

**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
(підпис) (ім'я та прізвище)

« ___ » _____ 20__ р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

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

« ___ » _____ 20__ р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

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

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

на тему: «Культивування *Erwinia herbicola* для одержання аскорбінової
кислоти»

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

_____ ПОЛУЯН Руслана Миколаївна _____
(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)
Рецензент Олексій ГОДОВСЬКИЙ _____
(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 мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” листопада 2024 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ПОЛУЯН Руслани Миколаївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Erwinia herbicola* для одержання аскорбінової кислоти

керівник роботи УДИМОВИЧ Віктор Миколайович, ст. викл.,
доктор філософії

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 5 листопада 2024 року №932-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Erwinia herbicola*, цільовий продукт: 2-кето-L-гулонова кислота (попередник вітаміну C), об'єм ферментера геометричний 3 м³, коефіцієнт заповнення 0,65

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва; специфікація обладнання виробництва; опис технологічної схеми виробництва; контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва 2-кето-L-гулонової кислоти (попередник вітаміну C) – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва 2-кето-L-гулонової кислоти (попередник вітаміну C) – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика	01.11.2024-13.01.2024	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	01.11.2024-13.01.2024	
3	Техніко-економічне обґрунтування	14.11.2024-30.11.2024	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва	01.12.2024-15.12.2024	
5	Специфікація обладнання виробництва	16.12.2024-30.12.2024	
6	Опис технологічної схеми біосинтезу	09.01.2025-19.01.2025	
7	Контроль виробництва	20.01.2025-28.01.2025	
8	Охорона довкілля	29.01.2025-31.01.2025	
9	Оформлення пояснювальної записки	01.02.2025-07.02.2025	
10	Виконання графічної частини проекту	20.01.2025-07.02.2025	

Здобувач _____ Руслана ПОЛУЯН _____
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____ Віктор УДИМОВИЧ _____
(підпис) (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Представлена кваліфікаційна робота присвячена розробці апаратурної, а також технологічної, схеми біосинтезу 2-кето-L-гулонової кислоти (попередник аскорбінової кислоти) за допомогою *Erwinia herbicola* (також інші назви-синоніми – *Enterobacter herbicola*, *E. Agglomerans*, *Pantoea agglomerans*), з використанням штаму *Erwinia herbicola* ATCC 21998, який синтезує у концентрації 1 г/л.

Технологічна схема біосинтезу 2-кето-L-гулонової кислоти (як попередника вітаміну С) включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка титрувальних агентів, стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (стадії накопичення посівного матеріалу (інокуляту) та виробничий біосинтез у біореакторі об'ємом 3м³ коефіцієнтом заповнення 0,65).

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаних джерел (56 джерел), апаратурної схеми та технологічної схеми (формат А1,2 аркуші). Загальний обсяг роботи – 77 сторінок, 10 рисунків, 15 таблиці.

Ключові слова: 2-кето-L-гулонова кислота, *Erwinia herbicola*, біосинтез, вітамін С, технологічна схема, апаратурна схема.

ABSTRACT

The presented qualification work is devoted to the development of a hardware, as well as a technological, scheme of biosynthesis of 2-keto-L-gulonic acid (a precursor of ascorbic acid) using *Erwinia herbicola* (also other synonym names - *Enterobacter herbicola*, *E. Agglomerans*, *Pantoea agglomerans*), using the *Erwinia herbicola* ATCC 21998 strain, which synthesizes at a concentration of 1 g/l.

The technological scheme of biosynthesis of 2-keto-L-gulonic acid (as a precursor of vitamin C) includes auxiliary works (preparation of aeration air, preparation of titrating agents, sterilization of nutrient media) and the technological process (stages of accumulation of seed material (inoculum) and production biosynthesis in a bioreactor with a volume of 3m³ with a filling factor of 0.65).

The qualification work consists of an introduction, nine chapters, a list of sources used (56 sources), a hardware diagram and a technological diagram (format A1, 2 sheets). The total volume of the work is 77 pages, 10 figures, 15 tables.

Keywords: 2-keto-L-gulonic acid, *Erwinia herbicola*, biosynthesis, vitamin C, technological diagram, hardware diagram.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ЗМІСТ	6
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1.ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	10
2.1. Обґрунтування вибору біологічного матеріалу та поживного середовища для його культивування	14
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	18
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	19
РОЗДІЛ 3.ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	21
3.1. Потреба у виробництві вітаміну Сз 2-кето-L-гулонової кислоти.....	21
3.2. Обрахунок загальної потужності виробництва вітаміну С	25
3.3. Розрахунок загальної кількості циклів проектованого виробництва 2-кето-L-гулонової кислоти та об'єму виробничого ферментера.....	25
3.4. Розрахунок кількості необхідних етапів для підготовки посівного матеріалу	26
РОЗДІЛ 4.ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА 2-КЕТО-L-ГУЛОНОВОЇ КИСЛОТИ (ПОПЕРЕДНИКА ВІТАМІНУ С).....	32
4.1. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря.....	32
4.2. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для біосинтезу 2-кето-L-гулонової кислоти <i>Erwinia herbicola</i>	34
4.2.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	35
4.2.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах.....	35

4.2.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біочинтезу	37
4.3. Обґрунтування вибору розчинів/реактивів для регуляції рН.....	39
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА 2-КЕТО- L-ГУЛОНОВОЇ КИСЛОТИ (ПОПЕРЕДНИКА ВІТАМІНУ С)	40
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	46
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	52
7.1. Мікробіологічний контроль	52
7.2. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю	53
7.3. Визначення концентрації 2-кет- <i>L</i> -гулонової кислоти(попередника вітаміну С).....	55
7.4. Визначення концентрації біомаси	
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	65
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва 2-кет- <i>L</i> -гулонової кислоти як попередника вітаміну С на наявність твердоподібних, рідкоподібних та газоподібних відходів	65
8.2. Шляхи та попередні перспективи впровадження систем екологічного забезпечення виробництва 2-кет- <i>L</i> -гулонової кислоти як попередника вітаміну С.....	65
8.2.1. Система мінімізації та утилізації рідкоподібних відходів.....	65
8.2.3. Система мінімізації та утилізації твердоподібних відходів	69
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ (СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ).....	

ВСТУП

Аскорбінова кислота (також відома як вітамін С або аскорбат) — це водорозчинний вітамін, який міститься в фруктах, ягодах і овочах. Левова частка вітаміну С вироблялася хімічним методом, що є тривалим і вартісним шляхом. Численні модифікації процесу дали змогу підвищити загальний вихід L-аскорбінової кислоти з глюкози до 50% [1, 2].

Визначною віхою у промисловому виробництві вітаміну С стало відкриття мікроорганізмів, які були здатні синтезувати аскорбінову кислоту за умов росту на різноманітних поживних середовищах. Це дозволило спростити де-які стадії хімічного синтезу, спростивши технологію до тандемного бродіння культур *Erwinia sp.* і *Corynebacterium sp.* в поєднанні з одним хімічним етапом. Синтез аскорбінової кислоти ставав двоетапним та виглядав наступним чином: ферментація глюкози до 2-К-Л-Г, що каталізується рекомбінантним метаболічно сконструйованим організмом, з подальшим хімічним перетворенням 2-KLG в вітамін С. Удосконалена *Erwinia herbicola* ATCC 21998 продукує 2-К-Л-Г з глюкози. [1, 2].

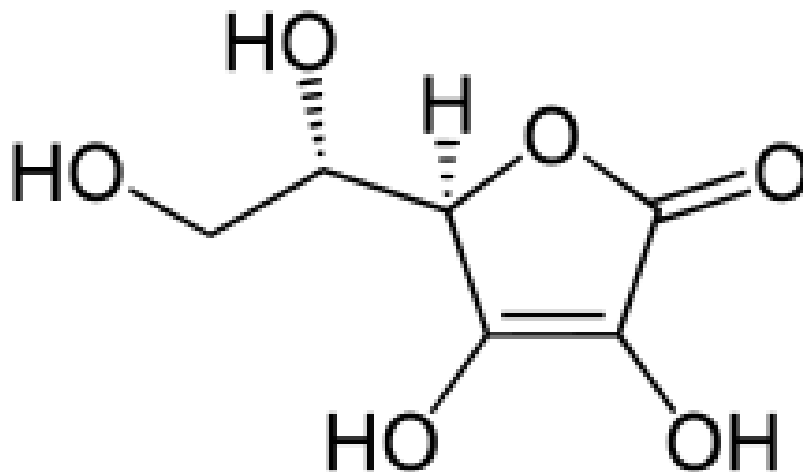
Вітамін С в організмі людини є критично важливим компонентом, що виступає як кофактор ферментів, сприяє виробленню багатьох сполук, що впливають на клітинні функції та гомеостаз, відіграє важливу роль у вірусній інфекції та ін., проте не синтезується самостійно і як наслідок, має регулярно потрапляти із продуктами або добавками / лікарськими засобами [3-4].

					НУХТ БТЕК 05.01.14КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Полуян Р.М.				Літ.	Арк.
Консульт.							Акрушів
Керівник		Удимович В.М.			ВСТУП		
Н. Контр.							
Зав. каф.		Стабніков В.П.					
					Кафедра БТМ		

Новизна роботи полягає у використанні високопродуктивного штаму *Erwinia herbicola* ATCC 21998, клітини якого здатні синтезувати 1 г 2-кето-L-гулонової кислоти (попередник аскорбінової кислоти) на поживному середовищі із глюкозою, за 48 годин культивування. Синтезована таким чином 2-кето-L-гулонова кислота буде використовуватися з подальшою циклізацією для забезпечення потреб вітчизняної фармацевтичної промисловості у дешевій сировині, з метою виробництва лікарських засобів, для профілактики і лікування захворювань, пов'язаних прямо чи опосередковано із дефіциту вітаміну С.

РОЗДІЛ 1.
ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Загальні відомості. Вітамін С (також відомий як аскорбінова кислота та аскорбат) — це водорозчинний вітамін, який міститься в цитрусових та інших фруктах, ягодах і овочах. Це також загальний рецептурний препарат і в деяких країнах продається як безрецептурна дієтична добавка. Як терапія



він використовується для профілактики та лікування цинги, захворювання, викликаного дефіцитом вітаміну С.

Рис. 1.1. Структурна формула L-аскорбінової кислоти (вітаміну С)

Брутто-формула: $C_6H_8O_6$;

Молекулярна маса: 176, 124 г/моль;

Температура плавлення: 190-192 °С;

Температура кипіння: 552,7 °С [4].

Вітамін С являє собою окислювально-відновну систему, що складається з 2 L-ізомерів: аскорбінової кислоти (вітамін С) у відновленому стані та дегідроаскорбінової кислоти (ДГК) в окисленому стані (рис. 1.2).

					НУХТ БТЕК 05.01.14КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Полуян Р.М.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Консульт.</i>								
<i>Керівник</i>		Удимович В.М.				Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		Стабніков В.П.						

Більшість функцій вітаміну в організмі людини пов'язана з роллю вітаміну С як донора електронів. При використанні як кофактора або антиоксиданту вітамін С окислюється до більш нестабільної дегідроаскорбінової кислоти, яка легко «переробляється» назад у вітамін С декількома ферментними системами, включаючи глутатіонзалежні системи або відновлений нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФН)- залежні системи. Ці ферментні системи можуть відновлювати кількість вітаміну С, як правило, у крові (35 ммоль/л) кожні 3 хвилини, що свідчить про чудову здатність людської системи зберігати вітамін С [5].

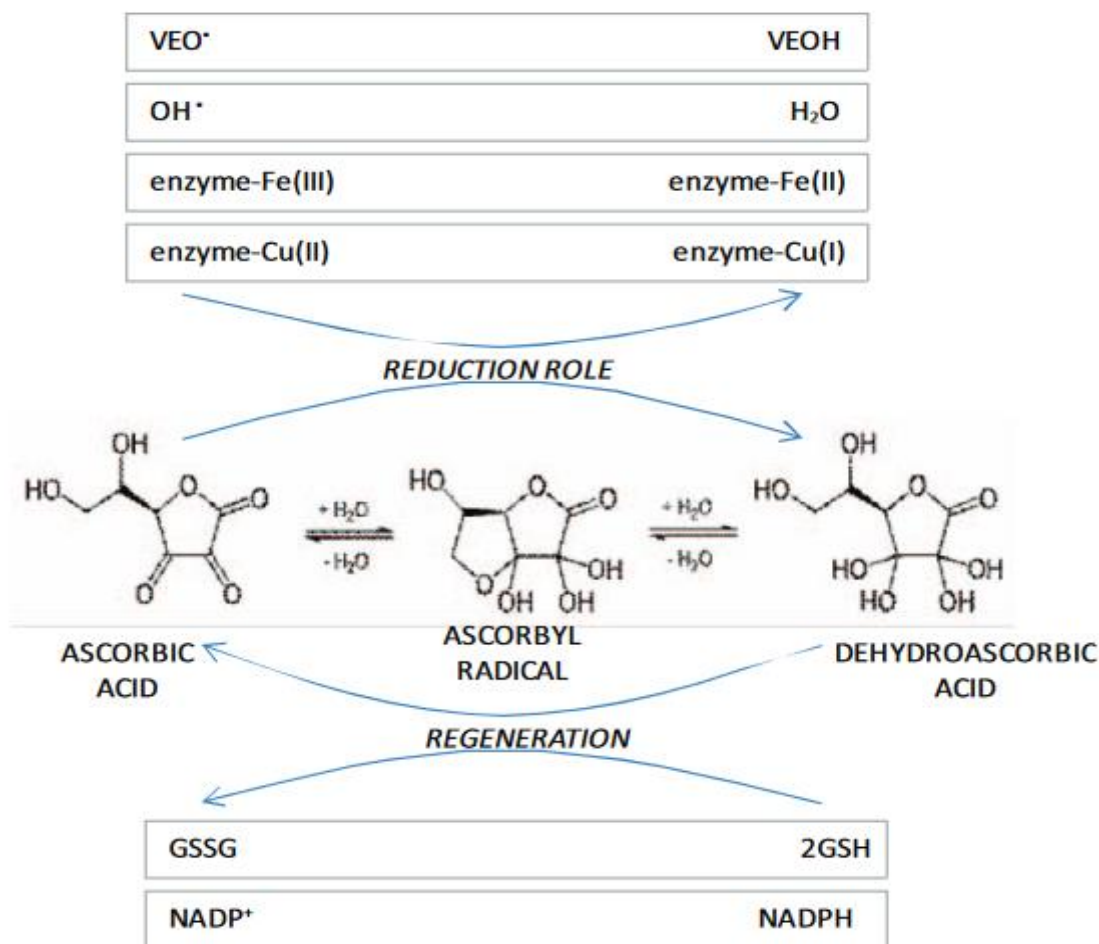


Рис. 1.2. Зв'язки між окисно-відновною системою вітаміну С та іншими сполуками [5]

Використання вітаміну С. Визнання вітаміну С пов'язане з історією невпинних пошуків причини давньої геморагічної хвороби цинги. Виділений

у 1928 році вітамін С необхідний для розвитку та підтримки сполучної тканини. Він відіграє важливу роль у формуванні кісток, загоєнні ран і підтримці здорових ясен. Вітамін С відіграє важливу роль у ряді метаболічних функцій, включаючи активацію вітаміну В, фолієвої кислоти, перетворення холестерину в жовчні кислоти та перетворення амінокислоти, триптофану, на нейромедіатор серотонін. Це антиоксидант, який захищає організм від пошкодження вільними радикалами. Його використовують як лікувальний засіб при багатьох захворюваннях і розладах. Вітамін С захищає імунну систему, зменшує вираженість алергічних реакцій і допомагає боротися з інфекціями. Однак значення та сприятливий вплив вітаміну С щодо захворювань людини, таких як рак, атеросклероз, діабет, нейродегенеративні захворювання та токсичність металів, залишається сумнівним. Таким чином, подальші постійні безперервні зусилля можуть відкрити нові перспективи для розуміння його значення в лікуванні захворювань [6].

