Ці фільтри потребують періодичної стерилізації [25, 26]. Для цього використовують вологу пару, що витримують при температурі 125- 130 °С. Після обробки фільтрувальний матеріал сушать за допомогою гарячого повітря. За кордоном надійність систем очищення повітря підвищена за рахунок передбачення додаткового ступеня очищення і дублювання основного устаткування. Іноді для крупногабаритних ферментерів застосовують автономні системи очищення повітря, що дає змогу стабілізувати підтримання термодинамічного режиму, бо такі системи не потребують трубопроводів значної довжини [25, 26].

Оскільки під час виробництва використовуються значні об'єми повітря, то і кількість відпрацьованого повітря теж буде значна. Відпрацьоване повітря є

джерелом органічних речовин: жирних кислот, кетонів амінів, альдегідів, спиртів, ефірів та води. Крім того, повітря насичене мікроскопічними краплями культуральної рідини, де вміст клітин продуцента становить від  $1 \cdot 10^3$  до  $1 \cdot 10^5$  КУО у  $1 \text{ м}^3$ . Для очищення відпрацьованого повітря використовують кілька методів, зокрема метод каталітичного допалювання, що є енергетичноємним і полягає у прокачуванні через комбінований каталізатор (піролізит і паладієвий каталізатор) порцій відпрацьованого повітря при температурі  $320\text{-}350 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ступінь знешкодження повітря складає до  $98,5 \%$ . Іншим методом є використання рідкофазного окиснення під дією окисників гіпохлориду натрію або перманганату калію із ефективністю очищення  $90\text{-}95\%$ . Відпрацьоване повітря подають на скруббер, де воно оброблюється сумішшю розчинів  $20\%$  їдкого натру, гіпохлориду натрію, водою та викидається в атмосферу. [25, 26].

Установки такого типу очищення використовують в Італії на виробництві антибіотиків. Проте цей метод має суттєвий недолік, а саме накопичення невеликої кількості стічних вод, що потребують утилізації.

Використовують також метод на основі сітчастих фільтрів, що складаються із циліндричного корпусу з кришкою і днищем, усередині якого розташовано фільтрувальний елемент, виготовлений із металевих сіток трикотажного плетіння з дроту діаметром  $0,28 \text{ мм}$  із нержавіючої сталі. Під час проходження повітря, краплі культуральної рідини затримуються на фільтрувальному елементі. На деяких підприємствах функціонують установки, що складається з циклону і сітчастого фільтра «Ц-ФС». Ефективність цієї схеми становить  $99,97 \%$  [25, 26].

### **5.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

#### **5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів**

Біотехнологічне виробництво рибофлавіну є не дуже простим процесом, як із точки зору технології, так і забезпечення правильності і чистоти ведення виробництва. Контроль встановленого рівня загальної і мікробіологічної чистоти є одним із основних критичних параметрів, що впливає на якість готового

продукту. Для забезпечення функціонування рутинного процесу отримання рибофлавіну підприємство має організувати роботу персоналу таким чином, щоб виключити і мінізувати будь-які ризики пов'язані із мікробним забрудненням і перехресною контамінацією. Для цього персонал має бути відповідно навчений та безухильно дотримуватися експериментально перевірених протоколів по самогігієні, очищенню і дезінфекції обладнання, систем і матеріалів, що можуть нести ризики для готової продукції.

Варто зауважити, що мийний засіб це будь-яка речовина або препарат, що містять мило та інші поверхнево-активні речовини, призначені для прання або очищення. Дезінфекція – це заходи, що допомагають знищувати збудників інфекційних захворювань і руйнувати токсини. Даний процес зменшує загальну кількість мікроорганізмів до конкретного встановленого нормами рівня, але не призводить до повного їх знищення.

Оскільки під час біотехнологічного процесу поверхні і обладнання контактує із речовинами різної хімічної природи, іноді залишки таких субстанцій важко видалити. Тому до мийні і дезінфікуючі засоби мають володіти наступними властивостями:

- проста у використанні і легкість розчинення у воді;
- толерантність до оброблюваних поверхонь;
- безпека для продукту, відсутність впливу на його органолептичні властивості;
- безпека для здоров'я людини;
- висока ефективність проти широкого спектру мікроорганізмів.

Нижче наведено перелік де-яких миючих і дезінфікуючих засобів, що можна використати під час виробництва рибофлавіну:

**Засіб бактерицидний Бактероцид** - це засіб для гігієнічної обробки рук, що володіє антибактеріальними, фунгіцидними і спороцидними властивостями. Призначений для самогігієни персоналу при роботі у виробничих

приміщеннях харчової, біотехнологічної, фармацевтичної галузей. Він ефективно видаляє з поверхні шкіри шкідливі мікроорганізми, залишки жиру та інших елементів. Ефективний проти вірусів, бактерій, грибів [27].

**Миючий засіб PANPRO 212** – лужний концентрат із зниженим піноутворенням. Склад: ПАР, натрію гідроксид, силікат натрію. Призначений для СІР-мийки, тубопроводів, технологічного обладнання. Має антибактеріальну дію протягом 48 год. Легко видаляє органічні, білкові та жирові забруднення. рН – 11,5-12,0. Концентрація – 0,5-3,0%. ПАР легко біологічно розкладається. Антимікробна ефективність до *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*. Термін зберігання – 2 роки [28].

**Засіб для миття і дезінфекції виробничих приміщень і обладнання DEZ-343** – Лужний пінний дезінфікуючий засіб на основі активного хлору. Діюча речовина: гіпохлорит натрію. Для миття та дезінфекції виробничих приміщень і обладнання. При нанесенні за допомогою пеногенератора утворює піну з відмінними утримуючими властивостями, підвищуючи тим самим якість дезінфекції. Робоча концентрація: 1,0-3,0%. Оптимальна робоча температура: 30-50 °С [29].

**Дезінфекційний засіб КОРЗОЛЕКС ® ЕКСТРА (KORSOLEX ® EXTRA)** – рідкий концентрат, прозора рідина блакитного кольору. Склад: (етилендіоксид)диметанол, глютаровий альдегід, бензалконій хлорид, дидецилдиметиламоній хлорид, детергенти, розчинники, інгібітори корозії, регулятори піноутворення, барвник, ароматизатор, вода. Призначений для дезінфекції. Робоча концентрація: 2,0-3,0%. Володіє наступними властивостями:

- не викликає корозії об'єктів, виготовлених з нержавіючої сталі, алюмінію, міді, латуні, не пошкоджують керамічні поверхні, вироби з по-

ліаміду, поліетилену, поліпропілену, полістиролу, поліуретану, полівінілхлориду, акрил бутадієнстиролу, силікону, резини, латексу, акрилового скла, тефлону, плексигласу та інших полімерних матеріалів;

- Бактерицидні властивості по відношенню до *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecium*, *Proteus mirabilis*, збудників лістеріозу, сальмонельозу, штамів, резистентних до антибіотиків, включаючи MRSA/ЕНЕС та ін; туберкулоцидні властивості, у т. ч. по відношенню до *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium tuberculosis*; фунгіцидні властивості, у т.ч. по відношенню до *Candida albicans* та ін.; віруліцидні властивості, у т.ч. по відношенню до збудників вірусних гепатитів В та С, ВІЛ-інфекції, вакцинія-, рота-, поліома-, адено-, норовірусів, SARS-асоційованих корона вірусів та ін.
- не викликає алергічних реакцій;
- мало піниться;
- добре змішується з водою. Піддається біодеструкції [30].

### **5.3.2 Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва рибофлавіну**

Виробництво рибофлавіну здійснюється упродовж 332 днів і передбачає підготовку ферментеру об'ємом 1600 л, інокуляторів об'ємом 20 л, 160 л, реакторів-змішувачів для приготування і стерилізації композицій, качалки, боксу та обладнання для виділення (центрифуги та збірника культуральної рідини).

Виробництво рибофлавіну *B. subtilis* складається із таких чистих приміщень: лабораторні приміщення (зберігання робочих культур, мікобіологічні бокси, обладнання для контролю), приміщення із обладнанням для вирощування у колбах-качалках, ділянка вирощування інокуляту, ділянка промислового біосинтезу і ділянка виділення готового продукту. Обладнання будемо розташовувати на відстані 1,5 м одне від одного та від стін, для вільного доступу персоналу до всіх частин і вузлів апаратів і елементів приміщення, для

обслуговування, очистки і дезінфекції поверхонь. Розміри обладнання наведено у *табл. 5.1*.

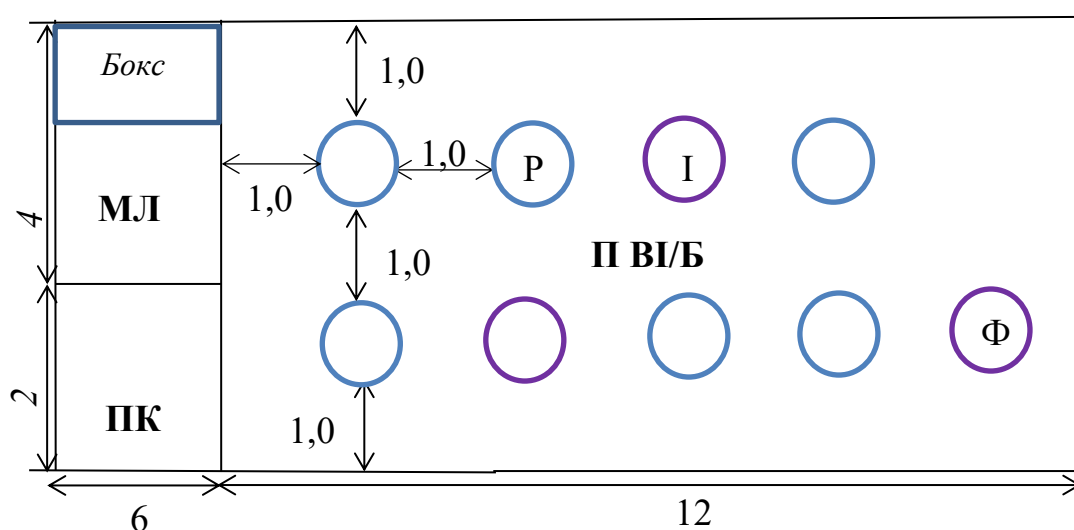
*Таблиця 5.1*

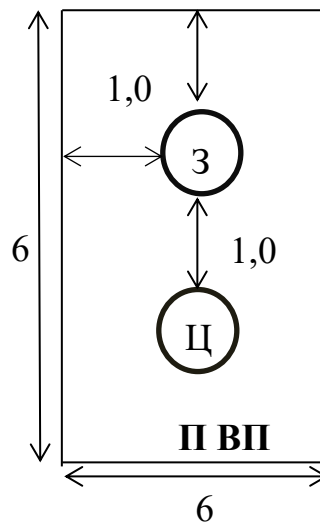
**Розміри обладнання, що використовується під час виробництва**

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Інокулятор	20	0,95	1,3
Інокулятор	160	1,0	1,9
Ферментер	1500	1,7	2,5
Реактор змішувач	10	0,25	0,6
Реактор змішувач	10	0,25	0,6
Реактор змішувач	15	0,35	0,7
Реактор змішувач	100	0,5	1,5
Реактор змішувач	500	1,3	2,2
Реактор змішувач	500	1,3	2,2
Центрифуга	1500	1,7	2,0
Збірник культуральної рідини	1500	1,7	2,5
<b>Всього</b>	<b>5835</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

Згідно із даними з *табл. 5.1* загальний об'єм виробничого обладнання складає 5835 л.