Одержання вітаміну С.

Рейхштайнський процес виробництва вітаміну С. D-глюкозу гідрогенізували з утворенням D-сорбіту. D-сорбіт був перетворений в L-сорбозу оцтовими бактеріями. L-сорбозу додатково окислювали із захистом з утворенням 2-KLG. Потім 2-KLG було естерифіковано та лактонізовано з утворенням вітаміну С (рис 1.3) [7].

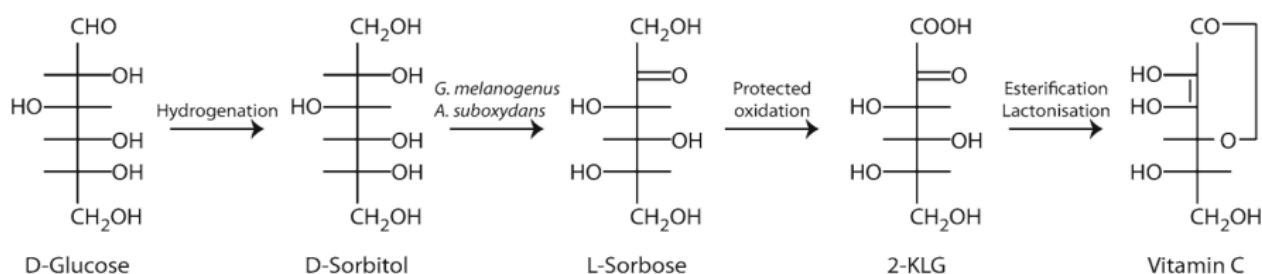


Рис. 1.3. Рейхштайнський процес [7]

Класичний двостадійний процес бродіння. D-глюкозу гідрогенізували з утворенням D-сорбіту. D-сорбіт був перетворений в L-сорбозу оцтовокислими бактеріями. L-сорбозу додатково окислювали системою змішаної культури з *B. megaterium* і *K. vulgare* з утворенням 2-KLG. Потім 2-KLG було етерифіковано та лактонізовано з утворенням вітаміну С. Єдина відмінність між класичним двостадійним процесом і процесом Рейхштейна полягає в заміні низькоефективного захисного окислення процесом бродіння (рис 1.4) [7].

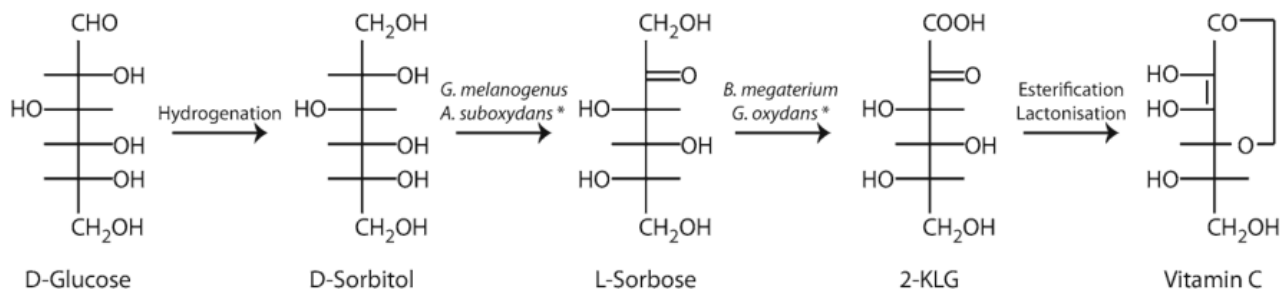
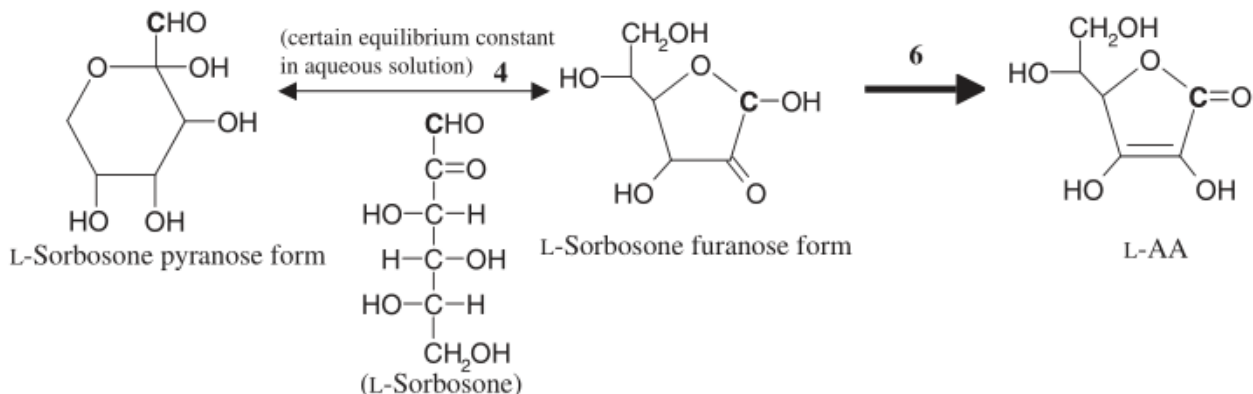


Рис. 1.4. Двостадійна схема [7]

Шлях перетворення L-сорбозону в L-АА за допомогою *Ketogulonicigenium vulgare* DSM 4025. L-сорбоза перетворюється у L-сорбозон під дією сорбозодегідрогенази [8].



РОЗДІЛ 2.
ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА
БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

У 80х роках було розроблено процес тандемного процесу бродіння *Glucanobacter* та *Erwinia*, які ефективно окислюють о-глюкозу до 2,5-DKG. Цей процес, який, як було показано, дуже ефективно здійснює біоконверсію глюкози в 2-KLG [1].

Процес виробництва 2-KLG, попередника аскорбінової кислоти, було здійснено єдиною, а не тандемною, культурою мікроорганізмів *Erwinia herbicola* ATCC 21998 у 1985 році, з виходом 2-KLG 1 г/л [1, 9]. Це генно-модифікований штам бактерії *Erwinia herbicola*. На сьогоднішній день у порівнянні із штамми, наведеними у таблиці 2.1, методика не є актуальною та ефективною.

Також розроблено генно-модифіковані штами *Saccharomyces cerevisiae* VTC2-M та *Escherichia coli* BL21 з метою одержання аскорбінової кислоти напряму. Але одержана концентрація цільового продукту є маленькою – 23,83 та 1,53 мг/л відповідно [10,11].

					НУХТ БТЕК 05.01.14КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Полуян Р.М.			РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.								
Керівник		Удимович В.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

Ketogulonicigenium vulgare DSM 4025, відомий як штам, що продукує 2-кето-L-гулонову кислоту з L-сорбози через L-сорбозон, продукував L-аскорбінову кислоту з D-сорбіту, L-сорбози, L-гулози та L-сорбозону, також як джерело вуглецю використовувалася L-глюкоза. Концентрація L-аскорбінової кислоти при синтезі на середовищі із глюкозою становила 1,37 г/л після 20 годин культивування.

Попри особливості як вибору біологічного агента штам *Ketogulonicigenium vulgare* має один з найбільших виходів цільового продукту (приблизно у 1,32 г/л) та одну з найменших вартостей 1 г цільового продукту процес відбувається із певною специфікою. Тому штам *Erwinia herbicola* ATCC 21998 який має трохи менший вихід 2-кето-L-гулонової кислоти (як попередник цільового продукту) (1 г/л) обираємо його.

Таблиця 2.1

Особливості одержання аскорбінової кислоти та її попередниківна суміші ростових субстратів

Продуцент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год	Концентрація продукту	Особливості процесу біосинтезу	Література
	Компонент	Концентрація, г/л				
<i>Erwinia herbicola</i> ATCC 21998	Глюкоза	3	48	1 г/л (2-кето-L-гулонової кислоти – попередника синтезу аскорбінової кислоти)	30 °C	[9]
	Дріжджовий екстракт	5				
	Пептон	5				
	CaCO ₃	7,5				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> VTC2-M	Глюкоза	20	72	23,83 мг/л	30 °C, 150 rpm	[10]
	Дріжджовий екстракт	10				
	Пептон	20				

<i>Ketogulonici genium vulgare DSM 4025</i>	Глюкоза	10	20	1.37 г/л	30 °С, 180 rpm, рН 7	[8]
	Кукурудзяний екстракт	30				
	Дріжджовий екстракт	50				
	Сечовина	5				
	MgSO ₄ *7H ₂ O	2,5				
	CaCO ₃	15				
	Гліцерол	0,5				

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування мікроорганізмів з метою одержання аскорбінової кислоти (вітаміну С)

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
<i>Erwinia herbicola ATCC 21998</i>	Глюкоза	3	100	0,3	1
	Дріжджовий екстракт	5	6 612	33,06	2
	Пептон	5	1 320	6,6	3
	CaCO ₃	7,5	87	0,65	4
Вартість 1 л поживного середовища – 40,61 грн					
<i>Saccharom yces cerevisiae VTC2-M</i>	Глюкоза	20	100	2	1
	Дріжджовий екстракт	10	6 612	66,12	2
	Пептон	20	1 320	26,4	3
Вартість 1 л поживного середовища – 92,72 грн					

<i>Ketogulonicigenium vulgare</i> DSM 4025	Глюкоза	10	100	1	1
	Кукурудзяний екстракт	30	78	2,34	1
	Дріжджовий екстракт	5	6 612	33,06	2
	Сечовина	5	66	0,33	4
	MgSO ₄ *7H ₂ O	2,5	45	0,11	1
	CaCO ₃	15	87	1,305	4
	Гліцерол	0,5	100	0,05	1
Вартість 1 л поживного середовища – 38,195 грн					

Примітка. * - Ціни наведено станом на березень 2024 року. 1 - <https://prom.ua/ua/>; 2 - <https://labtime.ua/uk/>; 3 - <https://www.systopt.com.ua/ru/>; 4 - <https://klebrig.com.ua/ua/>; 5 - <https://snabhim.com.ua/uk-ua/>; 6 - <https://megachem.com.ua/>;

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г аскорбінової кислоти

Продуцент	Концентрація цільового продукту, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного цільового продукту за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> VTC2-M	0,02383	72	0,0003	92,72	3 890
<i>Erwinia herbicola</i> ATCC 21998	1	48	0,02	40,61	54,5
<i>Ketogulonicigenium vulgare</i> DSM 4025	1,37	20	0,06	38,195	27,8

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування біологічного агента становить 48 год, концентрація 2-кето-L-гулонової кислоти (попередника синтезу аскорбінової кислоти) при культивуванні в культуральній рідині становить орієнтовно в 1 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу (2-кето-L-гулонової кислоти – попередника синтезу аскорбінової кислоти). Як джерело вуглецю для одержання 2-кето-L-гулонової кислоти (попередника синтезу аскорбінової кислоти) використовуються глюкоза. Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 1 г 2-кето-L-гулонової кислоти – попередника синтезу аскорбінової кислоти. Молекулярна маса вітаміну С, який отримують з 2-кето-L-гулонової кислоти, становить 176,12. Отже, у 176,12 г вітаміну С ($C_6H_8O_6$) міститься 72 г Карбону, а в 1 г вітаміну (отримують з 2-кето-L-гулонової кислоти) $(1 \times 72,0) / 176,12 = 0,41$ г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах глюкози міститься 0,42 г Карбону. Молекулярна маса глюкози ($C_6H_{12}O_6$) – 180. У 180 г глюкози міститься 72 г Карбону, а 0,41 г Карбону міститься у $(0,41 \times 180) / 72 = 1$ 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 $(1 \times 0,4) + 1 = 2,4$ г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 1 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 0,5 г.

Продуцент може асимілювати як джерело азотного живлення неорганічний Нітроген. Розрахуємо кількість даної сполуки, необхідну для одержання 0,5 г/л нітрогену. Молекулярна маса $(NH_4)_2SO_4$ становить 132,14.

Отже, у 132,14 г сульфату амонію міститься 28 г Нітрогену (N), тоді 0,5 г Нітрогену буде міститись у $(132,14 \times 0,5) / 28 = 2,36$ г солі. Для одержання 1 г/л біомаси вміст $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у середовищі культивування повинен становити 2,36 г/л.

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

На сьогодні відповідно до 10 видання Бергі, *Erwinia herbicola* (до якої відноситься і безпосередньо *Erwinia herbicola* ATCC 21998) іменується як *Pantoea agglomerans* а до синонімів відносяться назви *Enterobacter herbicola*, *E. agglomerans*, *Erwinia herbicola* [12].

Тому систематика по положенню для *Pantoea agglomerans* (синонім *Erwinia herbicola*) виглядає наступним чином:

Домен Bacteria

Відділ Proteobacteria

Клас Gammaproteobacteria

Ряд Порядок Enterobacteriales

Родина Enterobacteriaceae

Рід Pantoea [12].

Зазвичай оптимальним значенням температурним значенням для розвитку культури є діапазон в межах 28–30 °C. Колонії *Pantoea agglomerans* на поживному агаризованому середовищі гладкі, напівпрозорі з опуклістю. Бактерії культури при розвитку не утворюють капсул зі спорами. *Pantoea agglomerans* здатний рости на середовищі Сімонса із цитратом та середовищі Лурія-Бертані, а також продукує пігмент жовтого кольору на триптон-соєвому більйоні [12].