Далі необхідно розрахувати кількість мийних / дезінфікуючих засобів, що будуть використані під час обробки виробничих приміщень. План приміщення для отримання культуральної рідини *B. subtilis* наведено на *рис. 5.1*





*Рис. 5.1* Умовне схематичне зображення виробничих приміщень

**П ВІ/Б** – приміщення вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу;

**МЛ** – мікробіологічна лабораторія;

**ПК** – приміщення з качалками.

**П ВП** – приміщення виділення продукту

**І, Р, Ф, Ц, З** – інокулятор, реактор-змішувач, ферментер, центрифуга, збірник

Для підтримання чистоти виробничих приміщень підлога митиметься щодня, тобто 332 разів. Генеральне прибирання (обробка стін, вікон і підлоги) буде проводитися 2 рази на місяць – 24 рази. Далі розрахуємо кількості миючих засобів для обробки стін і підлоги. Згідно із *рис. 2.1*, враховуючи висоту приміщень 6 м, площа підлоги приміщення вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу складає  $48 \text{ м}^2$  ( $12 \text{ м} \times 6 \text{ м}$ ), площа стін –  $((12 \text{ м} \times 6 \text{ м}) \times 2 + (6 \text{ м} \times 6 \text{ м})) \times 2 = 216 \text{ м}^2$ , загальна площа –  $48 \text{ м}^2 + 216 \text{ м}^2 = 264 \text{ м}^2$ . Для мікробіологічної лабораторії площа підлоги складає  $6 \text{ м} \times 4 \text{ м} = 24 \text{ м}^2$ , площа стін –  $((4 \text{ м} \times 6 \text{ м}) \times 2 + (6 \text{ м} \times 6 \text{ м})) \times 2 = 84 \text{ м}^2$ , загальна площа –  $108 \text{ м}^2$ . Для приміщення з качалками площа підлоги складає  $2 \text{ м} \times 6 \text{ м} = 12 \text{ м}^2$ , площа стін –  $((2 \text{ м} \times 6 \text{ м}) \times 2 + (3 \text{ м} \times 6 \text{ м})) \times 2 = 60 \text{ м}^2$ , загальна площа –  $72 \text{ м}^2$ . Для приміщення для

виділення рибофлавіну площа підлоги складає  $6 \text{ м} \times 6 \text{ м} = 36 \text{ м}^2$ , площа стін –  $((6 \text{ м} \times 6 \text{ м}) \times 2 + (6 \text{ м} \times 6 \text{ м})) \times 2 = 144 \text{ м}^2$ , загальна площа –  $180 \text{ м}^2$ .

Загальна площа поверхні обробки миючими засобами наведена в *табл. 5.2*.

*Таблиця 5.2*

### Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м <sup>2</sup>	Площа стін, м <sup>2</sup>	Загальна площа, м <sup>2</sup>
Приміщення вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу	48	216	264
Мікробіологічна лабораторія	24	84	108
Приміщення з качалками	12	60	72
Приміщення виділення рибофлавіну	36	144	180
<b>Разом</b>	<b>120</b>	<b>504</b>	<b>624</b>

Далі розрахуємо періодичність миття обладнання. Оскільки загальний об'єм культуральної рідини становить  $115\,443 \text{ л}$ , а об'єм культуральної рідини за 1 цикл дорівнює  $894 \text{ л/цикл}$ , то кількість виробничих циклів (циклів миття) становить:  $115\,443 \text{ л} / 894 \text{ л/цикл} = 129$  циклів. Варто врахувати додаткове миття після останнього циклу і загальна кількість буде становити  $130$ . Тоді загальний об'єм миття:

$$5,8 \times 130 = 754,0 \text{ м}^3$$

*Таблиця 5.3*

### Розрахунок площ миття / дезінфекції під час виробничого процесу

Об'єкт	Площа / об'єм об'єкту, м <sup>2</sup> / м <sup>3</sup>	Періодичність миття / дезінфекції під час виробничого процесу	Загальна площа / об'єм, м <sup>2</sup> / м <sup>3</sup>
Обладнання	$5,8 \text{ м}^3$	130	$754 \text{ м}^3$
Підлога	$120 \text{ м}^2$	332	$39840 \text{ м}^2$
Стіни, двері, вікна	$504 \text{ м}^2$	24	$12096 \text{ м}^2$

Далі необхідно розрахувати об'єми робочих розчинів мийних та дезінфікуючих засобів. Згідно із рекомендацією по експлуатації мийних і дезінфікуючих засобів, в середньому витрата робочого розчину становить близько  $100$

мл на площу в 1 м<sup>2</sup>. Як видно із *табл 5.3*, для виробничого обладнання загальний об'єм складає 754 м<sup>3</sup>. Для миття реакторів та інокуляторів, миючі засоби подаються в середину крізь СІР-мийки, що дає змогу ефективно мити обладнання і мінімізувати витрати води та мийного засобу ( до 50 % від об'єму апарату). Таким чином, для одного циклу миття знадобиться: 5800 л × 0,5 = 2900 л робочого розчину миючого засобу, а на весь період виробничого процесу: 2900 л × 130 = 377 000 л. Виходячи із результатів представлених у *табл. 5.3* загальна площа всіх поверхонь складає 39840 м<sup>2</sup> + 12096 м<sup>2</sup> = 51 936 м<sup>2</sup>. В загальному витрата миючого / дезінфікуючого розчину складає: 51 936 м<sup>2</sup> × 100 мл = 5193,6 л.

*Табл. 5.4.* демонструє дані по орієнтовній вартості мийних та дезінфікуючих засобів та їх витрати під час виробництва рибофлавіну

## Витрати і вартість мийних та дезінфікуючих засобів під час виробництва рибофлавіну

Назва	Концентрація робочого розчину, %	Об'єкт миття / дезінфекції	Площа /об'єм миття / дезінфекції об'єкту, м <sup>2</sup> /л	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного/ дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Сумарна вартість миття /дезінфекції під час виробництва, грн
PANPRO 212 <sup>1</sup>	3,0 %	Обладнання	754,0	377 000	55,0	1,65	622 050
DEZ-343 <sup>2</sup>	3,0 %	Стіни/підлога/ вікна	51 936	5193,6	157,8	4,7	24 409
КОРЗО-ЛЕКС® ЕКСТРА <sup>3</sup>	3,0 %	Стіни/підлога/ вікна	51 936	5193,6	560	16,8	87 252,48

**Примітка.** Вартість засобів наведено станом на березень 2025 р.: 1. <https://panpro.com.ua/goods/luzhni-miyuchi-zasobi-dlya-harchovogo-obladnannya-panpro-212/>, 2 - <https://coagulant.com.ua/ru/catalog/dez-343/>, 3 - [https:// dezmed.com.ua/instruktsiia/item/instruktsiia-shchodo-zastosuvannya-zasobu-korzoleks-ekstra-korsolex-extra-z-metoiu-dezinfektsii-dosterylizatsiinoho-ochyshchennia-ta-sterylizatsii/](https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/instruktsiia-shchodo-zastosuvannya-zasobu-korzoleks-ekstra-korsolex-extra-z-metoiu-dezinfektsii-dosterylizatsiinoho-ochyshchennia-ta-sterylizatsii/)

\* **розрахунок вартості 1 л робочого розчину описано для мийного засобу «PANPRO 212»:** Ціна 1 л становить 55 грн, концентрація його робочого розчину – 3,0 %, тому в 1000 мл робочого розчину міститься 30 мл (0,03 л) концентрату. Таким чином вартість 3 % розчину становить: 55 грн × 0,03 л = 1,65 грн/л.

## 5.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

### 5.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

З метою одержання вітаміну  $B_2$  використовують поживне середовище, що містить наступні складові (г/л):

Глюкоза- 80,0;

Дріжджовий екстракт- 5,00;

$K_2HPO_4$ - 1,00;

$KH_2PO_4$ - 1,00;

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 1,00;

Технологічною особливістю отримання вітаміну  $B_2$  є склад поживного середовища, оскільки джерелом вуглецю є глюкоза у кількості 80,0 г/л. У випадку одночасної подачі такої кількості глюкози це призведе до довготривалої адаптації продуцента у зв'язку з «осмотичним шоком». Тому подача такої кількості вуглецю буде відбуватися у дві стадії, а саме композиція А (куди входить глюкоза і дріжджовий екстракт) буде ділитися наполовину: перша частина буде подаватися одразу на початку накопичення біомаси (та при проведенні виробничого біосинтезу), друга частина через 24 години.

Всі органічні компоненти поживного середовища (глюкоза та дріжджовий екстракт), можна стерилізувати разом при  $112^\circ C$  протягом 30 хвилин. Кількість глюкози, яка зазначена вище, не можна одразу подавати до поживного середовища, тому спочатку вносимо в середовище початкову кількість субстрату (45 г/л), через 20 годин подати решту (35 г/л).

Всі неорганічні компоненти поживного середовища ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) стерилізуємо окремо при  $131^\circ C$  40 хвилин. Стерилізацію солей варто проводити безпосередньо в посівних апаратах при забезпеченні підкислення середовища до рН 4-4,5 для попередження випадіння в осад нерозчинного фосфату магнію. Тому, забезпечують приготування 6%-го розчину

HCl, а для нейтралізації рН, забезпечують підготовку 6%-го розчину їдкого натру (NaOH).

Стерилізацію поживного середовища для отримання інокуляту в колбах на качалках здійснюють в автоклаві, оскільки об'єм середовища разом з інокулятом на цьому етапі становить 1,5 л.

Виробничий біосинтез рибофлавіну буде проходити у ферментері об'ємом 1,6 м<sup>3</sup>, коефіцієнт заповнення – 0,6. Підготовка посівного матеріалу буде проходити у три етапи (в колбах на качалці, інокуляторах 20 та 160 л).

### **5.5.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках**

З наведеного складу поживного середовища, розділимо компоненти поживного середовища на композиції за температурними режимами стерилізації.

**Композиція А:** глюкоза і дріжджовий екстракт (30 хв при температурі 112 °С, P=0,05 МПа).

**Композиція Б:** K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> і KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (60 хв при температурі 131 °С, P= 0,15 МПа).

**Композиція В:** MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (60 хв при температурі 131 °С, P= 0,15 МПа).

На технічних вагах зважують глюкозу, дріжджовий екстракт, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> і MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, додають воду питну, колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 30 хв при температурі 112 °С. Складові компоненти композиції А стерилізують за вищевказаних умов зважаючи на чутливість цих компонентів до дії високих температур. Композиції Б та В, представлені солями, стерилізують окремо в автоклаві для попередження випадіння в осад нерозчинного фосфату магнію.

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування в посівного матеріалу в колбах на качалках**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 0,91 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	80,00	72,8	А	0,182
Дріжджовий екстракт	5,00	4,55		
<b>Вода</b>		<b>0,182</b>		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0	0,91	Б	0,364
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	0,91		
<b>Вода</b>		<b>0,364</b>		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0	0,91	В	0,364
<b>Вода</b>		<b>0,364</b>		
<b>Разом:</b>		<b>0,910</b>		

**5.5.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в посівних апаратах 20 л та 160 л**

Стерилізація поживного середовища буде проходити у реакторах та інокуляторах з підкисленням, тому композиції Б та В об'єднуємо.