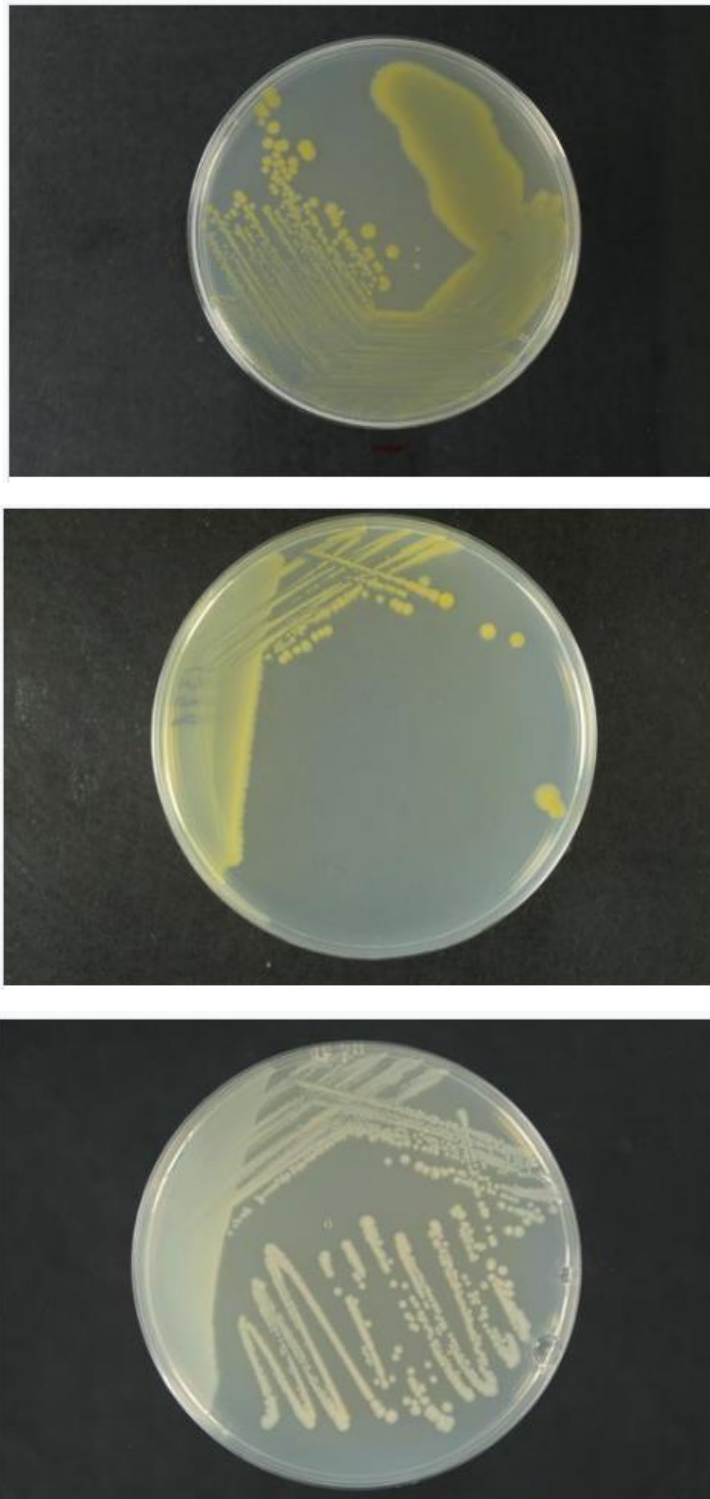


Рис.2.1. Ріст *Erwinia herbicola*(*Pantoea agglomerans*)на поживному середовищі [13].

РОЗДІЛ 3.
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ
Потреба у виробництві вітаміну С
з 2-кето-L-гулонової кислоти

Вітамін С має багато властивостей, які роблять його цінним терапевтичним засобом під час виникнення і профілактики респіраторних інфекцій. Це потужний антиоксидант із протизапальними та імунопідтримуючими властивостями. Вітамін С — це невелика водорозчинна молекула, яка легко діє як відновник для багатьох вільних радикалів і окислювачів. Спеціалізовані клітини можуть поглинати знижений вміст вітаміну С (аскорбінової кислоти) через Na^+ -залежні котранспортери аскорбату. Більшість клітин поглинають вітамін С у його окисленій формі, дегідроаскорбінової кислоті, за допомогою переносників глюкози. Майже всі ссавці, за винятком людини, приматів і морських свинок, можуть синтезувати вітамін С у своїй печінці із посиленням під час стресових ситуацій. Вітамін С є важливим вітаміном, який діє як кофактор для кількох ферментів і сприяє виробленню катехоламінів, вазопресину, L-карнітину, нейромедіаторів колагену та кортизолу, які є центральними для клітинної функції та гомеостазу. Крім того, вітамін С відіграє важливу роль у вірусній інфекції, включаючи ослаблення протизапальної відповіді, посилення функції епітеліального бар'єру, підвищення кліренсу альвеолярної рідини та запобігання аномалій коагуляції, пов'язаних із сепсисом [1, 2]. Таким чином виробництво аскорбінової кислоти для потреб населення є одним із пріоритетних напрямів промислової біотехнології.

					НУХТ БТЕК 05.01.14КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Полуян Р.М. І.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрюшіє</i>
<i>Консульт.</i>								
<i>Керівник</i>		Удимович В.М.				Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		Стабніков В.П.						

Аскорбінова кислота або вітамін С, входять до складу твердих лікарських засобів (ЛЗ) або дієтичних добавок, що належать за АТХ класифікацією до груп «Вітаміни. Прості препарати аскорбінової кислоти (вітаміну С)», «Полівітаміни з мікроелементами» або «Парацетамол, комбінації без психолептиків». ЛЗ із вітаміном С на ринок України постачають: ТОВ "ГЛЕДФАРМ ЛТД", ПрАТ "Технолог", АТ "КИЇВСЬКИЙ ВІТАМІННИЙ ЗАВОД", ТОВ "АСТРАФАРМ", ПрАТ "Біолік", Драженофарм Апотекар Пюшль ГмбХ, Німеччина, ПАТ "Хімфармзавод "Червона зірка" та КРКА, д.д., Ново место, Словенія [3].

Концентрація аскорбінової к-ти становить 35-1000 мг (див. табл 3.1). Для розрахунку, щоб забезпечити потребу у виробництві вітаміну С, прийємо середню концентрацію аскорбінової кислоти в 150 мг в таблетці / драже.

Таблиця 3.1

ЛЗ, що містять у своєму складі вітамін С (аскорбінову к-ту)

Назва ЛЗ	Концентрація вітаміну, на 1 таблетку/драже
РЕВІТ драже по 75 або 100 драже	35 мг
ОПТИКС таблетки, вкриті плівковою оболонкою по 10	225 мг
ГЕКСАВІТ драже по 50 драже	70 мг
ВАЗАВІТАЛ® капсули по 10 капсул у блістері,	75 мг

УНДЕВІТ драже, по 50 драже	75 мг
ЕЛЕВІТ® ПРОНАТАЛЬ таблетки вкриті плівковою оболонкою	100 мг
ДУОВІТ® таблетки, вкриті оболонкою	60 мг
ГРИПОМЕД® капсули	150 мг
ВІТАМІН С 500 таблетки жувальні з різними смаками по 500 мг;	кислоти аскорбінової 200 мг, натрію аскорбату 337 мг (що відповідає 300 мг кислоти аскорбінової)
Середня доза вітаміну С	150 мг

Оскільки всі наведені вище ЛЗ мають схожі показання до застосування [4-7], які можна об'єднати у кілька таких загальних як то приймемо для розрахунку, що потреба у вітаміні С є у всього населення України: при фізичних і психічних перенавантаженнях (при навчанні, на роботі або вдома); при заняттях активними видами спорту та активним відпочинком; при порушеннях засвоєння поживних речовин (при вживанні алкоголю, палінні, у людей літнього віку); у періоди сезонного дефіциту фруктів та овочів у раціоні, для лікування гіпо- та авітамінозу С; при значній втраті мінеральних речовин (унаслідок блювання, діареї, надмірних менструацій, підвищеного потовиділення); у період гострих респіраторних та інфекційних захворювань, що супроводжуються підвищеною температурою тіла, головним болем, набряком слизової оболонки носа (ринітом); у період реконвалесценції після тяжких захворювань, оперативних втручань, при

променевій хворобі, гепатиті, холециститі, хворобі Аддісона, при пораненнях м'яких тканин, які в'яло загоюються, інфікованих ранах та переломах кісток; при різних інтоксикаціях, геморагічних діатезах, захворюваннях сполучної тканини (ревматоїдний артрит), кровотечах (носові, легеневі, маткові).

В середньому призначають 1 таблетку / драже на добу для профілактики або 1 таблетка / драже 3 рази на добу під час лікування. Середнє значення обрано у зв'язку із тим, що в інтернеті не має статистичних даних, який відсоток населення лікується і/ або приймає у профілактичних цілях вітамін С. Таким чином було вирішено обрати середнє значення у 2 таблетки на добу, щоб максимально бути наближеним до реалістичних значень по споживанню вітаміну С населенням.

Вітамін С, який отримують з 2-кето-L-гулонової кислоти, призначають дорослим і дітям віком від 14 років, тому під час розрахунку дітей молодших 14 років враховувати не будемо. Станом на грудень 2024 року населення України становить близько 27 млн осіб [14].

Із них дітей молодше 14 років близько 6119,9 тис.осіб [14, 15]. Таким чином, розрахована кількість пацієнтів складе 20 800 100 осіб. За призначенням лікаря курс лікування вітаміном С становить 5–7 днів під час лікування застуди та впродовж в середньому 30 днів (курс лікування повторювати 2–3 рази на рік) для вітамінних комплексів. Оскільки на ринку переважає кількісно вітамінні ЛЗ, то для розрахунку приймемо термін лікування у 20 діб. Таким чином потреба у вітаміні С на курс лікування становить 124 800,6 кг

Розрахунок потреби населення у вітаміні С

Доза вітаміну С в 1 таблетці/драже, мг	Середня кількість таблеток/драже на добу, шт	Курс прийому, діб	Кількість пацієнтів, млн.	Потреба у вітаміні С, кг
150 мг	2	20	20 800 100	124 800,6

Обрахунок загальної потужності виробництва вітаміну С

Згідно з даними із мережі Інтернет в Україні не має власного виробництва 2-кетогулонової кислоти як попередника вітаміну С і вся сировина імпортується із Китаю. Тому будемо виробляти 2-кетогулонову кислоту (попередник вітаміну С) для задоволення 0,2 % від загальної потреби, оскільки на ринку існує суттєва конкуренція:

$$124\,801 \text{ кг} \times 0,002 = 249,6 \text{ кг}$$

Розрахувавши потребу у 2-кетогулоновій кислоті (попередник вітаміну С) на рік, необхідно визначити, скільки культуральної рідини можна отримати під час культивування штаму *Erwinia herbicola* ATCC 21998, який синтезує 1 г/л вітаміну С протягом 48 год [1]. Тоді об'єм культуральної рідини становитиме:

$$\frac{249,6 \times 1000}{1} = 249600 \text{ л}$$

Далі розраховуємо загальні втрати під час етапів виділення і трансформації 2-кетогулонової кислоти у аскорбінову кислоту із культуральної рідини які складають 10 %:

$$249600 \text{ л} / (1 - 0,1) = 277333 \text{ л}$$

3.1. Розрахунок загальної кількості циклів проектного виробництва 2-кетогуанонової кислоти 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 кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) = 350, тоді кількість культуральної рідини на добу ($V_{д}$) становитиме:

$$V_{д} = C / T_{рд} = 277333 / 365 = 759,8 \text{ л}$$

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

$$V_{пц} = \frac{K_1 * V_{д} * T_{цф}}{24} = \frac{1,1 * 795,8 * 56}{24} = 1950 \text{ л/цикл}$$

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 (1856 л) можна одержати у ферментері, геометричний об'єм якого складатиме:

$$V_{г} = \frac{V_{пц}}{K_{зап}} = \frac{1950}{0,65} = 3000 \text{ л}$$

Найближчим за об'ємом є стандартний ферментер на 3,0 м³ ($V_{ф}$).

Уточнюємо коефіцієнт заповнення для обраного ферментера:

$K_{зап} = V_{г} / V_{ф} = 1950,0/3000 = 0,65$. Розраховане число не перевищує заданого значення, а отже, об'єм ферментера підібраний правильно.

3.2. Розрахунок кількості необхідних етапів для підготовки посівного матеріалу

Отже, за виробничий цикл можна одержати $V_{\text{пц}} = 1950$ л культуральної рідини. Врахуємо, 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:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{пц}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 1950 / (1 - 0,1) = 2167 \text{ л}$$

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:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 2167 / (1 + 0,1) = 1970 \text{ л},$$

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

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 2167 - 1970 = 197 \text{ л}$$

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:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 197 / (1 - 0,15) = 231,7 \text{ л}.$$

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

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 231,7 / (1 + 0,1) = 210,6 \text{ л,}$$

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

Далі слід розрахувати об'єм посівного матеріалу для посівного апарату, який становить $V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 231,7 - 210,6 = 21,1 \text{ л.}$

Інокулят об'ємом $V_{\text{роб.2}} = 231,7 \text{ л}$ можна отримати протягом вирощування штаму у посівному апараті з геометричним об'ємом $V_{\text{ін2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 231,7 / 0,65 = 356,5 \text{ л.}$ Для цього обираємо найближчий за розміром стандартний посівний апарат $V_{\text{спа}} = 400 \text{ л.}$ Перерахований коефіцієнт заповнення складатиме:

$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сін}} = 231,7 / 400 = 0,58.$ Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів

Посівний матеріал об'ємом 21,1 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:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 21,1 / (1 - 0,15) = 24,8 \text{ л.}$$

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:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 24,8 / (1 + 0,1) = 22,5 \text{ л,}$$

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

Об'єм посівного матеріалу для інокулятора становить $V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 24,8 - 22,5 = 2,3$ л.

Інокулят об'ємом $V_{роб.3} = 24,8$ л можна отримати протягом вирощування штаму у посівному апараті з геометричним об'ємом $V_{ін3} = V_{роб.3} / K_{зап} = 24,8 / 0,65 = 38,15$ л. Для цього обираємо найближчий за розміром стандартний посівний апарат $V_{спа} = 40$ л. Перерахований коефіцієнт заповнення складатиме:

$K_{зап3} = V_{роб.3} / V_{спн} = 24,8 / 40 = 0,62$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів

Посівний матеріал об'ємом 2,3 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:

$$V_{роб.4} = V_{пм4} / (1 - E_{ін}) = 2,3 / (1 - 0,15) = 2,7 \text{ л.}$$

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:

$$V_{пс4} = V_{роб.4} / (1 + X_{ін}) = 2,7 / (1 + 0,1) = 2,45 \text{ л,}$$

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

Об'єм посівного матеріалу для інокулятора становить $V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 2,7 - 2,45 = 0,25$ л.