**Композиція А:** глюкоза і дріжджовий екстракт (30 хв при температурі 112 °С, P=0,05 МПа).

**Композиція Б:** K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> і MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1 год при температурі 131 °С, рН 4,-4,5).

За технічних ваг зважують глюкозу і дріжджовий екстракт, та подають у реактор, додають воду питну, вмикають перемішуючий пристрій, стерилізують протягом 30 хв за температури 112 °С. Складові компоненти композиції А стерилізують за вищевказаних умов. Композицію Б готують та стерилізують у інокуляторах, попередньо підкисливши 6%-го розчином НСІ для попередження випадіння в осад нерозчинного фосфату магнію.

Таблиця 5.6

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування в посівного матеріалу в інокуляторі 20 л**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 10 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	80,00	800	А	2,0
Дріжджовий екстаркт	5,00	50		
<b>Вода</b>		<b>1,8</b>		
<b>Конденсат</b>		<b>0,2</b>		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0	10	Б	7,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	10		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0	10		
<b>Вода</b>		<b>6,39</b>		
<b>Конденсат</b>		<b>0,71</b>		
<b>Разом:</b>		<b>9,1</b>		<b>9,1</b>

Таблиця 5.7

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування в посівного матеріалу в інокуляторі 160 л**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 100 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	80,00	8000	А	20,0
Дріжджовий екстаркт	5,00	500		
<b>Вода</b>		<b>18</b>		
<b>Конденсат</b>		<b>2,0</b>		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0	100	Б	71,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	100		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0	100		
<b>Вода</b>		<b>63,9</b>		
<b>Конденсат</b>		<b>7,1</b>		
<b>Разом:</b>		<b>91</b>		<b>91</b>

### 5.5.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері 1,6 м<sup>3</sup>

Стерилізація поживного середовища буде проходити у реакторі та ферментері з підкисленням.

**Композиція А:** глюкоза і дріжджовий екстракт (30 хв при температурі 112 °С, P=0,05 МПа). Композицію А стерилізуємо у збірнику на приблизно 500 літрів. Так як солей вага мала, розчиняємо їх у малому збірнику (після перекачуємо у ферментер, де буде проходити стерилізація), а залишок води композиції завантажуюмо безпосередньо у ферментер. Ми тим самим заощаджуємо кошти на великогабаритному устаткуванні.

**Композиція Б:**  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$  і  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (1 год при температурі 131 °С, рН 4,-4,5).

За допомогою об'ємно – вагового дозатору глюкозу і дріжджовий екстракт подають у реактор, додають воду питну, вмикають перемішуючий пристрій, стерилізують протягом 30 хв за температури 112 °С. Складові компоненти композиції А стерилізують за вищевказаних умов зважаючи на чутливість цих компонентів до дії високих температур. Композицію Б готують та стерилізують у ферментері, попередньо підкисливши 6%-го розчином HCl для попередження випадіння в осад нерозчинного фосфату магнію.

**Склад композицій для стерилізації компонентів для виробничого культивування у ферментері 1600 л**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Концентрація, г/л</b>	<b>Вміст компонента в 993 л середовища, г</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції, л</b>
Глюкоза	80,00	79440	<b>А</b>	198,6
Дріжджовий екстаркт	5,00	4965		
<b>Вода</b>		<b>178,74</b>		
<b>Конденсат</b>		<b>19,86</b>		
$K_2HPO_4$	1,0	993	<b>Б</b>	704,4
$KH_2PO_4$	1,0	993		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0	993		
<b>Вода</b>		<b>633,96</b>		
<b>Конденсат</b>		<b>70,44</b>		
<b>Разом:</b>		<b>903</b>		<b>903</b>

### **5.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника**

Під час виробництва різних речовин за допомогою мікроорганізмів (ферментації) часто утворюється піна. Це відбувається через те, що мікроорганізми виділяють спеціальні речовини, які зменшують поверхневий натяг рідини. Коли повітря проходить через таку рідину, утворюються бульбашки, які об'єднуються в піну. Піна шкідлива для процесу ферментації, адже може завдавати багато шкоди процесу виробництва. Піна зменшує об'єм ферментера, тому що займає багато місця, зменшуючи об'єм, в якому можуть рости мікроорганізми. Спричиняє втрати продукту, адже частина цінного продукту може бути втрачена разом з піною. Підвищує ризик забруднення, може виносити з ферментера мікроорганізми, що можуть забруднити обладнання та навколишнє середовище. А також ускладнює контроль процесу, спостереження за процесом ферментації та контроль за його параметрами [23].

Незважаючи на негативні наслідки, піна може мати і позитивні властивості. Покращує розчинення кисню, тому що велика поверхня піни сприяє кращому розчиненню кисню в рідині, що необхідний для життєдіяльності мікроорганізмів. А також зменшує енерговитрати, утворення піни може знизити енерговитрати на подачу повітря у ферментер [23].

Для боротьби з піною використовують різні методи. Фізичні методи- це механічне руйнування піни за допомогою спеціальних пристроїв. Фізико-хімічні методи- це введення в середовище речовин, які знижують стійкість піни. А також технологічні методи- це оптимізація умов процесу ферментації для зменшення піноутворення [23].

У нашому випадку малий відсоток дріжджового екстракту, тому не повинно бути багато піни. Отже, для виробничого біосинтезу рибофлавіну будемо використовувати механічний піногасник вбудований у виробниче обладнання.

Механічний метод піногасіння заснований на зменшенні розмірів пухирців піни або їхньому повному руйнуванні при механічному ударному впливі на піну. Для цього застосовують різні механічні обертові пристрої (ротор, турбіну, крильчатку, пакет тарілок тощо), які встановлюють на одному валу із перемішувальним пристроєм реактора або самостійно. Всі ці пристрої є складовою частиною конструкції ферментера. Всі механічні піногасильні пристрої вимагають додаткової, іноді значної витрати енергії, надійної герметизації із застосуванням у деяких випадках мастильно-охолоджувальної рідини. Ці недоліки відсутні в циклонних піногасниках. Використання відцентрового поля та лабіринтів різного типу значно полегшує і поліпшує процес обробки піни. Однак у більшості випадків, особливо за умови інтенсивного ведення біохімічного процесу, обмежити піноутворення тільки за допомогою цих піногасників виявляється неможливим без застосування механічних пристроїв [23].

В *табл. 5.9* об'єм титрувальних розчинів отримали шляхом розрахунку, тобто на 1 л поживного середовища використали 2 мл 6% розчину HCl. Так само і для 6% розчину NaOH [31].

## Об'єми титруючих розчинів

Об'єм середовища, л	HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
1,2	-	-	-	-
12	24	у колбі на 50 мл	24	у колбі на 50 мл
120	240	у колбі на 250 мл	240	у колбі на 250 мл
1200	2400	у колбі на 2 л	2400	у колбі на 2 л

Отже, для біосинтезу вітаміну B<sub>2</sub> необхідно провести такі додаткові стадії:

- приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при стерилізації композицій в інокуляторах об'ємом 20 та 160 л та ферментері 1,6м<sup>3</sup>;
- приготування 6% розчину NaOH для нейтралізації середовища при вирощуванні продуцента рибофлавіну в інокуляторах об'ємом 20 та 160 л та ферментері 1,6 м<sup>3</sup>;

Реалізація вищеописаних процесів буде проходити з використанням такого обладнання:

- для приготування 6% розчину HCl;
- для приготування 6% розчину NaOH;

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки посівного матеріалу, включає такі додаткові стадії:

- підготовка аераційного повітря та очистка відпрацьованого;
- приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при стерилізації композицій в інокуляторах об'ємом 20 та 160 л та ферментері 1,6 м<sup>3</sup>;
- приготування 6% розчину NaOH для нейтралізації середовища при вирощуванні продуцента рибофлавіну в інокуляторах об'ємом 20 та 160 л та ферментері 1,6 м<sup>3</sup>;

## РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Узагальнений перелік обладнання, використовуваного для біосинтезу рибофлавіну наведено у табл. 6.1. Відповідне обладнання представлено у графічній частині (апаратурна схема).

*Таблиця 6.1*

### Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник Виробник: Україна Тиск ударної хвилі: 10кгс/см <sup>2</sup> Діаметр отвору: 200 мм Маса: 12 кг [32]
ФГО – 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтруючий матеріал – поліестер, швидкість фільтрування: 3 м <sup>3</sup> /год, E = 80 % Виробник: Україна [33].
К – 3	Компресор	1	Тип компресора: масляний Продуктивність компресора: 1000 л/хв Потужність: 7.5 кВт Кількість оборотів: 900 об/хв Тип двигуна: електричний Об'єм ресивера компресора: 220 л Тиск компресора: 8 бар Напруга мережі живлення: 380 В Виробник: Україна [34].
ТО – 4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Максимальний робочий тиск: 155°C Первинний контур: 31 бар Вторинний контур: 31 бар Максимальна витрата через теплообмінник: 12 м <sup>3</sup> /год Вага нетто: 1.5+0.116xNP кг Мінімальна робоча температура: -196°C Максимальна робоча температура: 225°C Виробник: Швеція [35].

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.40 КР ПЗ</b>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Бушак Д. А.			Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.					59	96	
Керівник		Удимович В.М.			<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.					59		
Зав. каф.		Стабніков В.П.					

### РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

**Кафедра БТМ**

Продовження табл. 6.1

Р – 5	Ресивер	1	Ресивер. Ємність: 3000 л Вага: 1200 кг Максимальний робочий тиск: 30 бар Робоча температура: -20/50 °С Країна виробник: Україна Розміри: 1220 x 3250 мм [36].
ТН – 6	Теплообмінник-нагрівач	1	Продуктивність : 7500 м <sup>3</sup> /год Теплова потужність: 80 кВт Виробник: Україна [37].
Ф – 7	Фільтр тонкої очистки	1	Модель фільтра FMW. Матеріал: мікроскловолокно Ступінь очищення повітря: 99%. Продуктивність: 3400 м <sup>3</sup> /год Виробник: Україна [38].
РЗ-8 РЗ-10 РЗ-12	Реактор – змішувач	3	Реактор-змішувач. Об'єм: 10 л, габаритні розміри- 600x250x300 Реактор-змішувач об'ємом 500л, габаритні розміри 1150x1350x2250. Залежно від запланованих процесів, реактор може бути обладнаний сорочкою нагріву і/або охолодження, теплоізоляцією і комплектуватися різними пристроями: пропеллерними мішалками High Flow; пропеллерними мішалками INTERMIG для ламінарного перемішування і кристалізації матеріалів; якорна мешалка; гомогенізатор (дисольвер), донна пропелерна мішалка Виробник: Україна [39].
33-9	Збірник - змішувач	1	Збірник-змішувач об'ємом 15л, габаритні розміри Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304 або AISI 316, оснащена теплоізолюваною сорочкою нагріву, приводом обертання, вузлом ущільнення, валом з рамною мішалкою і щитом управління. Обладнаний датчиком-регулятором нагріву, частотним перетворювачем, кнопками запуску і зупинки перемішуючого присторою, кнопками запуску і зупинки, кнопкою аварійної зупинки і системою захисту управління двигуна. Виробник: Україна [40].