Інокулят об'ємом $V_{роб.4} = 2,7$ л можна отримати протягом вирощування штаму у посівному апараті з геометричним об'ємом $V_{ін4} = V_{роб.4} / K_{зап} = 2,7 / 0,65 = 4,15$ л. Для цього обираємо найближчий за розміром стандартний

посівний апарат $V_{\text{спа}} = 4$ л. Перерахований коефіцієнт заповнення складатиме:

$K_{\text{зап4}} = V_{\text{роб.4}} / V_{\text{ін4}} = 2,7 / 4,15 = 0,65$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів

Посівний матеріал об'ємом $V_{\text{пм4}} = 0,25$ 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:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 250 / (750 \cdot 0,2) = 1,7, \text{ отже, } 2 \text{ колби.}$$

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідно 2 качалочні колби.

Можна зробити висновок, що процес одержання посівного матеріалу для проведення виробничого біосинтезу 2-кето-L-гулонової кислоти (як попередника вітаміну С) у ферментері об'ємом 3,0 м³ за коефіцієнту заповнення 0,65 буде проходити у 4 етапи. Узагальнена інформація щодо кількості стадій виробництва молочної кислоти наведена у табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Кількість стадій та апаратів, необхідна підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу 2-кето-L-гулонової кислоти (попередника вітаміну С)

№ стадії	Геометричний об'єм обраного апарату, $V_{\text{г}}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$, частка	Робочий об'єм апарату, $V_{\text{роб}}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$, л
1	2	3	4	5	6
1	3000	0,65	2167	1970	197
2	400	0,58	231,7	210,6	21,1
3	40	0,62	24,8	22,5	2,3
4	4	0,65	2,7	2,45	0,25
5	0,75×2 колби	0,2	–	0,25	0,25

Отже, за результатами наведених розрахунків, можна зробити висновок, що для біосинтезу 2-кето-L-гулонової кислоти *Erwinia herbicola* ATCC 21998 потрібно встановити один ферментер об'ємом 3,0 м³, один посівний апарат об'ємом 400 л, один інокулятор об'ємом 40 л і один інокулятор об'ємом 4 л.

РОЗДІЛ 4.
ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ
ВИРОБНИЦТВА 2-КЕТО-L-ГУЛОНОВОЇ КИСЛОТИ
(ПОПЕРЕДНИКА ВІТАМІНУ С)

4.1. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря

Erwinia herbicola ATCC 21998 є факультативним анаеробом по відношенню до кисню [1] і для росту та біосинтезу 2-кетолулонової кислоти (попередника вітаміну С) необхідна стабільно постійна подача підготованого стерильного повітря. Таким чином у технологічній схемі слід включити стадії підготовки стерильного аераційного повітря. У мікробіологічній лабораторії під час підготовки посівної культури та інокуляту, стерилізація повітря здійснюється опроміненням за допомогою УФ-ламп.

Підготовка повітря включає у себе декілька етапів, які організовані у такій послідовності:

- Через повітрозбірник, за допомогою турбокомпресору на висоті 2-3 м від найвищої точки будівлі, по забірній шахті здійснюється забір порцій атмосферного повітря. Враховуючи висоту ферментера об'ємом 3,0 м³ – 3,8 м, а також висоту поверху – 7 м, косий дах будівлі ~ 1,5 м, забір повітря виконують на висоті ~ 15 м.
- Далі повітря поступає на фільтри попередньої очистки, щоб очиститись від грубих часток пилу. Фільтри класу G2-G3 виконанні із фільтрувального матеріалу, що представляє собою 100 % синтетичний

					НУХТ БТЕК 05.01.14КР ПЗ							
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>								
<i>Розроб.</i>	Полуян Р.М.				РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА 2- КЕТО-L-ГУЛОНОВОЇ КИСЛОТИ (ПОПЕРЕДНИКА ВІТАМІНУ С)			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>		
<i>Консульт.</i>												
<i>Керівник</i>	Удимович В.М.							Кафедра БТМ				
<i>Н. Контр.</i>												
<i>Зав. каф.</i>	Стабніков В.П.											

поліестер, волокна якого термічно склеєні між собою.

- подача порцій відібраного повітря на фільтри попередньої очистки, які необхідні для вловлювання грубих часточок і захисту чутливих елементів / вузлів системи очистки повітря.
- повітря стискається у турбокомпресорі до 0,35 – 0,5 МПа і як наслідок підвищується його температури (120 – 250 °С) разом із підвищенням вмісту вологи.
- повітря охолоджується і осушується на теплообміннику. Зайва волога відводиться краплевловлювачем. Цей етап необхідний щоб запобігти злипанню волокон фільтрувального матеріалу.
- подача повітря на фільтри головної очистки F6-F7. Фільтри допомагають позбутися близько 98 % мікроорганізмів. Матеріал фільтрів виготовляється на основі поліпропіленових ультратонких волокон, що дозволяють затримувати середньо та дрібнодисперсні частинки забруднення.
- подача очищеного повітря на індивідуальні фільтри по магістральним трубопроводам, які знаходяться на кожному інокуляторі / ферментері (очистка до 99,999% мікроорганізмів) [16, 17]. Такими фільтрами можуть бути фільтри HEPA H10-H14, виготовлені з довгого листа волокнистого матеріалу (діаметр волокон 0,65-6,5 мікрон, відстань між ними 10-40 мікрон), складеного гармошкою. Мають здатність до високоефективного утримання частинок розміром до 0.3 мікрон. Корпус цих фільтрів може бути виконаний із різних матеріалів, забезпечуючи довговічність та надійність в експлуатації. Клас пожежної безпеки F1 (трудозаймисті матеріали).

4.2. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для біосинтезу 2-кетогулонової кислоти *Erwinia herbicola*

Біосинтез 2-кетогулонової кислоти (попередника вітаміну С) здійснюється у ферментері об'ємом 3,0 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,65. Підготовка посівного матеріалу відбувається у три стадії (в колбах на качалці, у посівних апаратах об'ємом 4, 40 і 400 л).

Згідно із інформацією із статті [1], поживне середовище складається із таких компонентів (г/л):

- Глюкоза – 3,0;
- дріжджовий екстракт – 5,0;
- пептон – 5;
- CaCO₃ – 7,5;
- рН середовища – 7,0.

Максимально ефективний біосинтез 2-кетогулонової кислоти може бути досягнуто лише в умовах сурової стерильності поживного середовища, яке використовується протягом біосинтезу *Erwinia herbicola*. Оскільки поживне середовище складається із різних компонентів, які стерилізуються за різних умов, їх розділяють на окремі композиції, щоб правильно обрати режими стерилізації.

Оскільки зовсім невеликий об'єм поживного середовища потрібен для вирощуванні інокуляту у колбах, то стерилізація відбувається в автоклаві. Кожні наступні стадії отримання інокуляту і стерилізацію середовища, в залежності від об'ємів, будуть здійснюватися в основному у реакторах-змішувачах. Глюкоза, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт, сечовина стерилізуватиметься окремо через термолабільність.

4.2.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

На цьому етапі, щоб отримати необхідний об'єм інокуляту, потрібно приготувати 230 мл стерильного поживного середовища. Підготовлене середовище розливаємо у 2 стерильних качалочних колбах об'ємом по 750 мл. Стерилізацію компонентів середовища в автоклаві проводимо таким чином:

Композиція А: Глюкоза, дріжджовий екстракт, пептон (режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа, час 20 – 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Таблиця 4.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент	Вміст, г/л	Кількість компоненту для приготування 250 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції
Глюкоза	3	0,75	А	0,15
Дріжджовий екстракт	5	1,25		
Пептон	5	1,25		
Вода		0,15		
CaCO ₃	7,5	1,9	Б	0,1
Вода		0,08		
Всього:				0,25

4.2.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Підготовка посівного матеріалу передбачає приготування 2,45 л, 22,5 л і 210,6 л стерильного поживного середовища

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 4 л

Для цієї стадії необхідно 2,45 л поживного середовища, склад композиції та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.2.1. Композиції стерилізується в автоклаві.

Композиція А: Глюкоза, дріжджовий екстракт, пептон (режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа, час 20 – 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації: 131°С, 40 хв).

Таблиця 4.2

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 4 л (Кз = 0,65)

Компонент	Вміст, г/л	Кількість компоненту для приготування 2,45 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції
Глюкоза	3	7,35	А	1,45
Дріжджовий екстракт	5	12,25		
Пептон	5	12,25		
Вода		1,45		
CaCO ₃	7,5	18,4	Б	1
Вода		1		
Всього: 2,45				

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 40 л

Для цієї стадії необхідно 22,5 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.2.1. Композиція А стерилізується у реакторі. Композиція Б стерилізується у автоклаві.

Таблиця 4.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 л ($K_3 = 0,65$)

Компонент	Вміст, г/л	Кількість компоненту для приготування 22,5 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції
Глюкоза	3	67,5	А	12,5
Дріжджовий екстракт	5	112,5		
Пептон	5	112,5		
Вода		12,5		
CaCO ₃	7,5	168,8	Б	10
Вода		10		
Всього: 22,5				

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 400 л

Для цієї стадії необхідно 210,6 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.2.1. Композиції А і Б стерилізується у реакторах.

Таблиця 4.4

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 400 л ($K_3 = 0,65$)

Компонент	Вміст, г/л	Кількість компоненту для приготування 210,6 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції
Глюкоза	3	631,8	А	110,6
Дріжджовий екстракт	5	1053		

Пептон	5	1053		
Вода		99,5		
Конденсат			11,1	
CaCO ₃	7,5	1474	В	100
Вода		490		
Конденсат			10	
Всього: 210,6 л				

4.2.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Для цієї стадії необхідно 1970,0 л поживного середовища, тому потреби у використанні установки безперервної стерилізації немає.

Таблиця 4.5

Композиції стерилізації компонентів для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 3,0 м³

Компонент	Вміст, г/л	Кількість компоненту для приготування 1970 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції
Глюкоза	3	5910	А	1500
Дріжджовий екстракт	5	9850		
Пептон	5	9850		
Вода		1350		
Конденсат			150	
CaCO ₃	7,5	11775	В	470
Вода		423		
Конденсат			47	
Всього: 1970				

4.3. Обґрунтування вибору розчинів/реактивів для регуляції рН

Оскільки культивування продуценту і біосинтез 2-кето-L-гулонової кислоти передбачає підтримку рН на рівні 7,0, то необхідна попередня підготовка титрувальних агентів, 6%-вих розчинів натрію гідроксиду та соляної кислоти. Розраховані дані щодо необхідних об'ємів розчинів NaOH та HCl наведено у табл. 4.6.

Таблиця 4.6

Розраховані об'єми та особливості приготування 6 % р-нів NaOH та HCl

Об'єм середовища, л	6% NaOH		6 % HCl	
	Об'єм, мл	Особливості приготування	Об'єм, мл	Особливості приготування
2,45	4,58	У колбі на 10 мл	4,58	У реакторі на 5 л
22,5	42,72	У колбі на 100 мл	42,72	
210,6	400,0	У колбі на 1 л	400,0	
1970	3750,0	У реакторі на 5 л	3750,0	

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає додаткову стадію з приготування та стерилізації 6% розчинів NaOH і HCl.

Крім того, необхідно передбачити реактори:

- для приготування та стерилізації композицій, об'ємами: 10 л, 2x20 л, 100 л, 200 л, і 2000 л;
- для приготування та стерилізації 6% розчинів NaOH і HCl, об'ємами: 2x5 л.

**РОЗДІЛ 5.
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА 2-КЕТО-L-ГУЛОНОВОЇ КИСЛОТИ (ПОПЕРЕДНИКА
ВІТАМІНУ С)**

Узагальнений перелік обладнання, використовуваного для біосинтезу 2-кетол-гулонової кислоти наведено у табл. 5.1. Відповідне обладнання представлено у графічній частині (апаратурна схема).

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування позиції	Кількість	Характеристика обладнання
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник Vinetti FDP-200. Виробник: Vinetti, Італія. Потужність: 840 м ³ /год [18].
Ф-2	Фільтр грубого очищення	1	Фільтр грубої очистки повітря Касетний фільтр Вентс ФБ (G4). Розміри: 400x200 мм. Максимальний тиск: до 12 бар [19].
К-3	Компресор стиснення	1	Компресор WALTER SKTG 11/500 SXP COMBO Продуктивність компресора: 1300-1700 л/хв. Тиск компресора: 13 бар. Споживана потужність: 11,0 кВт. Габарити: 1856x650x1651 мм [20].

					НУХТ БТЕК 05.01.14КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
Розроб.		Полуян Р.М.			РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА 2-КЕТО-L- ГУЛОНОВОЇ КИСЛОТИ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
Консульт.								
Керівник		Удимович В.М.				<i>Продовження табл. 5.1</i> Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

1	2	3	4
T-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник DAIKIN FDXM60F9/RXM60. Потужність: 6,0 кВт. Робочий діапазон: -10~+46°C. Габарити: 115x62x20 мм [21].
P-5	Ресивер	1	Ресивер повітряний RB495.600.01. Виробник: ООО "ЗЕО Лидер", Україна. Робочий тиск: 16 бар. Об'єм: 495 л. Робоча температура: 5.. +40 °С. Габарити: 775x616x2138 мм [22].
T-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник DAIKIN FDXM60F9/RXM60 Потужність: 7,0 кВт. Робочий діапазон: - 15~+18°C. Габарити: 115x62x20 мм [21].
Ф-7	Кишеньковий фільтр (F5-F6- F7-F9)	1	Кишеньковий фільтр ФВК. Виробник: ТОВ "ЗАВОД УКРМАШПРОМ", Україна. Кінцевий опір: 450 Па. Розміри: 592 x 592 x 600 мм [23]
I-9	Інокулятор	1	Інокулятор VLBIO-XGJ. Об'єм: 5 л. Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. В комплекті: барботер, датчики рН, рО ₂ і температури. Габаритні розміри: 150 x 310 мм. Вага: 15,5 кг [24].