Продовження табл. 6.1

33-11 33-14	Збірник - змішувач	2	Збірник-змішувач. Об'єм: 100л, габаритні розміри 1580x505x500. Збірник- змішувач об'ємом 500 л Оснащені сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлені зі сталі AISI 304 . Виробник: Україна [41]
ОВД-13	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор марки ДВСВ-50. Найбільша границя дозування, кг: 1000-2000 Найменша границя дозування, кг: 10 Комерційна точність дозування (клас 0,2-0,5) Виробник: Україна[42].
ІН-15	Інокулятор	1	Інокулятор 20л Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304, 316L Температура: робоча до +50 (при стерилізації +122) Діапазон швидкості мішалки: 300 об/хв для клітинних культур, 1000 - 1500 об/хв Повне програмування : автоматичне піногасіння та регулювання рН, оснащений датчиком температури та кисню, пробовідбірником та автоматичною системою рН-метрії Габарити реактора: 945x680x1350 Маса:155 кг Виробник: Україна [43].
ІН-17	Інокулятор	1	Інокулятор 160л. Температура: до 70°C, 130°C для стерилізації (електронагрів або імпульсний пар) Стерилізація на місці, паром Діапазон швидкості мішалки: 300 грт для клітинних культур, 1000 - 1500 грт (в залежності від розміру судин) для бактерій. Оснащений датчиком температури та кисню, пробовідбірником та автоматичною системою рН-метрії 1900 x 1020 x 750 мм (максимально) Виробник: Україна [44].
Ф-16 Ф-18 Ф-20	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Стерилізуючі фільтри Матеріал: політетрафторетилен. Ступінь очищення повітря: 99,9999 %. Виробник: Україна [45].

Закінчення табл. 6.1

ФР-19	Ферментер	1	<p>Виробничий ферментер геометричний об'єм 1500л нержавіюча сталь AISI 304, 316L Температура: робоча до +50 (при стерилізації +122) Діапазон швидкості мішалки: 300 об/хв для клітинних культур, 1000 - 1500 об/хв Повне програмування : автоматичне піногасіння та регулювання рН . Оснащений датчиком температури, пробовідбірником та автоматичною системою рН-метрії Габарити реактора, мм: 1740x1530x2530 Виробник: Україна [46].</p>
НВ-21	Насос відцентровий	1	<p>Циркуляційний насос Grundfos Насос відцентровий герметичний , матеріал чугун. Продуктивність від 3,2 м<sup>3</sup>/год, Максимальний тиск – 10 бар. Виробник: Данія[47].</p>

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.

Технологічний процес біосинтезу вітаміну В<sub>2</sub> *Bacillus subtilis* складається із допоміжних та основних робіт. До стадій допоміжних робіт (ДР) належать: підготовка стерильного аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів HCl та NaOH, підготовка і стерилізація поживного середовища. До стадій основного технологічного процесу (ТП) відносять: приготування посівного матеріалу та промисловий біосинтез.

### *ДР 1. Підготовка аераційного повітря*

#### *ДР 1.1. Забір атмосферного повітря*

Відповідний процес здійснюється за допомогою повітрязабірника у найвищій точці – на висоті 10 м (висота поверху – 6 м, кількість поверхів – 1, косий дах будівлі (~1,5 м), + 2-3 метри). Саме у такій найвищій точці розташовують усе необхідне обладнання для підготовки повітря з метою використання у подальших процесах.

#### *ДР 1.2. Очистка повітря від грубих часток*

Повітря на початкових етапах очистки проводить через фільтр, що забезпечує ступінь очищення до 90%, затримуючи при цьому ймовірні частинки діаметром 50 мкм.

#### *ДР 1.3. Стиснення повітря*

На такому етапі попередньо очищене повітря далі надходить компресора, де стискається, щоб забезпечити аерацію та подолати гідравлічний тиск стовпа рідини у виробничому ферментері. Встановлені параметри відповідного процесу: тиск – 0,35 МПа, температура – до 250°C.

#### *ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи*

Стиснене повітря (від ДР 1.3), що пройшло етап компресування, направляється до теплообмінника-охолоджувача, де охолоджується до температури, що коливається у діапазоні 25-30°C. Через суттєвий перепад температур утво-

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.40 КР ПЗ</b>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Бушак Д. А.				Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						63	96
Керівник	Удимович В.М.				63		
Н. Контр.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Зав. каф.	Стабніков В.П.						

рюється волога, які необхідно видалити за використання ресивера, де проходить усунення пульсацій руху повітря. На даному етапі показник вологості вдається знизити до 60%.

#### *ДР 1.5. Нагрівання повітря*

Охолоджене повітря (від ДР 1.4) надходить до теплообмінника-нагрівача, де нагрівається до температури, оптимальної для вирощування продуцента (40-45°C). Показник вологості на відповідній стадії знижується до 50%.

#### *ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі*

Попередньо нагріте повітря (від ДР 1.5) направляється до головного фільтра очистки, який встановлюють біля ферментаційних відділень. На даному етапі ступінь очищення досягається 95%.

#### *ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

На кінцевому етапі повітря (від ДР 1.6) через трубопроводи подається безпосередньо в індивідуальні фільтри, встановлені над кожним із інокуляторів до ТП 4.5, ТП 4.6 та ферментеру до ТП 5.1. Ступінь кінцевої очистки повітря складає 99,999% та КУО  $\geq 0$ .

### ***ДР 2. Приготування титрувальних розчинів***

#### *ДР 2.1. Приготування 6%-го розчину HCl*

Розчин HCl готують змішуванням концентрованої HCl з водою. Розрахунок кількості 36 % HCl необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 6 %, об'ємом 9,21мл+91,19мл+902,76мл $\approx$ 1003мл(2006мл)):

$$0,36x = 0,06 \times 2006$$

$$0,36x = 120,36$$

$$x \approx 334 \text{ мл (36\% – і HCl)}$$

Розрахунок кількості дистильованої води необхідної для приготування 2006 мл

6 % HCl:

$$2006 - 334 = 1672 \text{ мл (H}_2\text{O)}$$

Приготування кислоти відбувається у скляному бутлі об'ємом 3000 мл.

За допомогою мірника відміряють 334 мл концентрованого 36% розчину HCl, та поміщають у скляний бутль об'ємом 3000 мл, і додають за допомогою мірника 1672 мл води, ретельно перемішують.

*ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH*

*ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 20л.*

Для корегування рН необхідно приготувати титрувальний розчин з розрахунку 2мл/л культуральної рідини.

$$m(\text{NaOH}) = \frac{18,42 \times 6}{100} \approx 1\text{г (потрібно для приготування 6 \% NaOH об'ємом 18,42мл)}$$

На технічних вагах зважують 1 г NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 50 мл, і додають 18 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

*ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 160 л.*

Для корегування рН необхідно приготувати титрувальний розчин з розрахунку 2мл/л культуральної рідини.

$$m(\text{NaOH}) = \frac{182,38 \times 6}{100} \approx 11\text{г (потрібно для приготування 6 \% NaOH об'ємом 182,38мл)}$$

На технічних вагах зважують 11 г NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 500 мл, і додають 18 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

*ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 1,6м<sup>3</sup>.*

Для корегування рН необхідно приготувати титрувальний розчин з розрахунку 2мл/л культуральної рідини.

$$m(\text{NaOH}) = \frac{1805,52 \times 6}{100} \approx 108 \text{ г (потрібно для приготування 6 \% NaOH)}$$

**об'ємом 1805,52мл)**

На технічних вагах зважують 108 г NaOH. Наважку поміщають у бутль об'ємом 4000 мл, і додають 1805 мл водопровідної води, перемішують. Закривають бутль ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв. До ферментеру подається через конектор.

### *ДР 3. Приготування і стерилізація поживних середовищ*

*ДР 3.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.*

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у *табл. 2.1.*

#### *ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 74 г глюкози та 5 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у колбу об'ємом 700 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 500 мл питну воду (320 мл), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

#### *ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На лабораторних терезах зважують 1 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  та 1 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Наважки поміщають у колбу об'ємом 700 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 500 мл питну воду (300 мл), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 1 год.

#### *ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних терезах зважують 1 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Наважку поміщають у колбу об'ємом 700 мл додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 500 мл питну воду (320 мл), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа), протягом 40 хв.

*ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 20 л*

Потрібно звернути увагу, що 10% припадає на посівний матеріал, а також 10% складе конденсат, який утвориться при стерилізації поживного середовища в інокуляторі.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л наведений у *табл. 2.2.*

*ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 810 г глюкози та 50 г дріжджового екстракту. Наважки переносять у реактор-змішувач на 10 л, додають через лічильник 4,6 л води питної, вмикають перемішувач. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40 °С. Отриманий розчин стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв. Після чого стерильну композицію самоплином подають до інокулятора.

*ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 10 г  $K_2HPO_4$ , 10 г  $KH_2PO_4$  та 10 г  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . Наважки поміщають у збірник-змішувач об'ємом 10 л, додають через лічильник 3,6 л води питної, вмикають перемішувач, подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 1.1) до досягнення рН 4,0-4,5. Після цього готовий розчин подають самоплином до інокулятора, де і буде проведена стерилізація, при 131 °С (0,15 МПа) протягом 1 год.

*ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 160 л*

Потрібно звернути увагу, що 10% припадає на посівний матеріал, а також 10% складе конденсат, який утвориться при стерилізації поживного середовища в інокуляторі.

*ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 8025 г глюкози та 502 г дріжджового екстракту. Наважки переносять у реактор-змішувач на 150 л, додають через лічильник 78 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40 С. Отриманий розчин стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв. Після чого стерильну композицію самоплином подають до інокулятора.

#### *ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 100 г  $K_2HPO_4$ , 100 г  $KH_2PO_4$  та 100 г  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . Наважки поміщають у збірник-змішувач об'ємом 10 л, додають через лічильник 3,6 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій, подають 6 %-ий розчин  $HCl$  (від ДР 1.1) до досягнення рН 4,0-4,5. Після цього готовий розчин подають самоплином до інокулятора, де і буде проведена стерилізація, при 131 °С (0,15 МПа) протягом 1 год.

#### *ДР 3.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 1,6 м<sup>3</sup>*

Слід пам'ятати, що 10% припадає на посівний матеріал, а також 10% складе конденсат, який утвориться при стерилізації поживного середовища в інокуляторі.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1,6 м<sup>3</sup> наведений у табл. 2.4.

#### *ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А*

Через об'ємно-ваговий дозатор зважують 79443 г глюкози та 4965 г дріжджового екстракту. Наважки переносять у реактор-змішувач на 500 л, додають через лічильник 270 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40 С. Отриманий розчин стерилізують при 112

°C (0,05 МПа) протягом 30 хв. Після чого стерильну композицію самоплином подають до виробничого ферментера.

#### *ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 993 г  $K_2HPO_4$ , 993 г  $KH_2PO_4$  та 993 г  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . Наважки поміщають у збірник-змішувач об'ємом 1000 л, додають через лічильник 542 л води питної, вмикають перемішувач, подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 1.1) до досягнення рН 4,0-4,5. Після цього готовий розчин подають самоплином до виробничого ферментера, де і буде проведена стерилізація, при 131 °C (0,15 МПа) протягом 1 год.

### **ТП 4. Підготовка посівного матеріалу**

#### *ТП 4.1. Підтримання колекційної культури*

Отриману колекційну культуру *Bacillus subtilis* зберігають у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі (трипто-казеїново соєвому агарі) за температури 2-4 °C на свіже поживне середовище [20]. Усі роботи із колекційною культурою проводять із дотриманням правил асептики.