Продовження табл. 5.1

1	2	3	4
ІФ-10, ІФ-22 ІФ-30, ІФ-31	Індивідуальний фільтр	4	Фільтр F-1 1/2-087-000. Виробник: Італія. Продуктивність: до 37000 л/хв. Робочий тиск: 14 бар. Діаметр пор: 4 мкм [25].
Д-8, Д-17, Д-19 Д-24, Д-27	Ваговий дозатор для компонентів середовища	6	Ваговий дозатор ФС-125. Виробник: Україна. Діапазон зважування: Межі зважування – 0.15-50 кг. Габарити: 1100 x 930 x 1785 мм. Продуктивність – 1.5 т/год. Обсяг накопичувального бункера – 125 л [26].
РЗ-18 РЗ-20	Реактор-змішувач для підготовки композиції А	1	Реактор змішувач РТ-20MDSS Об'єм: 20 L. Виробник: PROWIN TOOLS, Тайвань . Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Наявна пропелерна мішалка. Максимальний тиск: 4.1 бар. Габарити: 350 x 405 x 942 мм [27]
Н-21 Н-25	Насос для перекачування		Насос AODD BOXER 503 Виробник: Busto Arsizio, Італія. Продуктивність: 800,0 л / хв. Матеріал: AISI 304 нержавіюча сталь [28].
І-23	Інокулятор	1	Інокулятор Mobius® Виробник: Merchk. Об'єм: 40 л. Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. В комплекті: барботер, датчики рН, рО ₂ і температури. Габаритні

Продовження табл. 5.1

1	2	3	4
			розміри: 0,6 x 1,1 м. Вага: 15,5 кг [29]
P3-26	Реактор-змішувач для підготовки композиції А	1	Реактор-змішувач AiETLC1D1 Dual-Jacketed SR200f. Об'єм: 200L Виробник: AcrossInternational. USA. Матеріал корпусу: 316L нержавіюча сталь. Температурний режим роботи: -55°C to +250°C Розміри: 1120x820x2320 мм [30]
P3-28	Реактор-змішувач для підготовки композиції В	1	Реактор-змішувач PT-10ADSS Об'єм: 10 L. Виробник: PROWIN TOOLS, Тайвань . Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Наявна пропелерна мішалка. Максимальний тиск: 4.1 бар. Габарити: 290 м x 310 x 700 мм [31].
I-23	Інокулятор	1	Інокулятор АВЕС. Об'єм: 400 л. Виробник: TECOELEC. Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. В комплекті: барботер, датчики рН, рО ₂ і температури. Максимальний тиск: 60 psi. Габарити: 1.5 м x 1.8 м [32]
P3-12	Реактор-змішувач для підготовки композиції А	1	Реактор змішувач МК-FYF-2000 Об'єм: 2000 L. Виробник: Guangzhou Maikе Machinery Co., Ltd, Китай. Матеріал корпусу: 316L нержавіюча сталь. Потужність мотору: 5.5 КВт.

1	2	3	4
			Габарити: 1200 x 1300 x 1450 mm [33]
P3-14	Реактор-змішувач для підготовки композиції Б	1	Реактор змішувач SR100f Ai ETL C1D1 Dual-Jacketed 100L 316L-Grade SST Filter Reactor. Об'єм: 100L Виробник: AcrossInternational. USA. Матеріал корпусу: 316L нержавіюча сталь. Температурний режим роботи: -55°C to +250°C Розміри: 920x740x1150 мм [34]
Ф-32	Ферментер	1	Ферментер Yalian YMD 3000 L. Виробник: GUANGZHOUYALIANCOSMETICMACHINEEQUIPMENTSCO., LIMITED, Китай. Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. В комплекті: барботер, датчики рН, рО ₂ і температури. Максимальний тиск: 60 psi. Розміри: 1800×3600 мм[35]
P3-16	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації натрію гідроксиду (концентрація 6%)	1	Реактор-змішувач MedimexHLR-5. Об'єм: 5 л. Виробник: Medimex, Швейцарія. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Робочий тиск: 300 бар. Максимальна температура: 350 °С. Габарити: 0.6 м x 0.7 м [36]

Завершення табл. 5.1

1	2	3	4
P3-15	Реактор-змішувач для приготування соляної кислоти (концентрація 6%)	1	Реактор-змішувач MedimexHLR-5. Об'єм: 5 л. Виробник: Medimex, Швейцарія. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Робочий тиск: 300 бар. Максимальна температура: 350 °С. Габарити: 0.6 м x 0.7 м [30]
H-33	Насос для перекачування у збірник	1	Насос AODD BOXER 503 Виробник: Busto Arsizio, Італія. Продуктивність: 800,0 л / хв. Матеріал: AISI 304 нержавіюча сталь [34].

РОЗДІЛ 6.
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка стерильного аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря відбирають за допомогою повітрязабірника (ПЗ-1) у найвищій точці – на висоті 15 м (враховуючи висоту ферментера об'ємом 3 м³ –1,5 м, а також висоту поверху –6 м, косий дах будівлі ~1,5 м + 2-3 м від

найвищої точки будівлі)

ДР 1.2. Очистка повітря від грубих часток

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

ДР 1.3. Стиснення повітря

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

ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи

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

					НУХТ БТЕК 05.01.14КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Полуян Р.М.			РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Консульт.</i>								
<i>Керівник</i>		Удимович В.М.				Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		Стабніков В.П.						

ДР 1.5. Нагрівання повітря

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

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Нагріте повітря (від ДР 1.5) надходить до головного фільтра очистки (Ф-7), який ставлять біля ферментаційних відділень. На даному етапі ступінь очищення складає 95%.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

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

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних розчинів для контролю рН

ДР 2.1. Підготовка 6%-го розчину HCl

ДР 2.1.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища в інокуляторах об'ємом 4, 40, 400 л і ферментері на 3 м³

Для приготування 4197,3 мл 6% розчину HCl необхідно відміряти 680,64 мл 6% розчину HCl. У реактор-змішувач (РЗ-15) об'ємом 5 л наливають 3516,65 мл дистильованої води, попередньо відміряної за допомогою мірного циліндра, додають 680,64 мл 6% розчину HCl, 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 4 л.

Для приготування 4,58 мл 6% розчину NaOH необхідно зважити 0,27 г солі та розчинити у 4,58 мл дистильованої води, попередньо відміряної мірним циліндром, у колбі об'ємом 10 мл. Ретельно перемішати, простерилізувати в автоклаві за режиму 131 °С, 0,15 МПа впродовж 40 хв.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 40 л

Для приготування 42,72 мл 6% розчину NaOH необхідно зважити 2,56 г солі та розчинити у 42,72 мл дистильованої води, попередньо відміряної мірним циліндром, у колбі об'ємом 100 мл. Ретельно перемішати, простерилізувати в автоклаві за режиму 131 °С, 0,15 МПа впродовж 40 хв.

ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 400 л

Для приготування 400,0 мл 6% розчину NaOH необхідно зважити 24,0 г солі та розчинити у 400,0 мл дистильованої води, попередньо відміряної мірним циліндром, у колбі об'ємом 1 л. Ретельно перемішати, простерилізувати в автоклаві за режиму 131 °С, 0,15 МПа впродовж 40 хв.

ДР 2.2.4. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 3000 л

Для приготування 3750,0 мл 6% розчину NaOH необхідно зважити 225 г солі та розчинити у 3750 мл дистильованої води, попередньо відміряної мірним циліндром, у реакторі-змішувачі (РЗ-16) об'ємом 5 л. Ретельно перемішати, простерилізувати в автоклаві за режиму 131 °С, 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживних середовищ для культивування в колбах на качалках

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

0,75 г глюкози, 1,25 г дріжджового екстракту та 1,25 г пептону зважуються на технічних терезах. Наважки компонентів композиції А поміщають у колбу об'ємом 750 мл, додають воду в об'ємі 150,0 мл, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевым короком, та стерилізують у автоклаві при 112 °С, 0,05 МПа, впродовж 20–30 хв.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

1,9 г CaCO_3 зважуються на технічних терезах. Наважку компоненту композиції Б поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають воду в об'ємі 80 мл, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевым короком, та стерилізують у автоклаві при 131 °С, 0,15 МПа, протягом 40 хв.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для культивування в інокуляторі об'ємом 4 л

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

7,35 г глюкози, 12,25 г дріжджового екстракту та 12,25 г пептону зважуються на технічних терезах. Наважки компонентів композиції А поміщають у колбу об'ємом 3 л, додають воду в об'ємі 1,45 л, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевым короком та стерилізують у автоклаві при 112 °С 0,05 МПа, впродовж 20–30 хв.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

18,4 г CaCO_3 зважуються на технічних терезах. Наважку компоненту композиції Б поміщають у колбу об'ємом 2000 мл, додають воду в об'ємі 1000 мл, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевым короком, та стерилізують у автоклаві при 131 °С, 0,15 МПа, протягом 40 хв.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживних середовищ для культивування в інокуляторі об'ємом 40 л

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

67,5 г глюкози, 112,5 г дріжджового екстракту та 112,5 г пептону зважуються за допомогою дозатора (Д-17). Наважки компонентів композиції А поміщають у реактор-змішувач (РЗ-18) об'ємом 20 л, подають воду в об'ємі 12,5 л, вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізацію проводять при 112 °С, 0,05 МПа, впродовж 20–30 хв.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

168,8 г CaCO_3 зважуються на дозаторі Д-19. Наважку компоненту композиції Б поміщають у реактор-змішувач (РЗ-20) об'ємом 20 л, додають

воду в об'ємі 10 л, перемішують. Стерилізують при 131 °С, 0,15 МПа, протягом 40 хв.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживних середовищ для культивування в інокуляторі об'ємом 400 л

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

631,8г глюкози, 1,053 кг дріжджового екстракту та 1,053 кг пептону зважуються за допомогою дозатора (Д-24). Наважки компонентів композиції А поміщають у реактор-змішувач (РЗ-26) об'ємом 200 л, подають воду в об'ємі 99,5 л, вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізацію проводять при 112 °С, 0,05 МПа, впродовж 20–30 хв.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

500,0 г CaCO₃ зважуються дозатором (Д-27). Наважку компоненту композиції Б поміщають у реактор-змішувач (РЗ-28) об'ємом 10 л, додають за допомогою лічильника воду в об'ємі 90 л, вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізують при 131°С, 0,15 МПа, протягом 40 хв.

ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживних середовищ для культивування в ферментері об'ємом 3 м³

ДР 3.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

5,91 кг глюкози, 9,85 кг дріжджового екстракту та 9,85 кг пептону зважуються за допомогою вагового дозатору (Д-11). Наважки компонентів композиції А поміщають у реактор-змішувач (РЗ-12) об'ємом 2,0 м³, подають воду в об'ємі 900,0 л, вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізацію проводять при 112 °С, 0,05 МПа, впродовж 20–30 хв.

ДР 3.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б

11,775 кг CaCO₃ зважуються за допомогою вагового дозатору (Д-13). Наважку компоненту композиції В поміщають у реактор-змішувач (РЗ-14) об'ємом 500 л, подають воду в об'ємі 423 л, вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізацію проводять при 131 °С, 0,15 МПа, протягом 40 хв.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Erwinia herbicola* зберігають за температури 2-4 °С, пересіви колекційних культур здійснюються кожні 2-3 місяці у строго асептичних умовах.

ТП 4.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру розсівають на чашці Петрі до ізольованих колоній на середовищі 1038 та вирощують за температури 30 ° С протягом 48 год.

ТП 4.3. Вирощування посівного матеріалу в пробірках

Ізольовані колонії, які біли отримані на етапі ТП 4.2, пересівають петлею в пробірки із скошеним середовищем 1038. Вирощують за температури 30 °С протягом 48 год.

ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

У колбу зливають розчини композицій від ДР 3.1.1 (Композиція А), ДР 3.1.2 (Композиція Б). Поживне середовище перемішують та розливають по качалочних колбам. У пробірку із робочою культурою від ТП 4.3 вносять 5 мл фізіологічного розчину змиваючи культуру, та стерильною піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію. Бактеріальну суспензію вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Умови культивування – 30 °С, 150 об/хв, рН 7, протягом 20 годин.

ТП 4.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 4 л

В інокулятор (І-9) подається композиція А від ДР 3.2.1, композиція Б від ДР 3.2.2. Вмикається перемішувачий пристрій інокулятору.

Подається посівний матеріал із засівної колби від ТП 4.4, дотримуючись правил асептики. Подають 6%-й розчин HCl від ДР 2.1.1 та 6%-й розчин NaOH від 2.2.1, для корегування рН на рівні 7. Умови культивування – 30 °С, 150 об/хв, протягом 20 годин.

ТП 4.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 40 л

В інокулятор (І-23) подається композиція А від ДР 3.3.1, композиція Б від ДР 3.3.2. Вмикається перемішуючий пристрій інокулятора. Подається посівний матеріал від ТП 4.5 за допомогою труби перетискування. Подають 6%-й розчин HCl від ДР 2.1.1 та 6%-й розчин NaOH від 2.2.2, для корегування рН на рівні 7. Умови культивування – 30 °С, 150 об/хв, протягом 20 годин.

ТП 4.7. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 400 л

В інокулятор (І-29) подається композиція А від ДР 3.4.1, композиція Б від ДР 3.4.2. Вмикається перемішуючий пристрій інокулятора. Подається посівний матеріал від ТП 4.6 за допомогою труби перетискування. Подають 6%-й розчин HCl від ДР 2.1.1 та 6%-й розчин NaOH від 2.2.3, для корегування рН на рівні 7.

Умови культивування – 30 °С, 150 об/хв, протягом 48 годин.

ТП 5. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 3 м³

В ферментер (Ф-32) подається композиція А від ДР 3.5.1, композиція Б від ДР 3.5.2. Вмикається перемішуючий пристрій. Подається посівний матеріал від ТП 4.7 за допомогою труби перетискування. Подають 6%-й розчин HCl від ДР 2.1.1 та 6%-й розчин NaOH від 2.2.4, для корегування рН на рівні 7,0 (за потреби). Умови культивування – 30 °С, 150 об/хв, протягом 48 годин. Проводиться контроль концентрації цільового продукту, вуглецю та азоту. Мікробіологічний контроль здійснюється з періодичністю у декілька годин. Культивування зупиняють після досягнення концентрації 2-кето-L-гулонової кислоти 1 г/л у культуральній рідині.

РОЗДІЛ 7.
КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль передбачається для перевірки стерильності поживних середовищ, оскільки вони будуть використовуватися для культивування обраного біологічного агента та не мають містити сторонньої мікрофлори, та для контролю мікробіологічної чистоти культурального середовища, яке протягом усього процесу культивування має містити лише клітини *Erwinia herbicola* ATCC 21998.

Контроль стерильності поживних середовищ. Зразок поживного середовища, що буде використовуватися для культивування *Erwinia herbicola* ATCC 21998, висівають на поживні середовища для виявлення бактерій (МПА) та для виявлення грибів (сусло-агар). При відсутності росту робиться висновок, що середовище є стерильним.

Висів на МПА/сусло-агар. Зразок поживного середовища вносять у чашку Петрі із МПА/сусло-агаром, розподіляючи його по поверхні шпателем Дригальського. Засіяні чашки Петрі позначають і розміщують у термостаті при температурі 25-30 °С на 3-5 діб. Облік кількості колоній проводять на 3-4 день. Вивчають культуральні та морфологічні ознаки мікроорганізмів і роблять відповідні висновки про забруднення зразку середовища.