#### *ТП 4.2. Одержання робочої культури*

Колекційну культуру *Bacillus subtilis* RH44 розсівають на чашки Петрі із Luria–Bertani (LB) агаром до одержання ізольованих колоній. Вирощують у термостаті при температурі 37 C (24 год).

#### *ТП 4.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах*

Отримані ізольовані колонії *B. Subtilis* RH44 із чашок Петрі (від ТП 4.2) пересівають петлею у пробірки зі скошеним трипто-казеїновим соєвим агаром (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). У пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування становить 24 години, температура 37 °C. Кожні 4 год із пробірок відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

#### *ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках*

В асептичних умовах колбу об'ємом 1 л з сумішшю стерильних композицій А, Б і В (від ДР 3.1.4) перемішують і розливають по 150 мл у 6 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Bacillus subtilis* RH44 (від ТП 4.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою відбирають отриману суспензію бактерій і вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з 1 пробірки.

Культивують на качалках (240 об/хв) при температурі 41 °С упродовж 60 год і здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 1 л.

#### *ТП 4.5. Вирощування в інокуляторі об'ємом 20 л*

У посівний апарат із композицією А (від ДР 3.2.1) додають композицію Б (від ДР 3.2.2), вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.1) рН середовища за показником датчика рН до 7,2. Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 3.4). Культивують при температурі 41 °С упродовж 24 год. Підтримання рО<sub>2</sub> на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування (150 об/хв).

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю. А також контролюють концентрацію біомаси. Рівень розчиненого кисню становить 20-30% рО<sub>2</sub>.

#### *ТП 4.6. Вирощування в інокуляторі об'ємом 160 л*

У посівний апарат із композицією А (від ДР 3.3.1), додають композицію Б (від ДР 3.3.2), вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.2) рН середовища за показником датчика рН до 7,2. Через трубу перетискування подають з інокулятора посівний матеріал (від ТП 4.5). Культивують при температурі 41 °С упродовж 24 год. Підтримання рО<sub>2</sub> на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування (150 об/хв).

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

### ***ТП 5. Виробничий біосинтез***

#### *ТП 5.1. Виробничий біосинтез (отримання культуральної рідини)*

У виробничий ферментер об'ємом 1,6 м<sup>3</sup>, подають стерильний розчин композиції А (від ДР 234.1) та композиції Б (від ДР 3.4.2). Вмикають перемішуючий пристрій. Через трубу перетискування подають з інокулятора посівний матеріал (від ТП 4.6) і доводять із реактора-змішувача 6%-им розчином NaOH самоплином (від ДР 2.2.3) рН середовища за показником датчика рН до 7,2. Культивують при температурі 41 °С упродовж 48 год. Підтримання рО<sub>2</sub> на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування (150 об/хв).

Загальний час культивування складає 48 год.

Кожні 4 год із ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації вітаміну В<sub>2</sub> (16,36 г/л). Концентрацію біомаси становить 25 г.

## РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ РИБО- ФЛАВІНУ

Виробництво субстанції рибофлавіну – це багатоступеневий процес, що потребує ретельного вибору та обґрунтування кожної стадії. Метою є отримання високоякісного кристалічного рибофлавіну для фармацевтичної промисловості.

### Основні стадії виділення та очищення рибофлавіну.

1. Підлужнення культуральної рідини. Цей початковий етап критично важливий для оптимізації розчинності цільового продукту – рибофлавіну. За природних умов рибофлавін має низьку розчинність у воді (менше 0,1 г/л). Підвищення рН середовища допомагає значно збільшити його розчинність, що полегшує подальше виділення з культуральної рідини. Культуральну рідину обробляють лужним реагентом, доводячи її рН до значення 10. Таке значення рН є оптимальним для максимальної розчинності рибофлавіну перед відділенням клітинної біомаси. Цей дозволяє перевести більшу частину цільового продукту в розчинену форму, запобігаючи його втратам разом із клітинним осадом [48].

2. Відділення біомаси. На цьому етапі відбувається відділення мікробних клітин *Bacillus subtilis* від культуральної рідини, яка тепер містить розчинений рибофлавін. Оскільки рибофлавін є екзометаболітом, тобто накопичується поза клітинами, ефективне відділення клітин є ключовим для подальшого очищення. Відділення біомаси проводимо методом сепарування. Цей метод є найефективнішим для відділення великих бактеріальних клітин, таких як *Bacillus subtilis*. Сепаратори забезпечують високу продуктивність (до 10 000 об/хв), значно перевершуючи центрифуги (3 000 об/хв) за ефективністю розділення для даного типу біомаси. Процес сепарування легко

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.40 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бушак Д. А.			<b>РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ РИБОФЛА- ВІНУ</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							72	96
Керівник		Удимович В.М.				<b>Кафедра БТМ<sup>72</sup></b>		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

автоматизується, агрегати компактні, а втрати активної речовини мінімальні.

3. Очищення фугату від домішок. Після відділення основної маси клітин, фугат (рідина після сепарування) все ще може містити дрібні уламки клітин, колоїдні частинки та розчинні високомолекулярні домішки. Цей етап призначений для їх видалення, забезпечуючи чистоту розчину перед концентруванням. На даному етапі використовуємо ультрафільтрацію. Цей мембранний процес дозволяє ефективно видаляти дрібні частинки твердої фази та високомолекулярні домішки. Ультрафільтрація використовує пористі мембрани з діаметром пор 0,01-0,1 мкм, що ідеально підходить для відділення мікроскопічних домішок, типових для бактеріальних культур. Важливою перевагою є відсутність термічного, механічного або хімічного впливу на продукт, що є критичним для чутливих до нагрівання вітамінів [48].

4. Концентрування розчину. Після очищення, концентрація рибофлавіну у розчині все ще відносно низька (приблизно 1,5% сухих речовин). Концентрування є необхідним етапом для зменшення об'єму рідини та підвищення концентрації цільового продукту, що робить подальші стадії (кристалізацію, сушіння) економічно доцільними та ефективними. На цьому етапі використовуємо установку зворотнього осмосу. Цей метод є найбільш оптимальним для концентрування розчинів з низькомолекулярними сполуками, такими як рибофлавін (молекулярна маса 376 г/моль). Мембрани зворотнього осмосу мають надзвичайно малі пори (менше 0,01 мкм), що дозволяє не тільки пропускати воду, але і затримувати молекули рибофлавіну. Перевагами є відсутність термічного впливу на продукт, простота апаратного оформлення (відсутність рухомих деталей), низька енергоємність та можливість забезпечення герметичності й асептики процесу, що є важливим для фармацевтичних продуктів.

5. Кристалізація та очищення кристалів. Кристалізація є ключовим етапом для виділення рибофлавіну у чистій кристалічній формі, що є кінцевою субстанцією для фармацевтичної промисловості. Цей процес дозволяє досягти

високої чистоти продукту. Концентрований розчин рибофлавіну (після зворотного осмосу) спочатку доводять хлоридною кислотою від рН 10.0 до оптимального значення рН 6.0. Це створює умови для кращого осадження рибофлавіну. Важливо запобігти перетворенню рибофлавіну у його відновлену форму – лейкофлавін. Для цього в реактор подають окиснювач. Серед варіантів (перекис водню, бромат калію, вісмутат натрію, озон) найбільш економічно вигідним і безпечним є використання очищеного повітря. Розчин поміщають у реактор-змішувач з сорочкою, куди подають льодяну воду (близько 2°C). Розчин охолоджують протягом приблизно 2 годин до температури 8-10°C. Охолодження знижує розчинність рибофлавіну, сприяючи його кристалізації. Після кристалізації утворюється суспензія, з якої необхідно відділити кристали. Для цього обрано барабанний вакуум-фільтр. Цей тип фільтра забезпечує повну механізацію всіх технологічних операцій, включаючи безперервне подавання суспензії, фільтрацію, зрізання та вивантаження осаду (кристалів) за допомогою спеціального ножа. Це робить процес більш зручним та ефективним порівняно з періодичними фільтрами [48].

6.Сушіння . Сушіння є фінальним етапом у виділенні рибофлавіну, спрямованим на видалення залишкової вологи з кристалів. Це критично важливо для стабільності продукту, його зберігання та відповідності фармацевтичним стандартам. Оскільки рибофлавін є термочутливим, необхідно використовувати методи сушіння, що не спричиняють його деградації. Для сушіння кристалів рибофлавіну обрано вакуумну сушильну шафу. Цей метод дозволяє сушити продукт при кімнатній або помірно підвищеній температурі в умовах вакууму. Знижений тиск знижує температуру кипіння води, що дозволяє ефективно видаляти вологу без значного термічного навантаження на рибофлавін. Це запобігає його окисленню та збереженню властивостей. Вакуумні сушильні шафи є відносно простим і недорогим обладнанням.

7. Пакування, маркування та фасування. Це завершальний етап виробництва, який полягає у підготовці сухого кристалічного рибофлавіну до зберігання, транспортування та подальшого використання у фармацевтичній промисловості. Сухі кристали рибофлавіну точно зважують і поміщають у відповідну, стерильну та герметичну упаковку, що забезпечує захист продукту від вологи, світла та забруднень. Кожна упаковка обов'язково маркується згідно з встановленими стандартами, вказуючи назву продукту, партію, дату виробництва, термін придатності, умови зберігання та іншу необхідну інформацію. Фасування здійснюється з дотриманням всіх санітарних норм та вимог якості для фармацевтичної продукції [48].

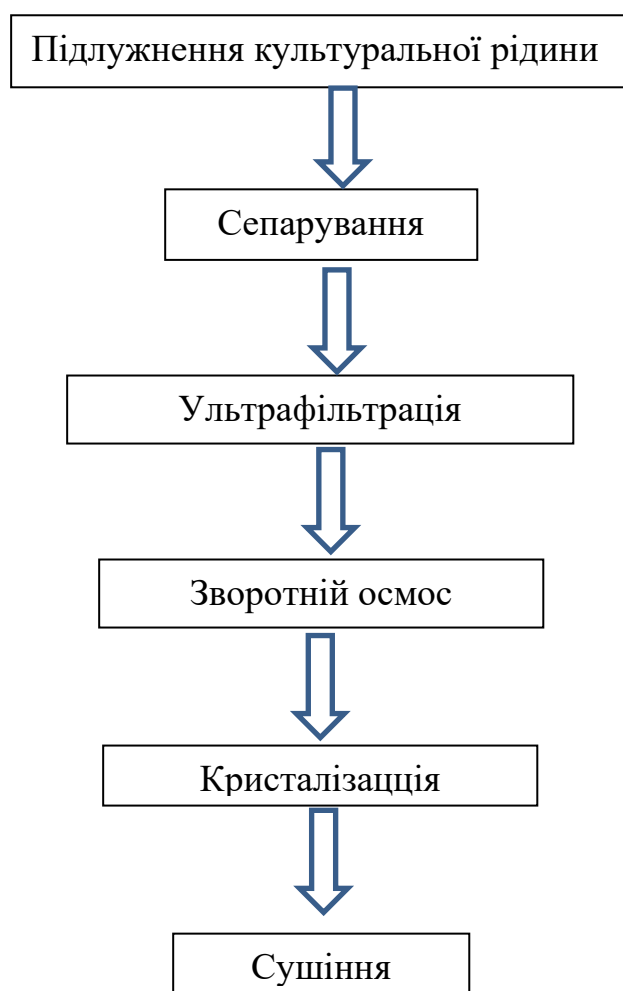


Рис 8.1 Схема виділення та очищення рибофлавіну

## РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### 9.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль процесу виробництва готової продукції є обов'язковою умовою для всіх підприємств, що дає змогу гарантувати відповідність фінішного продукту санітарним нормам та безпечність для споживачів.