					НУХТ БТЕК 05.01.14КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Полуян Р.М.			РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушіє
Консульт.								
Керівник		Удимович В.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

Контроль мікробіологічної чистоти. Для перевірки зразку культуральної рідини необхідно приготувати препарат «роздавлена крапля»:

1. На чисте предметне скло нанести краплю води.
2. Прожареною і охолодженою петлею взяти досліджуваний матеріал і розподілити його рівномірно в краплі води.
3. На краплю суспензії покласти чисте покривне скло так, щоб під ним не було пухирців повітря. Надлишок рідини відтягнути смужкою фільтрувального паперу.
4. Розглянути препарат при збільшенні об'єктива 40х. Якщо препарат розглядають в імерсійній системі, на покривне скло наносять краплю кедрової олії чи гліцерину.

У зразку мають бути присутні лише клітини бактерії *Erwinia herbicola* ATCC 21998, морфологічна характеристика яких наведена у розділі 3.2 [37, 38].

7.2. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю

Пробу культуральної рідини об'ємом 5 мл, піддавали центрифугуванню при 5000об/хв при 4°C протягом 5 хв. Отриманий об'єм супернатанту використовували для подальшого визначення концентрації глюкози і сечовини/кукурудзи і дріжджового екстрактів.

Визначення концентрації глюкози. D-глюкозу кількісно визначали за допомогою ВЕРХ за допомогою колонки з органічною кислотою 300 × 8 мм (CSChromatographie, Langerwehe, Німеччина) при 40°C із використанням ізократичного елюювання 0,1 М H₂SO₄ зі швидкістю потоку 0,5 мл хв⁻¹. D-глюкозу виявляли за допомогою показника заломлення (Agilent, Санта-Клара, Каліфорнія, США), а концентрації визначали шляхом калібрування із зовнішніми стандартами [39].

Визначення концентрації пептону і дріжджового екстракту. Принцип методу Кьельдаля: збродження зразків здійснюється концентрованою сірчаною кислотою з використанням сульфату міді (II) як каталізатора, за допомогою чого органічна речовина окислюється до вугільної кислоти. Азот, який виділяється у формі амонію, утворює сульфат амонію з сірчаною кислотою. Внаслідок розкладання будь-який азот у їжі (окрім того, що знаходиться у формі нітратів або нітритів) перетворюється на аміак, а інші органічні речовини — на CO₂ та H₂O. Газоподібний аміак не виділяється в кислотному розчині, оскільки аміак знаходиться у формі іона амонію (NH₄⁺), який зв'язується з сульфат-іоном (SO₄²⁻) і таким чином залишається в розчині: N (зразок) → (NH₄)₂SO₄.

Розкладання: Органічна речовина + H₂SO₄ → CO₂ + H₂O + (NH₄)₂SO₄ + SO₂

Під впливом підстави на утворений сульфат амонію виділяється аміак, який переганяється в надлишок розчину борної кислоти відомої молярності з наступним титруванням соляною кислотою, яка використовується для визначення зв'язаного з борною кислотою аміаку. Розчин у колбі для збродження потім підлужують шляхом додавання гідроксиду натрію, який перетворює сульфат амонію в газоподібний аміак:

Нейтралізація: (NH₄)₂SO₄ + 2 NaOH → 2NH₃ + 2H₂O + Na₂SO₄

Газоподібний аміак, який утворюється, вивільняється з розчину та переміщується з колби для варіння в приймальну колбу, яка містить надлишок борної кислоти. Низький рН розчину в приймальній колбі перетворює газоподібний аміак на іон амонію та одночасно перетворює борну кислоту на боратний іон:

NH₃ + H₃BO₃ (борна кислота) → NH₄⁺ + H₂BO₃⁻ (борат іон)

Вміст азоту потім оцінюють шляхом титрування утвореного борату амонію стандартною сірчаною або соляною кислотою, використовуючи відповідний індикатор для визначення кінцевої точки реакції.

Титрування: $\text{H}_2\text{BO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_3\text{BO}_3$

Після визначення вмісту азоту його перетворюють на вміст білка з використанням відповідного коефіцієнта перетворення: Білок [%] = 6,25 x N [%] [40].

7.3. Визначення концентрації 2-кетогулонової кислоти (попередника вітаміну С)

Доволі часто з метою аналізу та визначення 2-кетогулонової кислоти як попередника вітаміну С пропонується використовувати капілярний зонний електрофорез або ж більш поширений метод високоефективної рідинної хроматографії. Капілярний зонний електрофорез та високоефективна рідинна хроматографія попри перевагу точності у визначенні 2-кетогулонової кислоти мають і ряд недоліків серед яких складний процес налаштування обладнання, закупівлі витратних матеріалів, підтримання вірного налаштування працездатності та пробопідготовки досліджуваного зразку.

Зважаючи на це пропонується використовувати метод хемілюмінесценції. Наведений аналітичний метод хемілюмінесценції має високу чутливість та є відносно дешевим і простим у реалізації. Окрім цього для покращення визначення 2-кетогулонової кислоти пропонується при проведенні хемілюмінесценції додавати родамін Б і перманганат калію.

Для проведення дослідження передбачається використовувати HCl , HNO_3 , H_2SO_4 , H_3PO_4 , оцтову кислоту та інші реактиви аналітичної якості. Реактиви необхідно готувати у дистильованій воді без додаткової фільтрації і очищення. Для належного проведення дослідження реактиви повинні бути свіжоприготовленими перед початком дослідження і виявлення 2-кетогулонової кислоти.

Проточну інжекційну хемілюмінесценцію пропонується проводити за допомогою системи хемілюмінесцентного аналізу потоку інжекції IFFL-D (Xi'an Ruike Electronic equipment Corporate, Сіань, Китай).

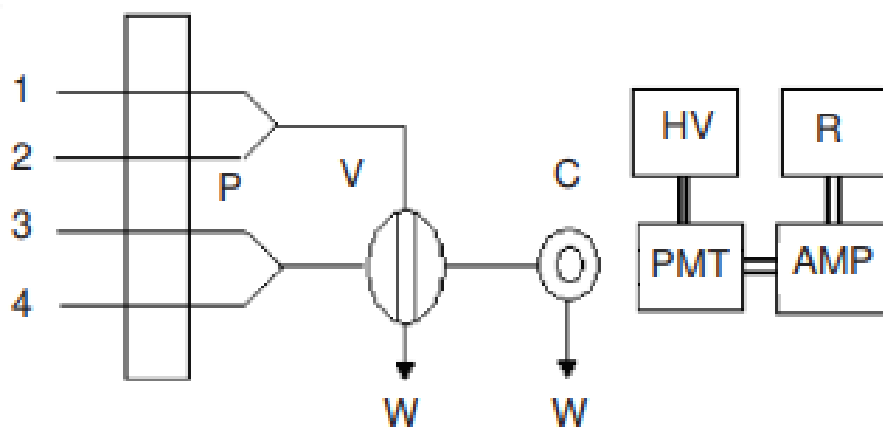


Рис.7.1. Принципова схема аналізатора системи хемілюмінесцентного аналізу потоку інжекції IFFL-D. Принцип роботи: аналізатор системи передбачається наявністю двох насосів перистальтичного типу (швидкість подачі до 25 об/хв). Відповідно маючи два канали подачі компонентів по одному відбувається подача готового розчину H_2SO_4 і розчину родамину Б, по іншому каналу відбувається поступова подача розчину $KMnO_4$, досліджуваного розчину зразків і води.

Приготування зразків для роботи передбачає підготовку стандартного розчину 2-кет-*L*-гулонової кислоти (розчинення 50 мг 2-кет-*L*-гулонової кислоти в мірній колбі на 50 мл з доведенням водою до об'єму); досліджуваний розчин культуральної рідини змішують з $ZnSO_4$ (72.0 mg mL^{-1}) та $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ (36.0 mg mL^{-1}) за пропорцією 1:1:1 (об/об/об) і центрифугують протягом 10 хв при 13000 об/хв. Отриманий зразок пропонується фільтрувати через мембрану Millipore діаметром пор 0,45 мкм з розведенням водою утричі. При проведенні дослідження оптимальною концентрацією розчину H_2SO_4 , як носія, повинна становити 1,6 моль $л^{-1}$ при

допустимих межах від 1,0 до 2,0 моль л⁻¹. Це важливо оскільки концентрація розчину H₂SO₄ впливає на інтенсивність випромінювання при хемілюмінесценції. Оптимальна ж концентрація розчину KMnO₄, який необхідний для створення реакції з родаміном Б, при проведенні дослідження повинна становити 8,0 × 10⁻⁴ моль л⁻¹. Оптимальне значення родаміну Б, який при наявності розчину KMnO₄, вступає у взаємозв'язок для подальшої детекції і виявлення концентрації 2-кето-L-гулонової кислоти, повинен становити 4×10⁻⁴ моль л⁻¹, але не обмежується цим. При збільшенні концентрації розчину родаміну Б інтенсивність хемілюмінесценції збільшується (без змін концентрації інших компонентів), але заявлене значення є оптимальним та економічно виправданим [34].

7.4. Визначення концентрації біомаси

Зважаючи на склад поживного середовища, а також цільовий продукт біосинтезу у вигляді 2-кето-L-гулонової кислоти (попередник вітаміну С) застосування електрохімічних методів аналізу або ж оптико-спектральних методів аналізу на кшталт спектрофотометрії не є можливим. Тому найбільш оптимальним рішенням для визначення концентрації біомаси при біосинтезі 2-кето-L-гулонової кислоти за допомогою *Erwinia herbicola* ATCC 21998 є використання вагового методу . Суть методу полягає в відборі культуральної, її подальшому фільтруванні через фільтр який до цього був висушений у сухожаровій шафі до постійної маси при температурі 160°C протягом 1 години. Різниця ваги фільтру паперового до і після дає змогу отримати дані для формування даних і співставлення до кривої росту культури.

Дані щодо проведення постадійного контролю виробництва 2-кето-L-гулонової кислоти *Erwinia herbicola* наведено у табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Номер та назва контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, який визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Значення показника
Кт 1.1 <i>Забір атмосферного повітря</i>	Повітрязбірник Висота забору повітря	-	Під час купівлі та при встановленні	H = 15м
Кт 1.2. <i>Попереднє очищення повітря</i>	Відсоток очищення повітря від часток; Температура; Тиск.	Манометр; Термометр; Мікробіологічний контроль.	Після очищення повітря у фільтрі	E = 80-90%;
Кт 1.3. <i>Стиснення повітря</i>	Відсоток очищення повітря від часток; Температура; Тиск.	Манометр; Термометр; Мікробіологічний контроль.	Після стиснення повітря.	120-180 °С; Тиск = 0,35-0,5 МПа;
Кт 1.4. <i>Охолодження та видалення зайвої вологи</i>	Температура; Вологість.	Термометр; Гігрометр.	Після охолодження повітря.	20-40 °С; Вологість = 40%
Кт 1.5. <i>Підігрів повітря</i>	Температура; Вологість.	Термометр; Гігрометр.	Після нагрівання повітря.	60 °С;

Кт 1.6. Стерилізація повітря у головних фільтрах	Відсоток очищення повітря від часток; Температура; Тиск.	Манометр; Термометр; Мікробіологічний контроль.	Після очищення повітря у фільтрі	E = 90-98%;
Кт 1.7. Стерилізація повітря в індивідуальних фільтрах	Відсоток очищення повітря від часток; Температура; Тиск.	Манометр; Термометр; Мікробіологічний контроль.	Після очищення повітря у фільтрі	E = 99,999%;
Кт, Км, Кх 2.1. Приготування 6% розчину HCl для кожного етапу культивування	Розчин HCl; Температура; Тиск; Час; Концентрація; Мікробіологічна чистота.	Термометр; Манометр; Годинник; Мікробіологічний контроль.	Концентрацію розчину контролюють під час його приготування, зважуванням необхідної кількості реактивів; Протягом стерилізації розчину HCl контролюється температура та тиск, час за який проходить стерилізація; Мікробіологічний контроль розчину HCl відбувається після стерилізації.	131 °C, 0,15 МПа, протягом 40 хв;
Кт, Км, Кх 2.2. Приготування 6% розчину KOH для кожного етапу культивування	Розчин KOH; Температура; Тиск; Час; Концентрація;	Термометр; Манометр; Годинник; Мікробіологічний контроль.	Концентрацію розчину контролюють під час його приготування, зважуванням необхідної кількості реактивів; Протягом стерилізації розчину KOH контролюється температура	131 °C, 0,15 МПа, протягом 40 хв;

	Мікробіологічна чистота.		та тиск, час за який проходить стерилізація; Мікробіологічний контроль розчину КОН відбувається після стерилізації.	
Кт, Км 3.1.1. <i>Приготування та стерилізація композиції А</i>	Композиція А; Температура; Тиск; Час; Мікробіологічна чистота.	Термометр; Манометр; Годинник; Мікробіологічний контроль.	Протягом стерилізації контролюється температура та тиск, час за який проходить стерилізація; Мікробіологічний контроль розчину відбувається після стерилізації.	112 °С, 0,5 МПа, протягом 20-30 хв;
Кт, Км 3.1.2. <i>Приготування та стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б; Температура; Тиск; Час; Мікробіологічна чистота.	Термометр; Манометр; Годинник; Мікробіологічний контроль.	Протягом стерилізації контролюється температура та тиск, час за який проходить стерилізація; Мікробіологічний контроль розчину відбувається після стерилізації.	131 °С, 0,15 МПа, протягом 40 хв;
Кт, Км 3.2.1. <i>Приготування та стерилізація композиції А</i>	Композиція А; Температура; Тиск; Час; Мікробіологічна чистота.	Термометр; Манометр; Годинник; Мікробіологічний контроль.	Протягом стерилізації контролюється температура та тиск, час за який проходить стерилізація; Мікробіологічний контроль розчину відбувається після стерилізації.	112 °С, 0,5 МПа, протягом 20-30 хв;

Кт, Км 3.2.2. <i>Приготування та стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б; Температура; Тиск; Час; Мікробіологічна чистота.	Термометр; Манометр; Годинник; Мікробіологічний контроль.	Протягом стерилізації контролюється температура та тиск, час за який проходить стерилізація; Мікробіологічний контроль розчину відбувається після стерилізації.	131 °С, 0,15 МПа, протягом 40 хв;
Кт, Км 3.3.1. <i>Приготування та стерилізація композиції А</i>	Композиція А; Температура; Тиск; Час; Мікробіологічна чистота.	Термометр; Манометр; Годинник; Мікробіологічний контроль.	Протягом стерилізації контролюється температура та тиск, час за який проходить стерилізація; Мікробіологічний контроль розчину відбувається після стерилізації.	112 °С, 0,5 МПа, протягом 20-30 хв;
Кт, Км 3.3.2. <i>Приготування та стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б; Температура; Тиск; Час; Мікробіологічна чистота.	Термометр; Манометр; Годинник; Мікробіологічний контроль.	Протягом стерилізації контролюється температура та тиск, час за який проходить стерилізація; Мікробіологічний контроль розчину відбувається після стерилізації.	131 °С, 0,15 МПа, протягом 40 хв;
Кт, Км 3.4.1. <i>Приготування та стерилізація композиції А</i>	Композиція А; Температура; Тиск;	Термометр; Манометр; Годинник;	Протягом стерилізації контролюється температура та тиск, час за який проходить стерилізація;	112 °С, 0,5 МПа, протягом 20-30 хв;

Продовження табл.7.1.