Мікробіологічний контроль передбачає комплексний підхід, що полягає не тільки у контролі якості готового продукту, а і у контролі на кожному із етапів виробництва. Такий підхід дозволяє визначити критичні точки, у яких можлива контамінація, а також джерела забруднення, що дає змогу вчасно проаналізувати ризики і виконати кроки по запобіганню виникнення таких ситуацій.

Під час культивування здійснення мікробіологічного контролю відбувається у 2-х напрямках: контроль стерильності поживного середовища – для підтвердження відсутності мікроорганізмів у простерилізованих середовищах та контроль асептичності робочої культури – підтвердження відсутності сторонньої мікробіоти під час вирощування посівного матеріалу та біосинтезу. Зразки поживних середовищ після стерилізації розсівають на чашки Петрі з МПА (для виявлення бактерій) та СА ( для виявлення дріжджів та мікроміцетів) [49].

Підготовку чашок Петрі із агаризованим середовищем будемо здійснювати у декілька етапів. Спочатку чашки стерилізуються в сухожаровій шафі і наповнюються по 20-30 мл розплавленим поживним середовищем. Чашки Петрі залишають на рівній поверхні, щоб середовище застигло, після чого витримують протягом 2-3 діб при температурі 30°C кришками до низу [49].

Шляхом відбору стерильною піпеткою 0,1 мл з об'єму проби простерилізованого поживного середовища наносять на поверхню МПА і/ або СА. Розподіляють по всій поверхні поживного середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Після чого чашки Петрі поміщають у термостат

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.40 КР ПЗ</b>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Бушак Д. А.			<b>РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</b>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>							76	96
<i>Керівник</i>		Удимович В.М.				<b>Кафедра БТМ<sup>76</sup></b>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		Стабніков В.П.						

для проведення інкубації при температурі 32-34 °С протягом 1-2 діб. На поверхні поживних середовищ візуально визначаємо відсутність ознак росту мікроорганізмів [49].

## 9.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури

Є два методи контролю: прямий висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання.

Прямий висів здійснюється посівом культуральної рідини до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо–пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій.

Мікроскопіювання у світловому мікроскопі з імерсійною системою. Щоб підготувати препарат на чисте знежирене предметне скло за допомогою стерильної петлі наносимо невелику краплину культуральної рідини. Краплю, що містить клітини мікроорганізму, розподіляємо по склу за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушуємо без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. На абсолютно сухий препарат додатково наносять 1-2 краплини імерсійного масла, за допомогою скляної палички. Після завершення визначення, ватою із етиловим спиртом видаляємо залишки масла із об'єктива [49].

Під час мікроскопіювання, за умови відсутності у зразку сторонньої мікробіоти, ідентифікуємо клітини *Bacillus subtilis* RH44. Грампозитивні, паличкоподібної форми, утворюють термостійкі пори. Клітини заокругленої формами із розмірами 0,7-0,8 мкм × 2,0-3,0 мкм. Клітин розташовані поодинокі або попарно, рідко утворюють ланцюги [49].

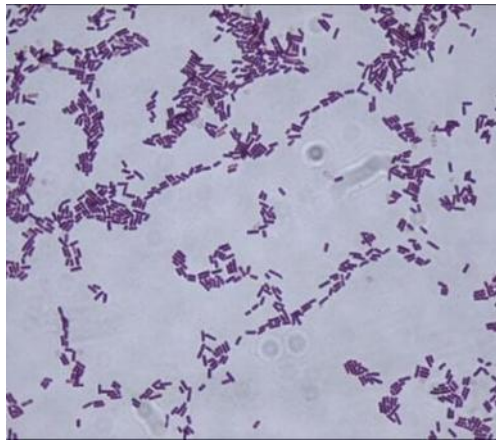


Рис. 9.1 Клітин *Bacillus subtilis* [50].

### 9.3 Визначення концентрації цільового продукту (рибофлавіну)

Рибофлавін є флуоресцентною сполукою, що має здатність випромінювати світло у видимому спектрі при збудженні ультрафіолетовим або синім світлом. Ця властивість зумовлена наявністю ізоалоксазинового кільця в структурі молекули, яке відповідає за характерну флуоресценцію. Максимум збудження рибофлавіну зазвичай знаходиться в діапазоні 440–450 нм, тоді як максимум емісії – близько 520–530 нм. Завдяки цим флуоресцентним властивостям, рибофлавін можна ефективно виявляти та кількісно визначати за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з флуоресцентним детектором [51].

Культуральну рідину центрифугують при (4000-5000 x g протягом 10-15 хвилин при 4°C) та отриманий супернатант фільтрують через фільтр 0,22 мкм.

Аналіз проводили на колонці Ultrasphere RP розміром 4,6 мм × 25 см (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Елюентом виступає ацетонітрил у концентрації від 3,6% до 30% — при рН 3,2. Розмір інжекції - 20-50 мкл, швидкість потоку- 1,0 мл/хв.

Флуоресцентний детектор замірював значення з довжинами хвиль збудження 440 нм і емісії 520 нм. Стандарти рибофлавіну та флавінмононуклеотиду використовували як еталони для ідентифікації піків і побудови калібрувальної кривої для кількісного аналізу [51].

## 9.4 Визначення концентрації джерела вуглецевого (глюкоза) і азотного живлення (дріжджовий екстракт) у поживному середовищі

Для визначення використаємо глюкозооксидазний метод.

**Принцип методу:** Глюкозооксидазний метод ґрунтується на специфічній ферментативній реакції окиснення глюкози. Глюкоза у присутності ферменту глюкозооксидази окиснюється киснем до глюконової кислоти з одночасним утворенням пероксиду водню ( $H_2O_2$ ).

**Індикаторна реакція:** Утворений пероксид водню вступає в реакцію з фенолом та 4-амінофеназоном в присутності ферменту пероксидази. В результаті цієї реакції утворюється хінонімін, який має характерне червоно-фіолетове забарвлення.

**Фотометричне визначення:** Інтенсивність забарвлення розчину пропорційна концентрації утвореного хіноніміну, вимірюється за допомогою спектрофотометру при довжині хвилі 500-550 нм. Отримане значення оптичної густини разом із калібрувальною кривою визначають концентрацію глюкози в досліджуваному зразку [52].

### Хід аналізу:

1. **Підготовка зразка:** зразок культуральної рідини центрифугують при 3000 об/хв протягом 10-15 хвилин.
2. **Додавання реагентів:** До отриманого супернатанту додають глюкооксидазу, пероксидазу, фізіологічний розчин та розчин  $KH_2PO_4$ . Суміш ретельно перемішують.
3. **Інкубація:** Суміш 20 хв витримують при 18-25°C для забезпечення повного протікання реакцій.
4. **Фотометрування:** Вимірюють оптичну густину реакційної суміші в кюветі з товщиною шару 5-10 мм.

**5. Розрахунок концентрації глюкози:** Концентрацію глюкози в дослідному зразку визначають за формулою:

$$C = (10 \times E_{\text{досл}}) / E_{\text{кал}}$$

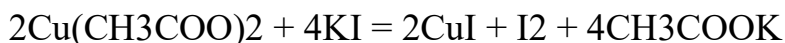
де:

- C – концентрація глюкози в дослідній пробі, г/л ;
- 10 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, г/л (це значення може змінюватися залежно від використаного набору реактивів);
- E<sub>досл</sub> – оптична густина дослідної проби;
- E<sub>кал</sub> – оптична густина калібрувальної проби [52].

Для визначення дріжджового екстракту використовуємо мідний метод визначення азоту.

Визначення амінного азоту мідним способом ґрунтується на здатності амінокислот і різних пептидів утворювати комплексні розчинні сполуки з міддю, яку потім визначають йодометрично.

**Принцип методу** полягає в тому, що до визначеної кількості досліджуваного розчину, який містить суміш амінокислот і пептидів, приливають при слаболужній реакції надлишок суспензії фосфорнокислої міді у боратному буфері, в результаті чого після збовтування у розчин переходять мідні солі більшості амінокислот. Потім надлишок фосфату міді відфільтровують і до прозорого розчину додають оцтову кислоту і йодистий калій. При цьому відбувається реакція:



Йод, що виділився відтитровують слабким розчином тіосульфату. Кожен мілілітр 0,01 н. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> відповідає 0,28 мг амінного азоту.

**Проведення аналізу.** 10 мл супернатанту культуральної рідини, доведеного до нейтральної реакції, наливають у мірну колбу на 25 мл і додають одну-дві краплі тимолфталеїну і по краплях 1 н. розчину NaOH до блідо-синього забарвлення. Після цього у колбу додають 10-15 мл суспензії ортофосфату міді у боратному буфері, потім доводять вміст колби до мітки дистильованою водою.

Добре зботвують і фільтрують через складчастий фільтр з малопористого фільтрувального паперу або центрифугують.

Фільтрат повинен бути зовсім прозорий, бо за наявності частинок осаду завищується кінцевий результат.

5-10 мл фільтрату відбирають у конічну колбу або у фарфорову чашку, додають 0,25 – 0,5 мл 80% оцтової кислоти, 0,2 – 0,4 г КІ. Йод, що виділився, відтитрують 0,01 н. розчином тіосульфату  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , додаючи в кінці титрування одну-чотири краплі крохмалю до зникнення синього забарвлення. Паралельно проводять контрольний дослід, де замість досліджуваного розчину беруть дистильовану воду.

Результат обчислюємо за формулою:

$$X = \frac{(a-v) \cdot 0,28}{n}$$

де  $X$  – вміст амонійного газу, мг/л;  $a$  – кількість 0,01 н. розчину тіосульфату натрію, витрачена на титрування дослідного зразка, мл;  $v$  – кількість 0,01 н. розчину тіосульфату натрію, витрачена на титрування контролю, мл;  $n$  – кількість досліджуваного розчину, яка взята для аналізу, мл [53].

### 9.5 Визначення концентрації біомаси

Для визначення концентрації біомаси використаємо ваговий метод, який базується на визначенні сухої маси мікробних клітин у культуральному середовищі. Цей метод дозволяє отримати абсолютне значення біомаси, виражене, наприклад, у г/л [55].

1. Відбирають 40 мл культуральної рідини.
2. зразок двічі промивають дистильованою водою, для видалення залишків поживного середовища.
3. Промиту пробу центрифугують 12 096 об/хв 10 хв при 20°C.
4. Осад з клітинами висушують при 60°C до постійної маси.

5. Висушений осад зважують на аналітичних терезах.
6. За різницею маси порожньої посудини та посудини з висушеним осадом розраховують масу сухої біомаси. Виходячи із початкового об'єм зразку, розраховують концентрацію біомаси в культуральній рідині (г/л) [54].

## 9.6. Карта постадійного контролю

Таблиця 9.1.

### Карта постадійного контролю

Назва стадії	Об'єкт контролю і показник,	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кт 1.2 Проходження через фільтри грубої очистки	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 90 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Компресування	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	P=0,35–0,5 МПа t=120-200 °C
Кт 1.4 Подача повітря у теплообмінник-охолоджувач та видалення вологи	Охоложене Повітря	Термометр технічний	Під час проведення Операції	t = 20°C W=60°
Кт 1.5 Подача повітря на підігрів	Нагріте повітря, Температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 30-35 °C
Кт 1.6 Пропускання через головні фільтри очистки	Очищене повітря	Перевірка ступеня Очищення	Під час проведення операції 1 раз на тиждень	E = 95 %
Кт 1.7 Очищення шляхом проходження через індивідуальні фільтри	Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Перевірка ступеня Очищення	Під час проведення операції 1 раз на місяць	E = 99,999 %
Кх, Км, Кт 2.1 Приготування 6%-го розчину соляної кислоти	Перевірка концентрації	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	C = 6 %

Кт, Кх, Км 2.2.1 Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду для підлужнення середовища в інокуляторах об'ємом 20л	Перевірка концентрації, температура, час	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	C = 6 % t = 131°C, τ = 40хв P = 0,15 МПа Відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 2.2.2 Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду для підлужнення середовища в інокуляторах об'ємом 160л	Перевірка концентрації, температура, час	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	C = 6 % t = 131°C, τ = 40хв P = 0,15 МПа Відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 2.2.1 Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду для підлужнення середовища у ферментері об'ємом 1,6м <sup>3</sup>	Перевірка концентрації, температура, час	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	C = 6 % t = 131°C, τ = 40хв P = 0,15 МПа Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа t = 112 °C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 131 °C τ = 40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 131 °C τ = 40 хв Відсутність мікробіоти

Продовження Таблиці 9.1.

Кт, Км 3.2.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа t = 112 °С τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 131 °С τ = 40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа t = 112 °С τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 131 °С τ = 40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа t = 112 °С τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 131 °С τ = 40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 Підтримання колекційної культури	Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час збереження, мік-	t = 2-4 °С 3-4 місяці відсутність сторонньої мікробіоти

			робиологічний контроль після збереження	
--	--	--	---	--

*Продовження Таблиці 9.1.*

Кт, Км 4.2 Одержання робочої культури	Тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 41°C, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.3 Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах	Тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 41°C, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безпосередньо під час виробничого процесу.	t = 41°C, τ = 24 год, 240 об/хв, Відсутність сторонньої Мікробіоти
Кт, Км, 4.5 Вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 20л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН - метр мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	t = 41°C, τ = 24 год, рН7.2, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 4.5 Вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 160л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН - метр мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	t = 41°C, τ = 24 год, рН7.2, Відсутність сторонньої Мікробіоти
Кт, Км, 5.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1,6м <sup>3</sup>	Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, непрямий метод визначення біомаси за	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	t = 41 °C, τ = 48 год, рН7.2, Ср =16,36г/л Відсутність сторонньої

	культури, концентрація біомаси	оптичною густиною	Відбір проб культуральної рідини – кожні 4 год	Мікробіоти
--	--------------------------------	-------------------	--	------------

## Перелік літератури:

1. Wu Q-L., Chen T., Gan Y., Chen X., Zhao X.-M. Optimization of riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical designs. *Biotechnological products and process engineering*. 2007, 76:783–794. DOI: 10.1007/s00253-007-1049-y4.
2. Решетило Л. І. Мікроорганізми як продуценти рибофлавіну. Вісник ЛТЕУ. Технічні науки, 2020, 23, 116-120.
3. Bartzatt A., Follis R., Michelle B. Detection and Assay of Riboflavin (Vitamin B2) Utilizing UV/VIS Spectrophotometer and Citric Acid Buffer. *Journal of Scientific Research & Reports*. 2014, 3. 799. 10.9734/JSRR/2014/8598.
4. Combs G. F., & McClung J. P.. Riboflavin. *The Vitamins*, 2017, 315–329. doi:10.1016/b978-0-12-802965-7.00012-5
5. Szczuko M., Ziętek, M., Kulpa, D. & Seidler, T.. Riboflavin - properties, occurrence and its use in medicine. *Pteridines*, 2019, 30(1), 33-47. <https://doi.org/10.1515/pteridines-2019-0004>.
6. Szczuko, M., Ziętek, M., Kulpa, D. & Seidler, T.. Riboflavin - properties, occurrence and its use in medicine. *Pteridines*, 2019, 30(1), 33-47. <https://doi.org/10.1515/pteridines-2019-0004>.
7. Bitsch, I., & Bitsch, R.. Riboflavin: Properties and Determination. *Encyclopedia of Food and Health*, 2016, 633–640. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00593-6.
8. Kundu B., Sarkar D., Ray N., Talukdar A. Understanding the riboflavin biosynthesis pathway for the development of antimicrobial agents. *Medicinal research reviews*. 2019, 39 (4): 1338-1371. doi: 10.1002/med.21576.
9. Schwechheimer S. K., Park E. Y., Revuelta J. L., Becker J., Wittmann C. Biotechnology of riboflavin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100 (5): 2107–2119. doi:10.1007/s00253-015-7256-z.
10. Lee K.H., Park Y. H., Han J. K., Park J. H., Lee K. H., Choi H., Microorganism for producing rboflavin and method for producing riboflavin using the same.

2007.<https://patentimages.storage.googleapis.com/07/0d/b1/59b41f7702da89/US7166456.pdf>

11. Wu Q-L., Chen T., Gan Y., Chen X., Zhao X.-M. Optimization of riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical designs. *Biotechnological products and process engineering*. 2007, 76:783–794. DOI: 10.1007/s00253-007-1049-y4.

12. Microbe Notes [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://microbenotes.com/bacillus-subtilis/>

13. LU Zh., GUO W., LIU Ch.. Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis* doi: 10.1292/jvms.16-0572.

14. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.

15. Фармацевтична енциклопедія. Вітамін В2. Рибофлавін. Електронний ресурс <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1103/riboflavin>

16. Sugimoto T., Morimoto A., Nariyama M., Kato T., Park E. Y. Isolation of an oxalate-resistant *Ashbya gossypii* strain and its improved riboflavin production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37:57–64. DOI: 10.1007/s10295-009-0647-3

17. Man Z.-W. , Rao Z.-M., Cheng Y.-P., Yang T.-W., Zhang X., Xu M.-J., Xu Z.-H. Enhanced riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RF1 through the optimization of agitation speed. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014, 2:661–667. DOI: 10.1007/s11274-013-1492-0

18. Державний реєстр лікарських засобів України. Електронний ресурс. <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=%F0%E8%E1%EE%F4%EB%E0%E2%B3%ED>

19. Інструкція для ЛЗ Ревіт, Ревит драже №80. Електронний ресурс. <https://tabletki.ua/%D0%A0%D0%B5%D0%B2%D0%B8%D1%82/1449/>

20. KEGG [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/bsx00010>

21. Microbe Notes [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://microbenotes.com/bacillus-subtilis/>

22. Пенчук Ю.М. Загальна біотехнологія. [Електронний ресурс]: Конспект лекцій для здобув. освітнього рівня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-проф. прог. «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч./– К.: НУХТ, 2019. – 80 с.

23. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.

24. Kuhner AG. (n.d.). Kuhner Shaker KS 4000 ic. Retrieved from [Електронний ресурс] //Режим доступу <https://www.medicalexpo.com/prod/kuhner-ag/product-109907-1070751.html>

25. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009.-336 с.

26. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прог. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 79 с.

27. Бактероцид. Інструкція з експлуатації. [Електронний ресурс] – режим до-

спу:<https://eliksir.ua/bakterocid#:~:text=%D0%91%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%BE%D1%86%D0%B8%D0%B4%20%2D%20%D1%86%D0%B5%20%D0%B7%D0%B0%D1%81%D1%96%D0%B1%20%D0%B4%D0%BB%D1%8F%20%D0%B3%D1%96%D0%B3%D1%96%D1%94%D0%BD%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%BE%D1%97,%D0%B1%D1%96%D0%BB%D0%BA%D0%B0%2C%20%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B2%D1%96%20%D1%82%D0%B0%20%D1%96%D0%BD%D1%88%D0%B8%D1%85%20%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%96%D0%B2>

28. PANPRO-212. Інструкція з експлуатації. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://clean-m.com.ua/uk/moyuhie-sredstva/panpro-212/>

29. DEZ-343. Інструкція з експлуатації. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://coagulant.com.ua/catalog/dez-343/>

30 . ІНСТРУКЦІЯ щодо застосування засобу КОРЗОЛЕКС ® ЕКСТРА [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/instruktsiia-shchodo-zastosuvannia-zasobu-korzoleks-ekstra-korsolex-extra-z-metoiu-dezinfektsii-dosterylizatsiinoho-ochyshchennia-ta-sterylizatsii/>

31. Нормативне забезпечення біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс] [Текст] : метод. рекомендації до викон. курсової роботи для здобувачів освіт. ступ, "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна" ден. форми навч. / уклад. : Т. П. Пирог, В. О. Красінько, С. О. Старовойтова ; Нац. ун-т харч. технол. — Київ : НУХТ, 2022. — 56 с.

32. Коробка для встановлення на повітрязборі К-МК [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://ccktm.prom.ua/ua/p1766406511-korobka-dlya-ustanovki.html>

33. Фільтруючий матеріал G4 від NEW FILTER [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtruyuchiy-material-g4.html>

34 . Компресор масляний повітряний Tesla Weld AIR 1000 [Електронний ресурс] // Режим доступу: [https://teslaweld.com/kompressor-tesla-weld-air-1000?gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiAjrArBhAWEiwA2qWdCJWunv5oQ5o-IEOFri2LunApMURc9kj\\_ZbrYtGLJK0HCdGZg0UjVZBoChywQAvD\\_BwE](https://teslaweld.com/kompressor-tesla-weld-air-1000?gad_source=1&gclid=CjwKCAiAjrArBhAWEiwA2qWdCJWunv5oQ5o-IEOFri2LunApMURc9kj_ZbrYtGLJK0HCdGZg0UjVZBoChywQAvD_BwE)

35. Пластинчастий теплообмінник SWEP B10THx20 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://termoprom.com.ua/teploobmenniki/po-tipu/plastinchatye-teploobmenniki/plastinchatyy-teploobmennik-swep-b10thx20>

36. Ресивер стиснутого повітря 3000l 30 бар, КР-3000-30 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://pneumatyka.com.ua/products/zbiornik-sprezonego-powietrza-3000l-30bar/>

37. Система підігріву повітря [Електронний ресурс] // Режим доступу: [https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting\\_cameras\\_equipment/air\\_heating\\_system.php](https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php)

38. Фільтр тонкої очистки повітря [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://tehnofilter.ub.ua/ru/goods/view/6364274/all/filtr-tonkoj-ochistki-vozduha-ftov-hepa-hepa/>

39. ЛАБОРАТОРНИЙ РЕАКТОР 15 Л [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://khimmix.ua/ua/himicheskie-reaktory/laboratornyj-reaktor-15-l>

40 . Реактор мобільний 100л AISI 304 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1254660370-reaktor-mobilnyj-100l.html?&primelead=MC44NQ>

41.Змішувач 500л з якірною мішалкою [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://khimmix.ua/ua/smesiteli-dlya-zhidkostejsmesitel-500-s-yakornoj-meshalkoj>

42. Комбінований дозатор [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://sweda.com.ua/ua/produktsiya/kombinirovanniyi-dozator/>

43. Ферментер ФР 20 автоматичне піногасіння та регулювання Ph [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://promvit.com.ua/fermenter-fr-20-avtomatichne-pinogasinnya-ta-regulyuvannya-ph/>