	Час; Мікробіологічна чистота.	Мікробіологічний контроль.	Мікробіологічний контроль розчину відбувається після стерилізації.	
Кт, Км 3.4.2. <i>Приготування та стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б; Температура; Тиск; Час; Мікробіологічна чистота.	Термометр; Манометр; Годинник; Мікробіологічний контроль.	Протягом стерилізації контролюється температура та тиск, час за який проходить стерилізація; Мікробіологічний контроль розчину відбувається після стерилізації.	131 °С, 0,15 МПа, протягом 40 хв;
Кт, Км 4.1. <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>Erwinia herbicola</i> ; Температура; Час; Відсутність сторонніх мікроорганізмів та контамінантів.	Термометр; Годинник; Мікробіологічний контроль.	Протягом зберігання колекційної культури <i>Erwinia herbicola</i> контролюють та підтримують температуру та час зберігання зразків. Мікробіологічний контроль здійснюють кожні 2-3 місяці.	2-4 °С, пересів кожні 2-3 місяці; Відсутність сторонніх мікроорганізмів
Кт, Км 4.2. <i>Одержання робочої культури на агаризованих середовищах</i>	Культура <i>Erwinia herbicola</i> ; Температура; Час; Відсутність сторонніх мікроорганізмів та контамінантів.	Термометр; Годинник; Мікробіологічний контроль.	Протягом культивування <i>Erwinia herbicola</i> контролюють та підтримують температуру та час, протягом якого проходить культивування; Мікробіологічний контроль після культивування.	30 °С, рН 7, протягом 20 годин; Відсутність сторонніх мікроорганізмів;

<p>Кт, Км 4.3. Вирощування посівного матеріалу в пробірках</p>	<p>Культура <i>Erwinia herbicola</i>; Температура; Час; Відсутність сторонніх мікроорганізмів та контамінантів.</p>	<p>Термометр; Годинник; Мікробіологічний контроль.</p>	<p>Протягом культивування <i>Erwinia herbicola</i> контролюють та підтримують температуру та час, протягом якого проходить культивування; Мікробіологічний контроль після культивування.</p>	<p>30 °С, рН 7, протягом 20 годин; Відсутність сторонніх мікроорганізмів;</p>
<p>Кт, Км 4.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках</p>	<p>Посівний матеріал <i>Erwinia herbicola</i>; Температура; Час; Швидкість обертів; рН; Відсутність сторонніх мікроорганізмів та контамінантів.</p>	<p>Термометр; Годинник; Тахометр; рН-метр; Мікробіологічний контроль.</p>	<p>Протягом культивування <i>Erwinia herbicola</i> контролюють та підтримують температуру, рН, швидкість обертів та час, протягом якого проходить культивування Мікробіологічний контроль після культивування</p>	<p>30 °С, 180 rpm, рН 7, протягом 20 годин; Відсутність сторонніх мікроорганізмів;</p>
<p>Кт, Км 4.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 40 л</p>	<p>Посівний матеріал <i>Erwinia herbicola</i>; Поживне середовище; Температура; Час; Швидкість обертів; рН; Подача повітря; Відсутність сторонніх мікроорганізмів та контамінантів.</p>	<p>Термометр; Годинник; Тахометр; рН-метр; Мікробіологічний контроль.</p>	<p>Протягом культивування <i>Erwinia herbicola</i> контролюють та підтримують температуру, рН, швидкість обертів та час, протягом якого проходить культивування; Мікробіологічний контроль після культивування</p>	<p>30 °С, 180 rpm, рН 7, протягом 20 годин; Відсутність сторонніх мікроорганізмів;</p>

<p>Кт, Км 4.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 400 л</p>	<p>Посівний матеріал <i>Erwinia herbicola</i>; Поживне середовище; Температура; Час; Швидкість обертів; рН; Подача повітря; Відсутність сторонніх мікроорганізмів та контамінантів.</p>	<p>Термометр; Годинник; Тахометр; рН-метр; Мікробіологічний контроль.</p>	<p>Протягом культивування <i>Erwinia herbicola</i> контролюють та підтримують температуру, рН, швидкість обертів та час, протягом якого проходить культивування; Мікробіологічний контроль після культивування</p>	<p>30 °С, 180 rpm, рН 7, протягом 20 годин; Відсутність сторонніх мікроорганізмів;</p>
<p>Кт, Км, Кх 5. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 3 м³</p>	<p>Культуральна рідина; Поживне середовище; Температура; Час; Швидкість обертів; рН; Подача повітря; Концентрація цільового продукту; Відсутність сторонніх мікроорганізмів та контамінантів.</p>	<p>Термометр; Годинник; Тахометр; рН-метр; Мікробіологічний контроль.</p>	<p>Протягом культивування <i>Erwinia herbicola</i> контролюють та підтримують температуру, рН, швидкість обертів та час, протягом якого проходить культивування; Мікробіологічний контроль кожні 4 години протягом культивування; Мікроскопіювання під час вирощування культури у ферментері; Після культивування визначають концентрацію цільового продукту.</p>	<p>30 °С, 180 rpm, рН 7, протягом 20 годин; С вітамін С = 1,32 г/л; Відсутність сторонніх мікроорганізмів;</p>

**РОЗДІЛ 8.
ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ**

8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва 2-кето-L-гулонової кислоти як попередника вітаміну С на наявність твердоподібних, рідкоподібних та газоподібних відходів

Виробництво 2-кето-L-гулонової кислоти як попередника для подальшої трансформації до вітаміну С штамом *Erwinia herbicola* ATCC 21998 повинна передбачати такі етапи та/і стадії: допоміжні стадії: 1) підготовка мийних та миючих, а також різноманітних та затребуваних дезінфікуючих препаратів та/і розчинів; 2) підготовка, приготування та (за потреби) стерилізація розчинів титруючих компонентів/агентів; 3) відважування, перевірка, підготовка з подальшою стерилізацією компонентів композицій поживних середовищ з подальшим накопиченням посівного матеріалу (інокуляту); технологічні стадії дільниці: 1) накопичення та контроль посівного матеріалу (інокуляту); 2) виробничий біосинтез 2-кето-L-гулонової кислоти як попередника для подальшої трансформації до вітаміну С з подальшим зберіганням культуральної по завершенню процесу.

8.2. Шляхи та попередні перспективи впровадження систем екологічного забезпечення виробництва 2-кето-L-гулонової кислоти як попередника вітаміну С

8.2.1. Система мінімізації та утилізації рідкоподібних відходів

При виробництві під час використання *Erwinia herbicola* ATCC 21998 передбачається утворення різноманітних рідких та рідкоподібних відходів.

Одними з таких є утворення промивних вод при митті і підготовці обладнання, лінії підготовки повітря, на всіх можливих стадіях накопичення і отримання посівного матеріалу (інокуляту), підготовці компонентів відповідних композицій поживного середовища, а також при проведенні виробничого біосинтезу. Окремими також можна назвати і етапи підготовки мийних та миючих, а також різноманітних та затребуваних дезінфікуючих препаратів та/і розчинів та титруючих компонентів/агентів [42].

					НУХТ БТЕК 05.01.14КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Полуян Р.М.			РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ		
Консульт.							
Керівник		Удимович В.М.					
Н. Контр.							
Зав. каф.		Стабніков В.П.					
					Літ.	Арк.	Акрушіє
					Кафедра БТМ		

Одним із способів проведення очищення таких відходів можна вважати встановлення різноманітних очисних споруд. Як пропозицію можна впровадити і встановити очисну споруду «ОСК-60» продуктивністю до 60 м³ на добу.

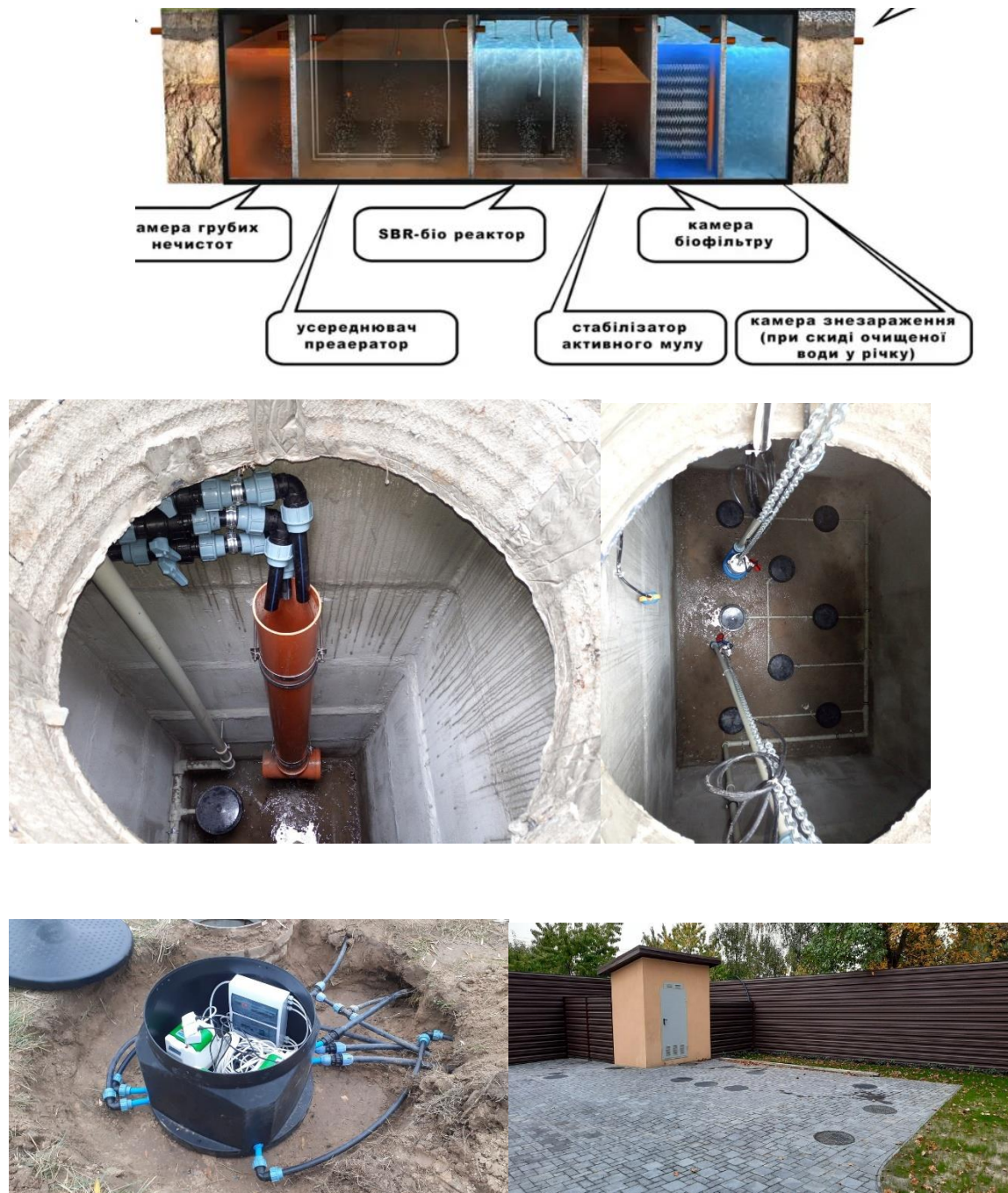


Рис.8.1. Елементи системи очисної споруди «ОСК-60» [42]

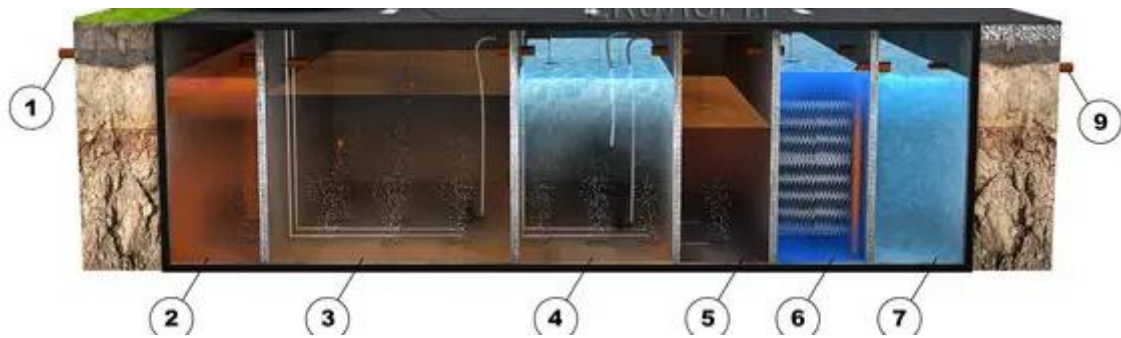


Рис.2. Схема та принцип роботи станції повної біологічної очистки "ОСК":

Схема проведення очищення вод передбачає як механічну, так і біологічну частину очистки; вхід води (поз. 1); камера затримання грубого сміття (поз. 2); преаератор-деструктор (поз. 3); (SBR-реактор) аеротенки циклічної дії (поз. 4.); стабілізатор активного мулу (поз. 5); камера біофільтру (поз. 6); камера знезараження (поз. 7); технологічне приміщення з контрольним обладнанням (поз. 8); перелив очищеної води до дренажу (поз. 9).

Головним елементом системи є послідовно-циклічний реактор (SBR-реактор).

У системі послідовно-циклічного реактора передбачено наступні шість етапів для очищення:

- Стічні води надходять до камери первинного очищення, де відбувається очищення води від твердих речовин.
- Потім стічні води переміщуються до другої камери, яка є резервуаром послідовно-циклічного реактора.
- Наступним третім етапом є аерація, де саме і утворюється активний мул, з бактерії для очищати стічних вод.
- Подальшою відбувається стадія спокою, де активний мул опускається на дно елементу системи, а очищена вода знаходиться у верхній частині резервуара реактора.

- Очищені стічні води подаються в систему відведення або в систему ґрунтових вод.
- Активний мул повертається з резервуара реактора в першу камеру, де процес починається в новому циклі[43].