44. Ферментери (біореактор) Techfors, Infors [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://unilab.kiev.ua/catalog/fermentery-i-bioreaktory/FermenteryTechforsInfors/>

45. Стерилізуючі фільтри для газів [Електронний ресурс] //Режим доступу: <http://novafilter.tech/products/f%D1%96ltri/steril%D1%96zuyushh%D1%96/dlya-gaz%D1%96v>

46. Реактор-ферментер РФ-1500 для біологічних препаратів [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-fermentator-1500-l-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rastenij/>

47. Насос Grundfos UPS [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://modernsys.com.ua/tsirkulyatsionnyu-nasos-grundfos-ups-25-60-130-19121.html>

48. Method for recovery of riboflavin [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://patents.google.com/patent/US5103005A/en>

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

50. Microbe Notes [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://microbenotes.com/bacillus-subtilis/>

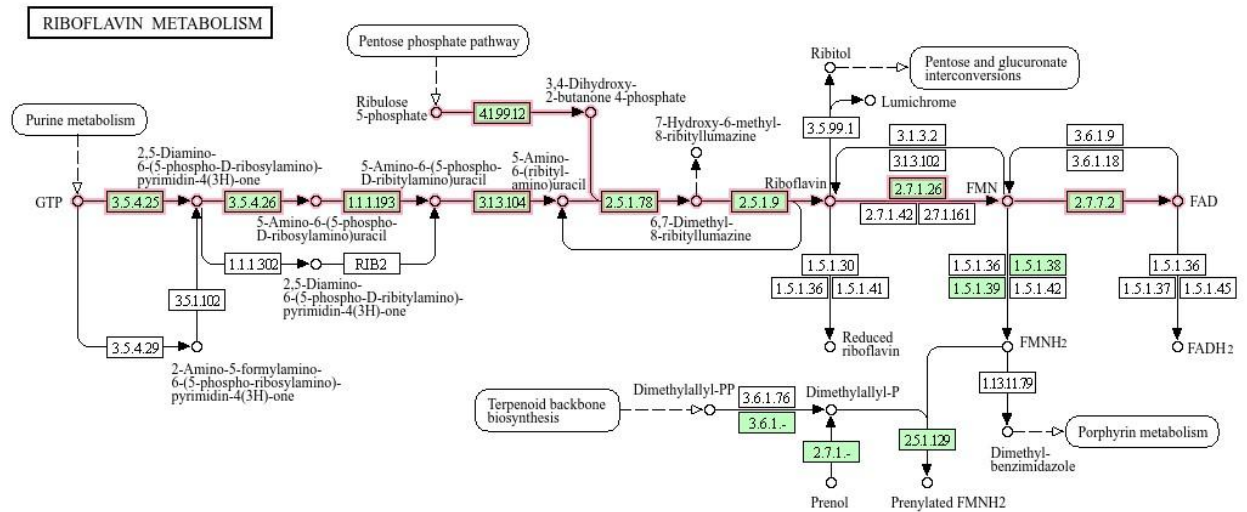
51. Package Insert [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://eaglebio.com/wp-content/uploads/data-pdf/vb231-h100.pdf-package-insert.pdf>

52. Калініченко С.В., Рижкова Т.А., Антушева Т.І., Скляр Н.І., Коротких О.О. Метод визначення катаболічної активності мікроорганізмів за кількістю окисленої глюкози. Вісник проблем біології і медицини. 2012, 97: 150-153.

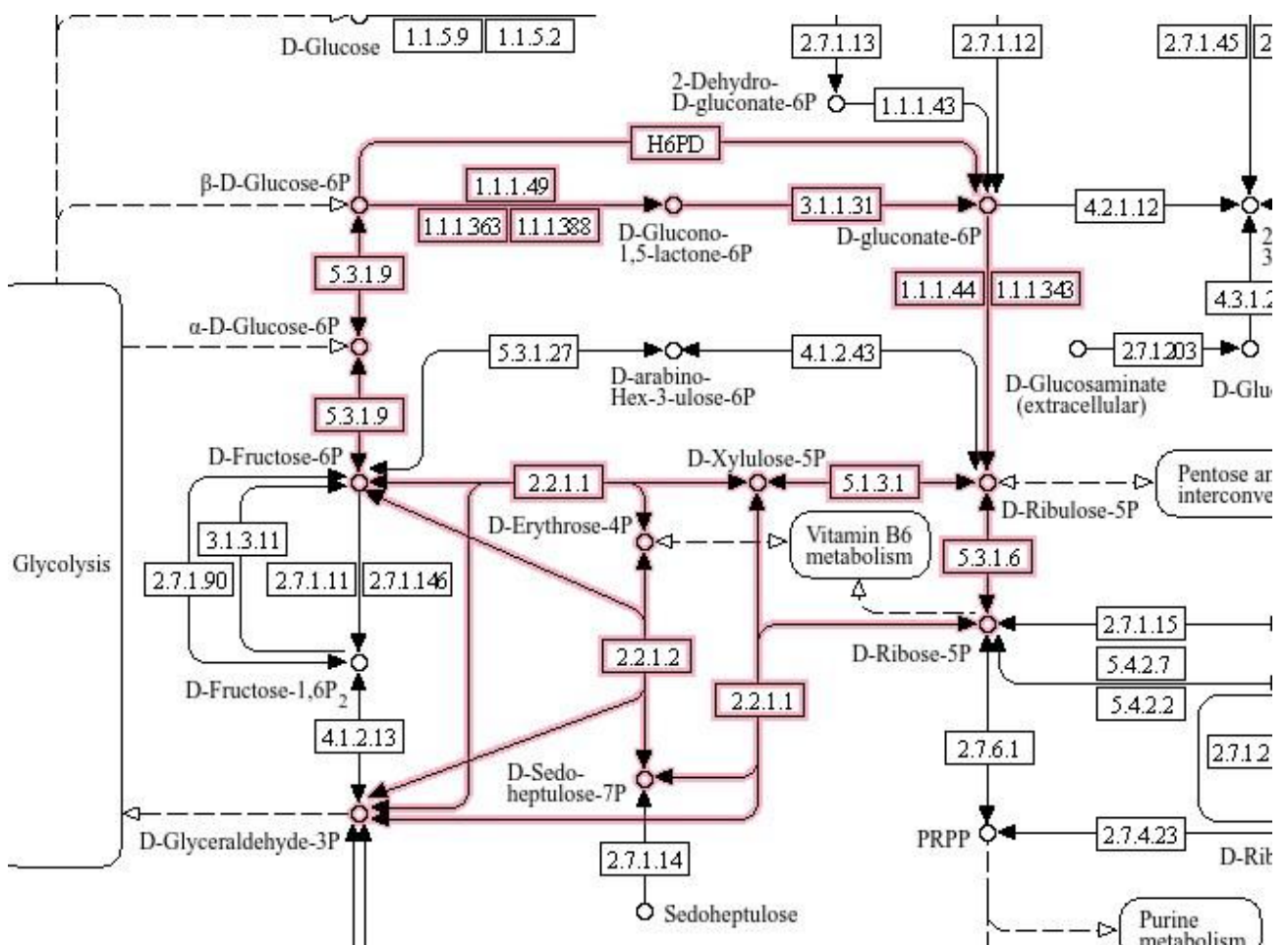
53. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія./ Т.П. Пирог. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.

54. Gualberto N.C., Nogueira J.P., da Silva A.S., Barbosa P.F., Matos C.M.S., Rajan M., Neta M.T.S.L., Nrain N. Optimization of the biotechnological process using *Rhodotorula mucilaginosa* and acerola (*Malpighia emarginata* L.) seeds for the production of bioactive compounds. LWT. 2022, 15. doi: [doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113190](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113190)

RIBOFLAVIN METABOLISM



00740 2/3/23  
(c) Kanehisa Laboratories



measuring the riboflavin production from recombinant *B. subtilis* RH44 based on a sequential statistical experimental design method.

The glucose measured in the experiment was from Shandong

**Materials and methods**

Experiment

**Microorganism and culture conditions**

The microorganism used in this study was *B. subtilis* RH44. This genetically engineered strain for riboflavin production was constructed in our laboratory by increasing both the dosage and expression levels of riboflavin biosynthesis genes (riboflavin operon) in a host strain *B. subtilis* RH13 (Li et al. 2006).

For identification of riboflavin production using PB, the experiment was carried out under various conditions and low water activity. The effect of each variable was determined by a one-factor-at-a-time level from

The strain was revived by growing on Luria–Bertani (LB) agar slants including 0.001 g/l erythromycin, 0.04 g/l chlor-

amphenicol, and 0.04 g/l kanamycin at 37°C. Batch cultures were conducted in 500-ml flasks containing 40 ml aliquots of seed medium at 41°C with shaking at 240 rpm for 60 h. The basal medium contained (g/l): glucose, 80; yeast extract, 5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1; and initial pH was adjusted to 7.2.

Fed-batch fermentation was accomplished in a 5-l bioreactor (Bao Xing, China) with 2.5-l initial medium. For seed preparation, cells from newly prepared slants were inoculated into 50 ml fresh seed medium in 500-ml flasks and cultured on a rotary shaker with 240 rpm at 41°C for 14 h. Seed with size 6% of inoculation was inoculated into the fermentation medium. The cells grew in the batch mode for 6 h after inoculation, and then the feeding process was continued from 6 to 48 h. The residue glucose concentration in the fermentor was maintained constantly (5~10 g/l) by monitoring the residue glucose concentration of the broth and by controlling the glucose feed rate. The cultivation was carried out for 48 h at agitation rate 850 rpm, with an aeration rate of 1.1 vvm and temperature of 41°C. pH was maintained at 7.2 with 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 4 M NH<sub>4</sub>OH. When DO in the broth was below 15%, which is the critical value for oxygen limitation, the head pressure of the fermentor was adjusted up to 0.3~0.5 atm to increase the oxygen transfer rate.

All the experiments were carried out independently in triplicates, and the results were the average of three replicate experiments.

amphenicol, and 0.04 g/l kanamycin at 37°C. Batch cultures were conducted in 500-ml flasks containing 40 ml aliquots of seed medium at 41°C with shaking at 240 rpm for 60 h. The basal medium contained (g/l): glucose, 80; yeast extract, 5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1; and initial pH was adjusted to 7.2.

Fed-batch fermentation was accomplished in a 5-l bioreactor (Bao Xing, China) with 2.5-l initial medium. For seed preparation, cells from newly prepared slants were inoculated into 50 ml fresh seed medium in 500-ml flasks and cultured on a rotary shaker with 240 rpm at 41°C for 14 h. Seed with size 6% of inoculation was inoculated into the fermentation medium. The cells grew in the batch mode for 6 h after inoculation, and then the feeding process was continued from 6 to 48 h. The residue glucose concentration in the fermentor was maintained constantly (5~10 g/l) by monitoring the residue glucose concentration of the broth and by controlling the glucose feed rate. The cultivation was carried out for 48 h at agitation rate 850 rpm, with an aeration rate of 1.1 vvm and temperature of 41°C. pH was maintained at 7.2 with 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 4 M NH<sub>4</sub>OH. When DO in the broth was below 15%, which is the critical value for oxygen limitation, the head pressure of the fermentor was adjusted up to 0.3~0.5 atm to increase the oxygen transfer rate.

All the experiments were carried out independently in triplicates, and the results were the average of three replicate experiments.