8.2.2. Система мінімізації та утилізації твердоподібних відходів

При виробництві під час використання *Erwinia herbicola* АТСС 21998 передбачається утворення різноманітних твердих та твердоподібних відходів. Одними з таких є різноманітне упакування компонентів, яке утворюється при митті і підготовці обладнання, повітря, на стадіях накопичення і отримання посівного матеріалу (інокуляту), підготовці компонентів відповідних композицій поживного середовища, а також при проведенні виробничого біосинтезу. Окремими також можна назвати і етапи підготовки мийних та миючих, а також різноманітних та затребуваних дезінфікуючих препаратів та/і розчинів та титруючих компонентів/агентів.

Зазвичай це транспортне пакування (як індивідуальне, так і блокове) паперового походження, поліетиленового або є металевого типу. Зазвичай зустрічається комбінування елементів пакування (паперово-картонажні зовнішні пакування, які всередині містять поліетиленовий контур для зберігання сипких компонентів).

Таблиця 8.1.

Тверді відходи, що утворюються при виробництві 2-кетогулулової кислоти як попередника вітаміну С

Назва твердих відходів	Тип відходу	Потенційна кількість, кг	Клас небезпек
Пластикова тара від мийних та/і дезінфікуючих речовин/засобів	Поліпропілен	0,5	IV
Пакування елементів	Поліетилен	0,5	IV

поживного середовища			
Пакування фільтруючих елементів підготовки повітря	Поліетилен/папір	0,3	IV

Найдієвішим способом боротьби з твердоподібними відходами є сортування накопиченого паперу, пластику/поліетилену, металу або ж скла в окремі контейнери з подальшою передачею відповідно до двосторонньої угоди на відповідне підприємство очищення/утилізації.

8.2.3. Система знешкодження газоподібних відходів

При виробництві під час використання *Erwinia herbicola* ATCC 21998 передбачається утворення різноманітних газоподібних відходів, оскільки при культивуванні на постійній основі подається аераційне повітря.

Найбільш дієвим способом очищення в такому випадку повітря, що виходить з ферментера є використання скрубєрів. Скрубєром є обладнання, в якому для відділення дисперсних або газоподібних домішок від газу використовується рідина.

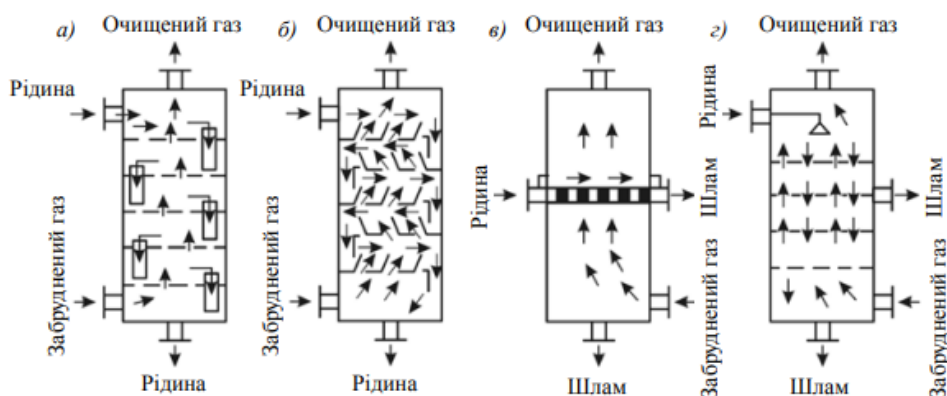


Рис. 21. Типи тарічастих скрубєрів: *a* — з тарілками з перехресною течією; *б* — з рухом газу і рідини в одному напрямку; *в* — пінний; *г* — з провальними тарілками

Для очищення на виробництві пропонується використовувати барботажні скрубєри. Вони є високоефективними, і дають змогу з

достатньою швидкістю очищувати повітря, що відводиться з виробничого ферментера [44].

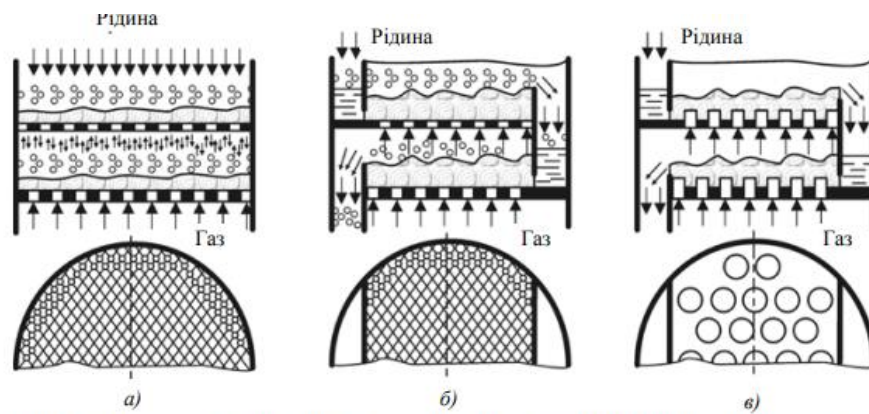


Рис. 22. Конструкції тарілок: *а* — провальні; *б* — сітчасті переточні; *в* — клапанні

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ (СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ)

1. Stephen Anderson, Cara Berman Marks, Robert Lazarus Jeffrey Milleret all. (1985) Production of 2-Keto-L-Gulonate, an Intermediate in L-Ascorbate Synthesis, by a Genetically Modified *Erwinia herbicola*. *Science*, 230, pp. 144 – 149.
2. Hoang B. X., Shaw G., Fang W., Han B.(2020) Possible application of high-dose vitamin C in the prevention and therapy of coronavirus infection. *J Glob Antimicrob Resist.*, 23:256-262. doi: 10.1016/j.jgar.2020.09.025.
3. Державний реєстр лікарських засобів України. Вітамін С. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=%E2%B3%E0%EC%B3%ED%20%D1>
4. Vitamin C. Wikipedia, the free encyclopedia. [Електронний ресурс]. Режим доступу:https://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C
5. Schlueter, A. K., & Johnston, C. S. (2011) Vitamin C: Overview and Update. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 16(1), 49–57. [Електронний ресурс]. Режим доступу: doi:10.1177/1533210110392951
6. Chambial, S., Dwivedi, S., Shukla, K. K., John, P. J., & Sharma, P. (2013)Vitamin C in Disease Prevention and Cure: An Overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 28(4), pp. 314–328.[Електронний ресурс]. Режим доступу:doi:10.1007/s12291-013-0375-3
7. Jingwen Zhou , Guocheng Du, Jian Chen. (2012) Metabolic Engineering of Microorganisms for Vitamin C Production. *Reprogramming Microbial Metabolic Pathways*. 12, p.241-261. [Електронний ресурс]. Режим доступу: 10.1007/978-94-007-5055-5
8. Sugisawa, T., Miyazaki, T., & Hoshino, T. (2005) Microbial Production of L-Ascorbic Acid from D-Sorbitol, L-Sorbose, L-Gulose, and L-Sorbosone by *Ketogulonicigenium vulgare* DSM 4025. *Bioscience, Biotechnology, and*

- Biochemistry*. 69(3), pp. 659–662. [Електронний ресурс]. Режим доступу: doi:10.1271/bbb.69.659
9. Robert A. Lazarus, Jana L. Seymour, R. Kevin Stafford, et. al. (1990) Metabolic Pathway Engineering of *Erwinia herbicola*. A Biocatalytic Approach to Vitamin C Production. *Van nostrand reinhold catalysis series*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: DOI: [10.1126/science.230.4722.14](https://doi.org/10.1126/science.230.4722.14)
10. Mengyu Zhou, Yanhui Bi, Mingzhu Ding, et al. (2021) One-Step Biosynthesis of Vitamin C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*. 12, pp. 1-11. [Електронний ресурс]. Режим доступу: doi: [10.3389/fmicb.2021.643472](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643472)
11. Yong-Sheng Tian, Yong-Dong Deng, Wen-Hui Zhang, et al. (2022) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of vitamin C from D-glucose. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 15(86), pp. 1-13. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02184-0>
12. Іваниця Т.В., Страшнова І.В., Смальчук Д.С. (2018) Загальна характеристика бактерій роду *Pantoea*. *Мікробіологія і біотехнологія*, 3, с.6-25. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.3\(43\).142584](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.3(43).142584)
13. *Erwinia herbicola*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.gbif.org/uk/species/3222021>
14. Державна служба статистики України. Демографічна та соціальна статистика / Населення та міграція. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ukrstat.gov.ua/>
15. Чисельність дітей та молоді в Україні. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://inmol.org/chyselnist-ditej-ta-molodi-v-ukraini/>
16. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.
17. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К. :НУХТ, 2009. – 336 с.

18. Повітрязабірник Binetti FDP-200. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://vencon.ua/ua/products/binetti-fdp-200>
19. Касетний фільтр Вентс ФБ 400x200. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://vents-shop.com.ua/kasetniy-fltr-vents-fb-400-200-uk/>
20. Гвинтовий компресор WALTER SKTG 11/500 SXP COMBO [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kma.ua/uk/reminnogo-privodu-/4032-gvintovij-kompresor-z-reminnim-privodom-walter-sktg-11500-sxp-combo.html>
21. Daikin FDXM60F9/RXM60.[Електронний ресурс] – режим доступу: <https://daikin-market.kiev.ua/ua/daikin-fdxm60f9rxm60.html>
22. Ресивер повітряний РВ495.600.01 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tusk.ua/ua/product/resiver-vozdushnyij-lider-16-bar-495-l-rv49560001-dlya-kompressora/>
23. Кишений фільтр (F5-F6-F7-F9) [Електронний ресурс] – режим доступу:<https://www.mashprom.com.ua/%D1%84%D0%B2%D0%BA-%D0%BA%D0%B0%D1%80%D0%BC%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D0%B9-%D1%84%D0%B8%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80-f5-f6-f7-f9/>
24. Інокулятор BLBIO-XGJ. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://blanc-labo.fr/wp-content/uploads/2017/11/CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016.pdf>
25. Індивідуальний фільтр F-1 1/2-087-000 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.camozzi.ua/catalog/magistralna-pidgotovka-povitrya/magistralni-filtri/filtri-serii-f>
26. Ваговий дозатор ФС-125 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tehnomashstroy.com.ua/ua/p1345836234-vesovoj-dozator-125.html>
27. Реактор змішувач РТ-20MDSS 20L [Електронний ресурс] – режим доступу:<https://www.prowin-tools.com/product/pressure-tank/pt-20mdss-stainless-steel-pressure-tank/>

28. Насос для перекачування AODD BOXER 503. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/membrannue_nasosu/boxer_503/
29. Інокулятор Mobius® [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.merckmillipore.com/INTL/en/Mobius-Single-UseManufacturing/Mobius-SingleUseBioreactors/N76b.qB.fW0AAAFZmkxiYtcY.nav>
30. Реактор-змішувач Ai ETL C1D1 Dual-Jacketed SR200f 200L. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.acrossinternational.com/ai-dual-jacketed-200l-316l-grade-stainless-steel-filter-reactor.html>
31. Реактор-змішувач PROWIN TOOLS PT-10ADSS 10L [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.prowin-tools.com/product/pressure-tank/pt-10mdss-stainless-steel-pressure-tank/>
32. Інокулятор АБЕС [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.phxequip.com/equipment/29602/400-liters-abec-fermenter-bioreactor>.
33. Реактор-змішувач МК-FYF-2000. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://maikemachinery.en.made-in-china.com/product/wAXUIRGCZTVO/China-2000-Liter-Stainless-Steel-Jacketed-Chemical-Reactor-Fo.html>
34. Реактор змішувач SR100f Ai ETL C1D1 Dual-Jacketed 100L 316L-Grade SST Filter Reactor [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.acrossinternational.com/ai-dual-jacketed-100l-316l-grade-stainless-steel-reactor-with-filter.html>
35. Ферментер Yalian YMD 3000 L. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://yalian.en.made-in-china.com/product/OwZTfpbjwKVI/China-Yalian-3000-L-Stainless-Steel-Reactor-Stainless-Steel-Continuous-Stirred-Tank-Reactor-Price.html>

36. Реактор-змішувач Medimex HLR-5. [Електронний ресурс] – режим доступу:<https://www.foeth.com/en/reactors/stainless-steel-reactors/medimex-hlr-5-5-ltr-stainless-steel-reactor-412t1300/>
37. Лебідь С. Г. Основи загальної мікробіології: [методичні рекомендації для студентів напряму підготовки 6.040106 «Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування»]/С. Г. Лебідь, Т. Г. Федорович. – Миколаїв : Вид-во ЧДУ ім. Петра Могили, 2013. – 76 с. – (Методична серія; Вип. 203).
38. Загальна мікробіологія і вірусологія [Електронний ресурс]: лабораторний практикум 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, Л. В. Ключка ; Нац. ун-т харч. технол. — Київ : НУХТ, 2021. — 100 с.
39. Unthan S., Radek A., Wiechert W., Oldiges M., Noack S. Bioprocess automation on a Mini Pilot Plant enables fast quantitative microbial phenotyping. *Microb Cell Fact.* 2015, 14:32. doi: 10.1186/s12934-015-0216-6.
40. Željko A. Mihaljev, Sandra M. Jakšić, Nadežda B. Prica, et al. (2015) Comparison of the Kjeldahl method, Dumas method and NIR method for total nitrogen determination in meat and meat products. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies.* 21(4), pp. 365-370. [Електронний ресурс]. Режим доступу:https://www.researchgate.net/profile/Milica-Balos/publication/316081340_Comparison_of_the_Kjeldahl_method_Dumas_method_and_NIR_method_for_total_nitrogen_determination_in_meat_and_meat_products/links/58ef3761aca2724f0a28d562/Comparison-of-the-Kjeldahl-method-Dumas-method-and-NIR-method-for-total-nitrogen-determination-in-meat-and-meat-products.pdf
41. Xinli Lu, Jing Feng, Jajuan Zhanget al. (2013) Determination of 2-Keto-L-gulonic Acid in Fermented Broth by Flow Injection Chemiluminescence Using

Potassium Permanganate-Rhodamine B System. *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 25, No. 18 (2013), 10179-10181 DOI: 10.14233/ajchem.2013.15220

42. Очисні споруди "ОСК-60" продуктивністю 60,0 м³ на добу [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dom-ekology.com.ua/ua/p2195827819-ochistnye-sooruzheniya-kanalizatsii.html>

43. Послідовно-циклічний реактор (SBR). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.atlascopco.com/uk-ua/compressors/industry-solutions/wastewater-treatment/aeration-blower-for-sequencing-batch-reactor>

44. Апарати для очищення повітря від забруднень : методичні вказівки / В.В. Благодатний, Н.І. Магась, Ю.М. Харитонов. — Миколаїв : НУК 2019. — 52 с.